

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 406 429**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2008 E 08768823 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2167543**

(54) Título: **Proteínas ligantes de antígeno que se unen a PAR-2**

(30) Prioridad:

29.06.2007 US 947264 P
02.06.2008 US 58094 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2013

(73) Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US

(72) Inventor/es:

VIRCA, GEORGE DUKE y
HU, SHAW-FEN SYLVIA

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 406 429 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

Proteínas ligantes de antígeno que se unen a PAR-2.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. Número de Serie 61/058.094, presentada el 2 de junio de 2008, y la Solicitud Provisional de EE.UU. Número de Serie 60/947.264, presentada el 29 de junio de 2007.

Campo de la invención

Esta solicitud proporciona composiciones y métodos relativos a proteínas ligantes de antígeno PAR-2.

Antecedentes de la invención

10 La familia de receptores activados por proteinasas (PAR; del inglés, proteinase-activated receptor) es una parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, de siete dominios transmembranales. Actualmente hay cuatro PARs conocidos, de los cuales tres (PARs-1, -3 y -4) son activados por trombina; un cuarto (PAR-2) es activado por tripsina o por triptasa de mastocito, pero no por trombina. Los PARs están ampliamente distribuidos por una diversidad de tejidos y participan en diversos fenómenos fisiológicos o patofisiológicos tales como agregación plaquetaria, inflamación y funciones cardiovasculares, digestivas o respiratorias.

15 Los PARs difieren de otros receptores en que la activación es iniciada por escisión proteolítica del extremo N del PAR, que forma luego un ligando atado que interacciona con la región extracelular (bucle 2) del mismo polipéptido receptor. La escisión de PAR-2 se produce entre los restos R y S del dominio de escisión por proteasas, SKGRSLIG (aminoácidos 33 a 40 de la ID. SEC. nº 2), que está conservado entre los PAR-2 humano, murino y de rata. Se ha mostrado que péptidos que remedian el ligando atado presentan efectos agonistas sobre PAR-2 [Saifeddine et al., Br. J. Pharmacol. 118 (3): 521-30 (1996); McGuire et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 309 (3): 1124-31 (2004)].

20 El PAR-2 activa las vías de transducción de señales comunes mediadas por receptores acoplados a proteínas G, la producción de inositol 1,4,5-trifosfato y la movilización de Ca (2+), así como múltiples vías de cinasas, incluyendo ERK, p38MAPK, JNK e IKK. Está presente en células epiteliales y endoteliales, miocitos, fibroblastos, células inmunes, neuronas y células gliales, en el riñón, el páncreas, el estómago, el intestino, las vías aéreas, la piel, la vejiga y el cerebro. La proteasa que activa PAR-2 está presente durante la inflamación, y PAR-2 es suprarregulado por factores inflamatorios tales como el factor alfa de necrosis tumoral, la interleucina 1 alfa y el lipopolisacárido. Además, estudios en que se han usado ratones deficientes en PAR-2 o que lo sobreexpresan, confirman una función de este receptor en la inflamación [Schmidlin et al., J. Immunol. 169, 5315-5321 (2002); Ferrell et al., J. Clin. Invest. 111, 35-41 (2003)].

25 Mandal et al., Blood 110, 161-170 (2007), describen un antisuero policlonal hacia PAR-2, y Ui et al., Eur. J. Pharmacology 530, 172-178 (2006), y Yoshida et al., Int. J. Mol. Med. 19, 335-340 (2007), describen un anticuerpo anti-PAR-2 que se generó contra la secuencia atada de PAR-2 y no se une preferentemente al PAR-2 de longitud completa.

30 35 En consecuencia, en la técnica existe la necesidad de desarrollar antagonistas específicos de la activación de PAR-2, que sean útiles para el tratamiento o la mejoría de estados inflamatorios.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un conjunto de gráficos que permiten comparar los niveles de ciertas citocinas proinflamatorias presentes en tejido de pata de rata en un modelo de artritis inducida con adyuvante.

40 **Sumario de la invención**

La invención es como se expone en las reivindicaciones.

45 La presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno aislada que se une específicamente a PAR-2 humano no escindido y se une en menor grado a PAR-2 humano escindido. En otra realización, la proteína ligante de antígeno aislada comprende: a. un anticuerpo humano; b. un anticuerpo químérico; c. un anticuerpo monoclonal; d. un anticuerpo recombinante; e. un fragmento de anticuerpo ligante de antígeno; f. un anticuerpo de cadena sencilla; g. un diacuerpo; h. un triacuerpo; i. un tetracuerpo; j. un fragmento Fab; k. un fragmento F(ab')₂; l. un anticuerpo de dominio; m. un anticuerpo IgD; n. un anticuerpo IgE; o. un anticuerpo IgM; p. un anticuerpo IgG1; q. un anticuerpo IgG2; r. un anticuerpo IgG3; s. un anticuerpo IgG4; o t. un anticuerpo IgG4 que tiene al menos una mutación en una región bisagra que alivia la tendencia a formar un enlace disulfuro intra-cadenas H.

En otro aspecto de la invención, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno aislada que tiene una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo la cadena pesada una región variable que tiene una identidad de al menos 95% con respecto a la ID. SEC. nº 9, y comprendiendo la cadena ligera una región variable que tiene una identidad de al menos 95% con respecto a la ID. SEC. nº 11. En otro aspecto de la invención, la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 39, y la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 40.

5 En una realización de la invención, la región variable de cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs; del inglés, *complementarity determining regions*) denominadas CDR1, CDR2 y CDR3, y la región variable de cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) 10 denominadas CDR1, CDR2 y CDR3. En otro aspecto de la invención, la región variable de cadena pesada comprende además cuatro regiones de armazón (FRs; del inglés, *framework regions*) denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4, y la región variable de cadena ligera comprende además cuatro regiones de armazón (FRs) denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4. En una realización de la invención, las CDRs de cadena pesada son seleccionadas de entre 15 las CDRs de los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las ID. SEC. números 9, 13 y 17, y las CDRs de cadena ligera son seleccionadas de entre las CDRs de los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las ID. SEC. números 11, 15 y 19.

20 En un aspecto de la invención, las tres CDRs de cadena pesada son seleccionadas del mismo péptido; por ejemplo, las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada son de la ID. SEC. nº 9, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera son de la ID. SEC. nº 11, etc. En otra realización de la invención, las CDRs son seleccionadas de entre péptidos 25 diferentes; por ejemplo, la CDR1 de cadena pesada es de la ID. SEC. nº 9, la CDR2 es de la ID. SEC. nº 13 y la CDR3 es de la ID. SEC. nº 17, y la CDR1 de cadena ligera es de la ID. SEC. nº 11, la CDR2 es de la ID. SEC. nº 15 y la CDR3 es de la ID. SEC. nº 19, etc. Alternativamente, dos CDRs pueden ser seleccionadas de un solo péptido y la tercera de otro péptido. Son posibles numerosas combinaciones. En otro aspecto, las regiones de armazón pueden ser seleccionadas del mismo péptido, o una o más regiones de armazón pueden ser seleccionadas de péptidos diferentes.

30 En un aspecto de la invención, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos anteriormente mencionados. En otro aspecto de la invención, el ácido nucleico es un vector. En otra realización de la invención, la invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con los ácidos nucleicos de la invención. En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar un polipéptido, que comprende 35 incubar las células huésped bajo unas condiciones que promueven la expresión de los polipéptidos y recolectar los polipéptidos.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula aislada que secreta una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2. En otra realización, la célula es un hibridoma. En otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2 humano, que comprende incubar dicha célula aislada bajo unas condiciones que le permiten expresar dicha proteína ligante de antígeno.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno aislada que se une al receptor 2 activado por proteinasa (PAR-2). En otra realización, la proteína ligante de antígeno aislada, cuando se une a un PAR-2 humano, inhibe la escisión proteolítica y/o la subsiguiente señalización a través de dicho PAR-2 humano. En otra realización, la proteína ligante de antígeno aislada inhibe la activación proteolítica de PAR-2 en más de aproximadamente un 80%. En otra realización, la proteína ligante de antígeno aislada inhibe la activación proteolítica de PAR-2 en menos de aproximadamente un 10%.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína ligante de antígeno.

45 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona composiciones, kits y métodos relativos a moléculas que se unen al receptor 2 activado por proteinasa ("PAR-2"), incluyendo moléculas que presentan agonismo o antagonismo sobre PAR-2, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo anti-PAR-2, tales como, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o derivados de anticuerpo anti-PAR-2 antagonistas. También se proporcionan 50 ácidos nucleicos, y derivados y fragmentos de los mismos, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica todo, o una porción de, un polipéptido que se une a PAR-2, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica todo, o parte de, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de anticuerpo anti-PAR-2, plásmidos y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, y células o líneas celulares que comprenden dichos ácidos nucleicos y/o vectores y plásmidos. Los métodos proporcionados incluyen, por ejemplo, métodos para preparar, 55 identificar o aislar moléculas que se unen a PAR-2, tales como anticuerpos anti-PAR-2, métodos para determinar si una molécula se une a PAR-2, métodos para determinar si una molécula presenta agonismo o antagonismo sobre

PAR-2, y métodos para preparar composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden una molécula que se une a PAR-2.

Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas se indican usando abreviaturas estándares de una o tres letras. A menos que se indique otra cosa, cada secuencia polipeptídica tiene un extremo amínico a la izquierda y un extremo carboxílico a la derecha; cada secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla, y la cadena superior de cada secuencia de ácido nucleico de cadena doble, tienen un extremo 5' a la izquierda y un extremo 3' a la derecha. También se puede describir una secuencia polipeptídica o polinucleotídica particular explicando cómo difiere de una secuencia de referencia.

A menos que se defina otra cosa en esta memoria, las expresiones científicas y técnicas usadas en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, las expresiones singulares incluirán pluralidades y las expresiones plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química y la hibridación de proteínas y ácidos nucleicos, descritas en esta memoria, son aquéllas bien conocidas y comúnmente usadas en este campo técnico. Los métodos y técnicas de la presente invención se llevan generalmente a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en este campo técnico y del modo descrito en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1990). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, como se realizan habitualmente en este campo técnico o como se describen en esta memoria. La terminología usada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica, descritos en esta memoria, son aquellos bien conocidos y comúnmente usados en este campo técnico. Se pueden usar técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y distribución farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

A menos que se indique otra cosa, se debe entender que las expresiones siguientes tienen los significados siguientes:

La expresión "molécula aislada" (donde la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo) es una molécula que, en virtud de su origen o fuente de derivación, (1) no está asociada con componentes naturalmente asociados que la acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente exenta de otras moléculas de la misma especie, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se presenta en la naturaleza sin intervención humana. De este modo, una molécula que sea químicamente sintetizada, o sea sintetizada en un sistema celular diferente de la célula de la cual se origina naturalmente, estará "aislada" de sus componentes naturalmente asociados. Mediante aislamiento, usando técnicas de purificación bien conocidas en este campo técnico, también se puede hacer que una molécula esté sustancialmente exenta de componentes naturalmente asociados. Se puede examinar la pureza u homogeneidad de una molécula mediante diversos medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede examinar la pureza de una muestra polipeptídica usando electroforesis en gel de poliacrilamida y tiñendo el gel para visualizar el polipéptido, usando técnicas bien conocidas en este campo técnico. Para ciertas finalidades, se puede proporcionar una mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para purificación.

Las expresiones "inhibidor de PAR-2" y "antagonista de PAR-2" se usan indistintamente. Cada una es una molécula que inhibe detectablemente al menos una función de PAR-2. Por el contrario, un "agonista de PAR-2" es una molécula que aumenta detectablemente al menos una función de PAR-2. No es necesario que la inhibición causada por un inhibidor de PAR-2 sea completa con tal de que sea detectable utilizando un ensayo. Se puede utilizar cualquier ensayo de una función de PAR-2, ejemplos de los cuales se proporcionan en esta memoria. Los ejemplos de funciones de PAR-2 que pueden ser inhibidas por un inhibidor de PAR-2, o aumentadas por un agonista de PAR-2, incluyen la unión de ligandos activada por proteasas, la señalización corriente abajo, etcétera. Los ejemplos de tipos de inhibidores de PAR-2 y agonistas de PAR-2 incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos ligantes de PAR-2 tales como proteínas ligantes de antígeno (por ejemplo, proteínas ligantes de antígeno que inhiben PAR-2), anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo.

Cada uno de los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se refiere a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácido unidos entre sí por enlaces peptídicos. Estos términos abarcan, por ejemplo, proteínas nativas y artificiales, fragmentos proteicos y compuestos polipeptídicos análogos (tales como mutéinas, variantes y proteínas de fusión) de una secuencia proteica, así como proteínas posttraduccionalmente, o si no covalente o no covalentemente, modificadas. Un péptido, polipéptido o proteína puede ser monómero o polímero.

La expresión "fragmento polipeptídico", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polipéptido que tiene una supresión amino-terminal y/o carboxilo-terminal en comparación con la correspondiente proteína de longitud completa. Los fragmentos pueden tener una longitud de, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos. Los fragmentos pueden tener además una longitud de, por ejemplo, a lo sumo 1000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos. Un fragmento puede comprender además, en cualquiera de sus extremos o en ambos, uno o más aminoácidos adicionales, tal como, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una diferente proteína presente en la naturaleza (por ejemplo, un Fc o un dominio de cremallera de leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (por ejemplo, una secuencia conectora artificial o una etiqueta proteica).

Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que han sido modificados de cualquier modo y por cualquier razón para, por ejemplo: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad ligante para formar complejos proteicos, (4) alterar afinidades ligantes, y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Los compuestos análogos incluyen mutáneas de un polipéptido. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de un sólo aminoácido o múltiples aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia presente en la naturaleza [por ejemplo, en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares]. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una que no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia originaria (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería presentar tendencia a romper una hélice que se presenta en la secuencia originaria ni a alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia original o son necesarios para su funcionalidad). En "Proteins, Structures and Molecular Principles" [redactado por Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1984)], "Introduction to Protein Structure" [redactado por C. Branden y J. Tooze, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)] y Thornton et al., Nature 354: 105 (1991), se describen ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica.

La presente invención también proporciona compuestos análogos no peptídicos de polipéptidos ligantes de PAR-2. En la industria farmacéutica se usan habitualmente compuestos análogos no peptídicos como fármacos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos son denominados "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos"; véanse, por ejemplo, Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber y Freidinger, TINS, página 392 (1985); y Evans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987). Se pueden usar miméticos peptídicos que sean estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles, para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂--CH₂--, --CH=CH-- (cis y trans), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂-- y --CH₂SO--, mediante métodos bien conocidos en la técnica. También se puede utilizar la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina), para generar péptidos más estables. Además, se pueden generar péptidos forzados que comprendan una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica, mediante métodos conocidos en la técnica [Rizo y Giersch, Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992), incorporado en esta memoria por referencia], por ejemplo, añadiendo restos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que producen la ciclación del péptido.

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácido han sido insertados en, suprimidos de y/o sustituidos en, la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia polipeptídica. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que ha sido químicamente modificado por medio de, por ejemplo, conjugación con otro componente químico (tal como, por ejemplo, polietilenglicol o albúmina, por ejemplo, albúmina sérica humana), fosforilación y glicosilación. A menos que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" incluye, además de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos y mutáneas de los mismos, ejemplos de los cuales se describen más adelante.

Una "proteína ligante de antígeno" es una proteína que comprende una porción que se une a un antígeno y, opcionalmente, una porción de andamio o armazón que permite que la porción ligante de antígeno adopte una conformación que promueve la unión de la proteína ligante de antígeno al antígeno. Los ejemplos de proteínas ligantes de antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, una porción ligante de antígeno de un anticuerpo), derivados de anticuerpo y compuestos análogos de anticuerpo. La proteína ligante de antígeno puede comprender, por ejemplo, un andamio artificial o andamio proteico alternativo con CDRs o derivados de CDR injertados. Dichos andamios incluyen, pero no se limitan a, andamios derivados de anticuerpo que comprenden mutaciones introducidas para, por ejemplo, estabilizar la estructura tridimensional de la proteína ligante de antígeno, así como andamios totalmente sintéticos que comprenden, por ejemplo, un polímero biocompatible. Véanse, por ejemplo, Korndorfer et al., 2003, "Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics", volumen 53, publicación 1: 121-

129, y Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654. Además, se pueden usar miméticos peptídicos de anticuerpo (PAMs; del inglés, peptide antibody mimetics) así como andamios basados en miméticos de anticuerpo que utilizan componentes de unión a fibronectina como un andamio.

5 Una proteína ligante de antígeno puede tener, por ejemplo, la estructura de una inmunoglobulina presente en la naturaleza. Una "inmunoglobulina" es una molécula tetrámera. En una inmunoglobulina presente en la naturaleza, cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, esencialmente responsable del reconocimiento antigenico. La porción carboxilo-terminal de cada cadena de cine una 10 región constante esencialmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en mu, delta, gamma, alfa y épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, en 15 general, "Fundamental Immunology", capítulo 7 [redactado por W. Paul, 2^a edición, Raven Press, New York (1989)]. Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio ligante del anticuerpo, de modo que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios ligantes.

20 Las regiones variables de cadenas inmunoglobulínicas presentes en la naturaleza presentan la misma estructura general de regiones de armazón (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Del extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat et al. en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a edición, US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, Publicación nº 91-3242 del NIH, 1991. Otros sistemas de numeración para los aminoácidos de cadenas de inmunoglobulinas incluyen IMGT® (el 25 sistema de información internacional ImMunoGeneTics; Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 29: 185-203, 2005) y AHO (Honegger y Pluckthun, J. Mol. Biol. 309 (3): 657-670, 2001).

30 Se pueden obtener anticuerpos de fuentes, tales como suero y plasma, que contienen inmunoglobulinas que tienen una especificidad antigenica variada. Si dichos anticuerpos son sometidos a purificación por afinidad, pueden ser enriquecidos en cuanto a una especificidad antigenica concreta. Dichas preparaciones de anticuerpos enriquecidas están normalmente compuestas de menos de aproximadamente un 10% de anticuerpo que tiene actividad ligante específica hacia el antígeno concreto. El sometimiento de estas preparaciones a varios ciclos de purificación por afinidad puede aumentar la proporción del anticuerpo que tiene actividad ligante específica hacia el antígeno. A los 35 anticuerpos preparados de esta manera se hace a menudo referencia como "monoespecíficos". Las preparaciones de anticuerpos monoespecíficos pueden estar compuestas de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 99,9% de un anticuerpo que tiene actividad ligante específica hacia el antígeno concreto.

40 Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una porción ligante de antígeno de la misma que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique otra cosa. Se pueden producir porciones ligantes de antígeno mediante técnicas de DNA recombinante o mediante la escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones ligantes de antígeno incluyen, *inter alia*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio (dAbs; del inglés, domain antibodies), y fragmentos de región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena única (scFv; del inglés, single-chain Fv), anticuerpos químéricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir una unión antigenica específica al polipéptido.

45 Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que tiene los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd tiene los dominios V_H y C_{H1}; un fragmento Fv tiene los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb tiene un dominio V_H, un dominio V_L, o un fragmento ligante de antígeno de un dominio V_H o V_L (Patentes de EE.UU. números 6.846.634 y 6.696.245, Publicaciones de Solicitud de EE.UU. números 05/0202512, 50 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507 y 03/0039958, Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989).

55 Un anticuerpo de cadena única (scFv) es un anticuerpo en que una región V_L y una región V_H están unidas por medio de un conector (por ejemplo, una secuencia sintética de restos de aminoácido) para formar una cadena proteica continua en donde el conector es lo suficientemente largo para permitir que la cadena proteica se pliegue sobre sí misma y forme un sitio ligante de antígeno monovalente (véanse, por ejemplo, Bird et al., 1988, Science 242: 423-26, y Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83). Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, en donde cada cadena polipeptídica comprende dominios V_H y V_L unidos por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre dos dominios de la misma cadena, lo que permite que cada dominio se aparezca con un dominio complementario de otra cadena

- polipeptídica (véanse, por ejemplo, Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-48, y Poljak et al., 1994, Structure 2: 1121-23). Si las dos cadenas polipeptídicas de un diacuerpo son idénticas, un diacuerpo que resulte de su apareamiento tendrá entonces dos sitios ligantes de antígeno idénticos. Se pueden usar cadenas polipeptídicas que tengan secuencias diferentes para preparar un diacuerpo con dos sitios ligantes de antígeno diferentes.
- 5 Similarmente, los tricuerpos y tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas polipeptídicas, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios ligantes de antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes.
- Se pueden identificar regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y regiones de armazón (FR) de un anticuerpo dado utilizando el sistema descrito por Kabat et al., *supra*, Lefranc et al., *supra*, y/o Honegger y Pluckthun, *supra*. Se pueden incorporar uno o más CDRs a una molécula, covalente o no covalentemente, para convertirla en una proteína ligante de antígeno. Una proteína ligante de antígeno puede llevar incorporada(s) la(s) CDR(s) como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede llevar unida(s) covalentemente la(s) CRD(s) a otra cadena polipeptídica, o puede llevar incorporada(s) la(s) CDR(s) no covalentemente. Las CDRs permiten que la proteína ligante de antígeno se una específicamente a un antígeno de interés concreto.
- 15 Una proteína ligante de antígeno puede tener uno o más sitios ligantes. Si hay más de un sitio ligante, los sitios ligantes pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina humana presente en la naturaleza tiene típicamente dos sitios ligantes idénticos, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios ligantes diferentes.
- 20 La expresión "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias inmunoglobulínicas humanas. En una realización, todos los dominios variables y constantes proceden de secuencias inmunoglobulínicas humanas (un anticuerpo completamente humano). Estos anticuerpos se pueden preparar de diversas maneras, ejemplos de las cuales se describen más adelante, incluyendo por medio de la inmunización, con un antígeno de interés, de un ratón que ha sido genéticamente modificado para que exprese anticuerpos derivados de genes que codifican cadenas pesadas y/o ligeras humanas.
- 25 Un anticuerpo humanizado tiene una secuencia que difiere de la secuencia de un anticuerpo procedente de una especie no humana en una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos, por lo que es menos probable que el anticuerpo humanizado induzca una respuesta inmune y/o el anticuerpo humanizado induce una respuesta inmune menos intensa, en comparación con el anticuerpo de especie no humana, cuando se administra a un sujeto humano. En una realización, se mutan ciertos aminoácidos del armazón y los dominios constantes de las 30 cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo de especie no humana, para producir el anticuerpo humanizado. En otra realización, se fusiona(n) el(los) dominio(s) constante(s) de un anticuerpo humano con el(los) dominio(s) variable(s) de una especie no humana. En otra realización, se cambian uno o más restos de aminoácido en una o más secuencias de CDR de un anticuerpo no humano para reducir la probable inmunogenicidad del anticuerpo no humano cuando se administra a un sujeto humano, en donde los restos de aminoácido cambiados no son críticos para la unión inmunoespecífica del anticuerpo con su antígeno, o los cambios que se hacen en la secuencia de aminoácidos son cambios conservativos, de modo que la unión del anticuerpo humanizado con el antígeno no es significativamente peor que la unión del anticuerpo no humano con el antígeno. En las Patentes de EE.UU. números 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293 se pueden encontrar ejemplos de cómo preparar anticuerpos humanizados.
- 35 La expresión "anticuerpo químérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos distintos. En una realización, una o más de las CDRs proceden de un anticuerpo humano anti-PAR-2. En otra realización, todas las CDRs proceden de un anticuerpo humano anti-PAR-2. En otra realización, las CDRs de más de un anticuerpo humano anti-PAR-2 se mezclan y encajan en un anticuerpo químérico. Por ejemplo, un anticuerpo químérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo humano anti-PAR-2, una CDR2 y una CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo humano anti-PAR-2, y las CDRs de la cadena pesada de un tercer anticuerpo anti-PAR-2. Otras combinaciones son posibles y están incluidas dentro de las realizaciones de la invención.
- 40 Además, las regiones de armazón pueden proceder de uno de los mismos anticuerpos anti-PAR-2, de uno o más anticuerpos diferentes, tal como un anticuerpo humano, o de un anticuerpo humanizado. En un ejemplo de un anticuerpo químérico, una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a, o procede de, un anticuerpo de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a, o procede de, un(os) anticuerpo(s) de otra especie o que pertenece(n) a otra clase o subclase de anticuerpo. También se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos que presentan la deseada actividad biológica (es decir, la capacidad para unirse específicamente a PAR-2). Véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.816.567, y Morrison, 1985, Science 229: 1202-07.
- 45 50 55 Un "anticuerpo neutralizante" o un "anticuerpo inhibitorio" es un anticuerpo que inhibe la activación proteolítica de PAR-2 cuando un exceso del anticuerpo anti-PAR-2 reduce la cantidad de activación en al menos aproximadamente 20% al utilizar un ensayo tal como el descrito en los Ejemplos de esta memoria. En diversas realizaciones, la

proteína ligante de antígeno reduce la cantidad de activación proteolítica de PAR-2 en al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% y 99,9%.

Quienes tienen una experiencia normal en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o compuestos análogos de anticuerpos siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva y usando técnicas bien conocidas en este campo técnico. Los extremos amino y carboxilo preferidos de fragmentos o compuestos análogos se presentan cerca de los límites de dominios funcionales. Se pueden identificar dominios estructurales y funcionales por comparación de los datos de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos secuenciales públicas o privadas. Se pueden utilizar métodos de comparación informáticos para identificar motivos secuenciales o dominios previstos de conformación proteica que se presentan en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias proteicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase, por ejemplo, Bowie et al., 1991, *Science* 253: 164.

Un "anticuerpo con CDR injertada" es un anticuerpo que comprende una o más CDRs procedentes de un anticuerpo de una especie o isotipo particular, y el armazón de otro anticuerpo de igual o diferente especie o isotipo.

Un "anticuerpo multiespecífico" es un anticuerpo que reconoce más de un epítopo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un "anticuerpo biespecífico" que reconoce dos epítopos distintos en antígenos iguales o diferentes.

Una proteína ligante de antígeno "se une específicamente" a un antígeno (por ejemplo, PAR-2 humano) si se une al antígeno con una constante de disociación de 1 nanomolar o menos.

Un "dominio ligante de antígeno", "región ligante de antígeno" o "sitio ligante de antígeno" es una porción de una proteína ligante de antígeno que contiene restos de aminoácido (u otros componentes) que interaccionan con un antígeno y contribuyen a la especificidad y afinidad de la proteína ligante de antígeno por el antígeno. Para un anticuerpo que se une específicamente a su antígeno, esto incluirá al menos parte de al menos uno de sus dominios CDR.

Un "epítopo" es la porción de una molécula a la que se une una proteína ligante de antígeno (por ejemplo, un anticuerpo). Un epítopo puede comprender porciones no contiguas de la molécula (por ejemplo, en un polipéptido, restos de aminoácido que no son contiguos en la secuencia primaria del polipéptido pero que, en el contexto de las estructuras terciaria y cuaternaria del polipéptido, están lo suficientemente cerca entre sí para que a ellos se una a una proteína ligante de antígeno).

El "porcentaje de identidad" de dos secuencias polinucleotídicas o dos secuencias polipeptídicas se determina comparando las secuencias usando el programa informático GAP [una parte del GCG Wisconsin Package, versión 10.3 (Accelrys, San Diego, California)], utilizando sus parámetros por omisión.

Las expresiones "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en esta memoria e incluyen moléculas de DNA (por ejemplo, cDNA o DNA genómico), moléculas de RNA (por ejemplo, mRNA), compuestos análogos del DNA o RNA generados usando compuestos nucleotídicos análogos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos y compuestos nucleotídicos análogos que no se presentan en la naturaleza), e híbridos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o cadena doble. En una realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un marco de lectura abierto contiguo que codifica un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína o variante del mismo, de la invención.

Dos polinucleótidos de cadena sencilla son uno "el complemento" del otro si sus secuencias se pueden alinear en una orientación antiparalela de modo que cada nucleótido de un polinucleótido esté enfrente de su nucleótido complementario del otro polinucleótido, sin la introducción de huecos y sin nucleótidos despareados en el extremo 5' o 3' de cada secuencia. Un polinucleótido es "complementario" de otro polinucleótido si los dos polinucleótidos se pueden hibridar entre sí bajo condiciones moderadamente rigurosas. De este modo, un polinucleótido puede ser complementario de otro polinucleótido sin ser su complemento.

Un "vector" es un ácido nucleico que se puede utilizar para introducir en una célula otro ácido nucleico unido a él. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de DNA lineal o circular de cadena doble a la que se pueden ligar segmentos de ácido nucleico adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados, defectuosos en cuanto a la replicación), en cuyo genoma vírico se pueden introducir segmentos de DNA adicionales. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que comprenden un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y se replican por ello junto con el genoma del huésped. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido escogido.

Una secuencia nucleotídica está "operativamente unida" a una secuencia regulatoria si la secuencia regulatoria afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, la regulación temporal o la posición de la expresión) de la secuencia nucleotídica. Una "secuencia regulatoria" es un ácido nucleico que afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, la regulación temporal o la posición de la expresión) de un ácido nucleico al cual está operativamente unida. Por ejemplo, la secuencia regulatoria puede ejercer sus efectos directamente sobre el ácido nucleico regulado, o a través de la acción de una o más moléculas distintas (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia regulatoria y/o el ácido nucleico). Los ejemplos de secuencias regulatorias incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). En, por ejemplo, Goeddel, 1990, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, y Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23: 3605-06, se describen otros ejemplos de secuencias regulatorias.

Una "célula huésped" es una célula que se puede utilizar para que se exprese un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención. Una célula huésped puede ser un procariote, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser un eucariote, por ejemplo, un eucariote unicelular (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula vegetal (por ejemplo, una célula vegetal de tabaco o tomate), una célula animal (por ejemplo, una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. Los ejemplos de células huésped incluyen la línea COS-7 de células renales de mono (ATCC CRL 1651) (véase Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO; del inglés, *Chinese hamster ovary*) o sus derivados tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medios exentos de suero (véase Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31) o la cepa DX-B11 de CHO, que es deficiente en DHFR (véase Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77: 4216-20), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular CV1 de riñón de mono verde africano (ATCC CCL 70) (véase McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821), células renales embrionarias humanas tales como 293, 293 EBNA y MSR 293, células epidérmicas humanas A431, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, y células HL-60, U937, HaK y Jurkat. Típicamente, una célula huésped es una célula cultivada que puede ser transformada o transfectada con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, el cual se puede luego expresar en la célula huésped. La frase "célula huésped recombinante" se puede utilizar para significar una célula huésped que ha sido transformada o transfectada con un ácido nucleico que se va a expresar. Una célula huésped puede ser también una célula que comprenda el ácido nucleico pero no lo exprese en un nivel deseado a menos que se introduzca una secuencia regulatoria en la célula huésped para que llegue a unirse operativamente con el ácido nucleico. Se entiende que la expresión "célula huésped" se refiere no sólo a la célula objetivo particular sino también a la progenie o potencial progenie de dicha célula. Puesto que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a, por ejemplo, una mutación o influencia ambiental, puede que, en realidad, dicha progenie no sea idéntica a la célula originaria, pero está aún incluida dentro del alcance de la expresión como se usa en esta memoria.

PAR-2

Como se discutió previamente, el PAR-2 es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, de siete dominios transmembranales; la activación se inicia por escisión proteolítica del extremo N para formar un ligando atado. En las ID. SEC. números 1 y 2 se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del PAR-2 humano; la secuencia de aminoácidos del PAR-2 de ratón se muestra en la ID. SEC. nº 3 y la del PAR-2 de rata se muestra en la ID. SEC. nº 4. La escisión proteolítica produce la forma activa de este receptor, a la que en esta memoria se hace referencia indistintamente como PAR-2 "escindido" o "recortado".

Proteínas ligantes de antígeno

La presente invención proporciona proteínas ligantes de antígeno (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo, mutéinas de anticuerpo y variantes de anticuerpo) que se unen al PAR-2 humano no escindido y se unen en menor grado al PAR-2 humano escindido.

Las proteínas ligantes de antígeno de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas ligantes de antígeno que inhiben una actividad biológica de PAR-2. Los ejemplos de tales actividades biológicas incluyen la activación de vías de transducción de señales comunes mediadas por receptores acoplados a proteínas G, tales como la producción de inositol 1,4,5-trifosfato y la movilización de Ca(2+), y la activación de múltiples vías de cinasas, incluyendo ERK, p38MAPK, JNK e IKK. Otras actividades biológicas incluyen las mediadas por PAR-2 *in vivo*, tales como la respuesta a traumas e inflamaciones; en particular, el PAR-2 está implicado en los sistemas cardiovascular, pulmonar y gastrointestinal, donde controla la inflamación y la nocicepción (percepción de dolor). La activación de PAR-2 también desempeña un papel en la respuesta inflamatoria, cuya activación crónica puede conducir a estados morbosos.

Diferentes proteínas ligantes de antígeno se pueden unir a diferentes dominios o epítopos de PAR-2 o actuar mediante diferentes mecanismos de acción. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, proteínas ligantes de

- 5 antígeno que interfieren en la activación proteolítica de PAR-2 o que inhiben la transducción de señales. El sitio de acción puede ser, por ejemplo, intracelular (por ejemplo, al interferir en una cascada de señalización intracelular) o extracelular. No es necesario que una proteína ligante de antígeno inhiba completamente la actividad inducida por PAR-2 para resultar útil en la presente invención; en lugar de ello, también se consideran útiles las proteínas ligantes de antígeno que reducen una actividad particular de PAR-2 (las discusiones de esta memoria en cuanto a mecanismos particulares de acción de las proteínas ligantes de antígeno ligantes de PAR-2 en el tratamiento de enfermedades particulares son sólo ilustrativas, y los métodos presentados en esta memoria no están vinculados a ellas).
- 10 Otros derivados de anticuerpos anti-PAR-2 dentro del alcance de esta invención incluyen productos de conjugación covalentes o agregativos de anticuerpos anti-PAR-2, o fragmentos de los mismos, con otras proteínas o polipéptidos, tal como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados con el extremo N o el extremo C de un anticuerpo polipeptídico anti-PAR-2. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal (o líder) heterólogo, por ejemplo, el líder del factor alfa de levadura, o un péptido tal como una etiqueta epitópica. Las proteínas de fusión que contienen proteína ligante de antígeno pueden
- 15 comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de la proteína ligante de antígeno (por ejemplo, poli-His). Una proteína ligante de antígeno puede estar también unida al péptido FLAG® Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (ID. SEC. nº 7), como se describe en Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988, y en la Patente de EE.UU. nº 5.011.912. El péptido FLAG® es muy antigénico y proporciona un epitópico al que se une reversiblemente un anticuerpo monoclonal (mAb; del inglés, monoclonal antibody) específico, lo que permite un rápido ensayo y una fácil purificación de la proteína recombinante expresada. Se dispone comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) de reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que esté fusionado el péptido FLAG® con un polipéptido dado.
- 20 Se pueden emplear oligómeros que contengan una o más proteínas ligantes de antígeno, como antagonistas de PAR-2. Los oligómeros pueden estar en forma de dímeros, trímeros u oligómeros superiores, covalentemente enlazados o no covalentemente enlazados. Se contemplan para uso los oligómeros que comprenden dos o más proteínas ligantes de antígeno, siendo un ejemplo un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotímeros, heterotímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc.
- 25 Una realización se dirige a oligómeros que comprenden múltiples proteínas ligantes de antígeno unidas por medio de interacciones covalentes o no covalentes entre componentes peptídicos fusionados con las proteínas ligantes de antígeno. Dichos péptidos pueden ser conectores (espaciadores) peptídicos o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos están entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de proteínas ligantes de antígeno fijadas a los mismos, como se describe más adelante con mayor detalle.
- 30 En realizaciones particulares, los oligómeros comprenden de dos a cuatro proteínas ligantes de antígeno. Las proteínas ligantes de antígeno del oligómero pueden estar en cualquier forma, tal como cualquiera de las formas anteriormente descritas, por ejemplo, variantes o fragmentos. Preferiblemente, los oligómeros comprenden proteínas ligantes de antígeno que tienen actividad ligante de PAR-2.
- 35 En una realización, se prepara un oligómero usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados con diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc) ha sido descrita, por ejemplo, por Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88: 10.535; Byrn et al., 1990, Nature 344: 677; y Hollenbaugh et al., 1992, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins" en *Current Protocols in Immunology*, suplemento 4, páginas 10.19.1-10.19.11.
- 40 Una realización de la presente invención se dirige a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas al fusionar un fragmento ligante de PAR-2 de un anticuerpo anti-PAR-2 con la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede ser preparado, por ejemplo, insertando en un vector de expresión apropiado una fusión génica que codifica la proteína de fusión, haciendo que se exprese la fusión génica en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante, y dejando que la proteína de fusión expresada se ensamble igual que moléculas de anticuerpo, con lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los componentes de Fc para producir el dímero.
- 45 50 Una realización de la presente invención "polipéptido de Fc", como se usa en esta memoria, incluye formas nativas y muténicas de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden componentes de Fc (y los oligómeros formados a partir de ellas) presentan la ventaja de una fácil purificación por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A o proteína G.
- 55 55 Un polipéptido de Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta el extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1

humano. Otro polipéptido de Fc útil es la muteína de Fc descrita en la Patente de EE.UU. nº 5.457.035 y en Baum et al., 1994, EMBO J. 13: 3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia de Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151 salvo por que el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 ha sido cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 ha sido cambiado de Gly a Ala. La muteína presenta una afinidad reducida por receptores de Fc.

En otras realizaciones, la porción variable de las cadenas pesadas y/o ligeras de un anticuerpo anti-PAR-2 puede sustituir a la porción variable de una cadena pesada y/o ligera de anticuerpo.

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples proteínas ligantes de antígeno, con o sin conectores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los conectores peptídicos adecuados están los descritos en las Patentes de EE.UU. números 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para preparar proteínas oligoméricas ligantes de antígeno implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en que se hallan. Las cremalleras de leucina fueron originalmente identificadas en varias proteínas ligantes de DNA (Landschulz et al., 1988, Science 240: 1759), y desde entonces han sido halladas en una diversidad de diferentes proteínas. Entre las cremalleras de leucina conocidas están péptidos presentes en la naturaleza y derivados de los mismos que se dimerizan o trimerizan. En la solicitud PCT WO 94/10308 se describen ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles, y en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344: 191, se describe la cremallera de leucina derivada de la proteína D tensioactiva (SPD; del inglés, surfactant protein D) de pulmón. En Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6: 267-78, se describe el uso de una cremallera de leucina modificada que permite una trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada con ella. En un planteamiento, se expresan proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento o derivado de anticuerpo anti-PAR-2 fusionado con un péptido de cremallera de leucina, en células huésped adecuadas, y se recuperan del sobrenadante del cultivo los fragmentos o derivados oligoméricos solubles de anticuerpo anti-PAR-2 que se forman.

En un aspecto, la presente invención proporciona proteínas ligantes de antígeno que interfieren en la activación proteolítica de un PAR-2. Dichas proteínas ligantes de antígeno pueden ser preparadas contra PAR-2, o un fragmento, variante o derivado del mismo, y son exploradas en ensayos convencionales en cuanto a la capacidad para interferir en la activación proteolítica de PAR-2. Son ejemplos de ensayos adecuados los ensayos en que se examinan las proteínas ligantes de antígeno en cuanto a la capacidad para inhibir la activación proteolítica de células que expresan PAR-2, o se examinan proteínas ligantes de antígeno en cuanto a la capacidad para reducir una respuesta biológica o celular que resulta de la activación proteolítica de receptores PAR-2 de la superficie celular. Ensayos adicionales en que se examinan las proteínas ligantes de antígeno incluyen aquellos en que se compara cualitativa o cuantitativamente la unión de una proteína ligante de antígeno con un polipéptido PAR-2 no escindido de longitud completa, con la unión de aquélla con un polipéptido PAR-2 proteolíticamente escindido, varios ejemplos de los cuales se describe en esta memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que presenta selectividad de especie. En una realización, la proteína ligante de antígeno se une a uno o más PAR-2 de mamífero, por ejemplo, a PAR-2 humano y uno o más de PAR-2 de ratón, rata, cobayo, hámster, jerbo, gato, conejo, perro, cabra, oveja, vaca, caballo, camello y primate no humano. En otra realización, la proteína ligante de antígeno se une a uno o más PAR-2 de primate, por ejemplo, a PAR-2 humano y uno o más de PAR-2 de macaco cangrejero, tití, macaco rhesus y chimpancé. En otra realización, la proteína ligante de antígeno se une específicamente a PAR-2 de ser humano, macaco cangrejero, tití, macaco rhesus o chimpancé. En otra realización, la proteína ligante de antígeno no se une a uno o más de PAR-2 de ratón, rata, cobayo, hámster, jerbo, gato, conejo, perro, cabra, oveja, vaca, caballo, camello y primate no humano. En otra realización, la proteína ligante de antígeno no se une a una especie de mono del Nuevo Mundo, tal como un tití.

En otra realización, la proteína ligante de antígeno no presenta unión específica con ninguna proteína presente en la naturaleza que no sea PAR-2. En otra realización, la proteína ligante de antígeno no presenta unión específica con ninguna proteína presente en la naturaleza que no sea PAR-2 de mamífero. En otra realización, la proteína ligante de antígeno no presenta unión específica con ninguna proteína presente en la naturaleza que no sea PAR-2 de primate. En otra realización, la proteína ligante de antígeno no presenta unión específica con ninguna proteína presente en la naturaleza que no sea PAR-2 humano. En otra realización, la proteína ligante de antígeno se une específicamente a PAR-2 de ratón, rata, macaco cangrejero y ser humano. En otra realización, la proteína ligante de antígeno se une específicamente a PAR-2 de ratón, rata, macaco cangrejero y ser humano con una afinidad ligante similar. En otra realización, la proteína ligante de antígeno bloquea la unión de la activación proteolítica de PAR-2 de ratón, rata, macaco cangrejero y ser humano. En otra realización, la proteína ligante de antígeno tiene una IC_{50} similar sobre PAR-2 de ratón, rata, macaco cangrejero y ser humano en un ensayo de movilización de Ca^{2+} .

Se puede determinar la selectividad de una proteína ligante de antígeno hacia un PAR-2 usando métodos bien

conocidos en la técnica y siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, se puede determinar la selectividad usando transferencia Western, FACS, ELISA o RIA.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PAR-2), que tiene una o más de las características siguientes: se une tanto a PAR-2 humano como a PAR-2 murino, inhibe la activación proteolítica de PAR-2 humano, inhibe la activación proteolítica de PAR-2 murino, se une a, o cerca de, el sitio de escisión proteolítica de PAR-2, y causa una infraregulación relativamente pequeña del PAR-2 expresado en la superficie celular.

Se pueden producir fragmentos ligantes de antígeno de proteínas ligantes de antígeno de la invención mediante técnicas convencionales. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab y F(ab')₂.
10 También se contemplan fragmentos y derivados de anticuerpo producidos mediante técnicas de ingeniería genética.

Realizaciones adicionales incluyen anticuerpos químicos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, murinos). Dichos anticuerpos humanizados pueden ser preparados mediante técnicas conocidas y presentan la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando se administran los anticuerpos a seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende el dominio variable de un anticuerpo murino (o todo, o parte de, el sitio ligante de antígenos del mismo) y un dominio constante derivado de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio ligante de antígenos de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de dominio variable (que carece del sitio ligante de antígenos) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales químicos y además manipulados incluyen los descritos en Riechmann et al., 1988, *Nature* 332: 323, Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439, Larrick et al., 1989, *Bio/Technology* 7: 934, y Winter et al., 1993, *TIPS* 14: 139. En una realización, el anticuerpo químico es un anticuerpo con CDR injertado. En, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 10/194.975 (publicada el 27 de febrero de 2003), las Patentes de EE.UU. números 5.869.619, 5.225.539, 5.821.337 y 5.859.205, Padlan et al., 1995, *FASEB J.* 9: 133-39, y Tamura et al., 2000, *J. Immunol.* 164: 1432-41, se discuten técnicas para humanizar anticuerpos.

25 Se han desarrollado procedimientos para generar anticuerpos humanos o parcialmente humanos en animales no humanos. Por ejemplo, se han preparado ratones en que uno o más genes inmunoglobulínicos endógenos han sido inactivados por diversos medios. Se han introducido genes inmunoglobulínicos humanos en los ratones para sustituir a los genes de ratón inactivados. Los anticuerpos producidos en el animal llevan incorporadas cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal. En una realización, se inmuniza un animal no humano, tal como un ratón transgénico, con un polipéptido de PAR-2 para que se generen en el animal anticuerpos dirigidos contra el polipéptido de PAR-2. Un ejemplo de un inmunógeno adecuado es un PAR-2 humano soluble, tal como un polipéptido que comprende el sitio de escisión proteolítica de PAR-2, u otro fragmento inmunogénico de PAR-2. Otro ejemplo de un inmunógeno adecuado es el de células que expresan niveles elevados de PAR-2, o preparaciones de membranas celulares procedentes de aquéllas.

30 35 En las Patentes de EE.UU. números 5.814.318, 5.569.825 y 5.545.806, Davis et al., 2003, *Production of human antibodies from transgenic mice* en "Antibody Engineering: Methods and Protocols", redactado por Lo, Humana Press, New Jersey: 191-200, Kellermann et al., 2002, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 593-97, Russel et al., 2000, *Infect. Immun.* 68: 1820-26, Gallo et al., 2000, *Eur. J. Immun.* 30: 534-40, Davis et al., 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18: 421-25, Green, 1999, *J. Immunol. Methods* 231: 11-23, Jakobovits, 1998, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31: 33-42, Green et al., 1998, *J. Exp. Med.* 188: 483-95, A. Jakobovits, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7: 607-14, Tsuda et al., 1997, *Genomics* 42: 413-21, Mendez et al., 1997, *Nat. Genet.* 15: 146-56, Jakobovits, 1994, *Curr. Biol.* 4: 761-63, Arbones et al., 1994, *Immunity* 1: 247-60, Green et al., 1994, *Nat. Genet.* 7: 13-21, Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362: 255-58, Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-55, J. Chen et al., 1993, *Int. Immunol.* 5: 647-656, Choi et al., 1993, *Nature Genetics* 4: 117-23, Fishwild et al., 1996, *Nat. Biotechnol.* 14: 845-51, Harding et al., 1995, *Ann. NY Acad. Sci.*, Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies* en *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, Lonberg et al., 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93, Neuberger, 1996, *Nat. Biotechnol.* 14: 826, Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research* 20: 6287-95, Taylor et al., 1994, *Int. Immunol.* 6: 579-91, Tomizuka et al., 1997, *Nat. Gen.* 16: 133-43, Tomizuka et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-27, Tuailion et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-24, y Tuailion et al., 1994, *J. Immunol.* 152: 2912-20, se describen ejemplos de técnicas para la producción y el uso de animales transgénicos para la producción de anticuerpos humanos o parcialmente humanos. Estos y otros ejemplos también se discuten en la publicación de solicitud de Patente de EE.UU. 2007-0098715, publicada el 3 de mayo de 2007.

40 45 50 En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a PAR-2. Se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando cualquier técnica conocida en este campo técnico, tal como, por ejemplo, inmortalizando células esplénicas recogidas del animal transgénico tras la compleción del programa de inmunización. Las células esplénicas pueden ser inmortalizadas usando cualquier técnica conocida en este campo técnico, tal como, por ejemplo, fusionándolas con células de mieloma para producir hibridomas. Las células de mieloma para uso en procedimientos de fusión para producir hibridomas son preferiblemente no productoras de

anticuerpo, y presentan una elevada eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que sólo soportan el crecimiento de las células fusionadas deseadas (hibridomas). Los ejemplos de líneas celulares adecuadas para uso en fusiones de ratón incluyen Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; los ejemplos de líneas celulares usadas en fusiones de rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

En una realización, se produce una línea celular de hibridoma al inmunizar un animal (por ejemplo, un animal transgénico que tiene secuencias inmunoglobulínicas humanas) con un inmunógeno de PAR-2; recoger células esplénicas del animal inmunizado; fusionar las células esplénicas recogidas con una línea celular de mieloma, para generar por ello células de hibridoma; establecer líneas celulares de hibridoma a partir de las células de hibridoma; e identificar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une a un polipéptido de PAR-2. Dichas líneas celulares de hibridoma, y los anticuerpos monoclonales anti-PAR-2 por ellas producidos, quedan abarcados por la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma pueden ser purificados usando cualquier técnica conocida en este campo técnico. Se pueden explorar adicionalmente hibridomas o mAbs para identificar mAbs con propiedades particulares, tal como la capacidad para bloquear una actividad inducida por PAR-2. En los ejemplos posteriores se proporcionan ejemplos de dichas exploraciones.

También se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando un procedimiento al que se hace referencia como inmunización genética. Por ejemplo, se puede incorporar un ácido nucleico que codifica el antígeno de interés, a un vector vírico (tal como un vector adenovírico). Luego se utiliza el vector resultante para desarrollar una respuesta inmune contra el antígeno de interés en un animal huésped adecuado [por ejemplo un ratón diabético no obeso, o NOD (del inglés, non-obese diabetic)]. Esta técnica es sustancialmente descrita por Ritter et al., Biodrugs 16 (1): 3-10 (2002), cuya descripción se incorpora a esta memoria por referencia.

Se ha utilizado la evolución molecular de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) en el centro del sitio ligante del anticuerpo, para aislar anticuerpos con una afinidad aumentada, por ejemplo, anticuerpos que tienen una afinidad aumentada por c-erbB-2, como describen Schier et al., 1996, J. Mol. Biol. 263: 551. En consecuencia, tales técnicas son útiles para preparar anticuerpos hacia PAR-2.

Se pueden usar proteínas ligantes de antígeno dirigidas contra un PAR-2 en, por ejemplo, ensayos para detectar la presencia de polipéptidos de PAR-2, sea *in vitro* o sea *in vivo*. Las proteínas ligantes de antígeno pueden ser también empleadas en la purificación de proteínas PAR-2 por cromatografía de inmunofijación. Aquellas proteínas ligantes de antígeno que pueden bloquear además la activación proteolítica de PAR-2 pueden ser usadas para inhibir una actividad biológica que resulta de dicha unión. En los métodos de la presente invención se pueden usar proteínas ligantes de antígeno bloqueantes. Dichas proteínas ligantes de antígeno que actúan como antagonistas de PAR-2 pueden ser empleadas en el tratamiento de cualquier estado inducido por PAR-2, incluyendo, pero sin limitarse a, estados inflamatorios. En una realización, se emplea un anticuerpo monoclonal humano anti-PAR-2, generado mediante procedimientos que implican la inmunización de ratones transgénicos, en el tratamiento de dichos estados.

Se pueden emplear proteínas ligantes de antígeno en un procedimiento *in vitro* o se pueden administrar *in vivo* para inhibir una actividad biológica inducida por PAR-2. De esta manera, se pueden tratar trastornos causados o exacerbados (directa o indirectamente) por la activación proteolítica de PAR-2, ejemplos de los cuales se proporcionan en esta memoria. En una realización, la presente invención proporciona un método terapéutico que comprende la administración *in vivo* de una proteína ligante de antígeno que bloquea PAR-2 a un mamífero que lo necesita, en una cantidad eficaz para reducir una actividad biológica inducida por PAR-2.

Las proteínas ligantes de antígeno de la invención incluyen anticuerpos monoclonales parcialmente humanos y totalmente humanos que inhiben una actividad biológica de PAR-2. Una realización se dirige a un anticuerpo monoclonal humano que bloquea al menos parcialmente la activación proteolítica de PAR-2 humano. En una realización, los anticuerpos se generan al inmunizar un ratón transgénico con un inmunógeno de PAR-2. En otra realización, el inmunógeno es un polipéptido de PAR-2 humano (por ejemplo, un fragmento soluble que comprende todo, o parte de, el sitio de escisión de PAR-2). También se proporcionan en esta memoria líneas celulares de hibridoma derivadas de dichos ratones inmunizados, en donde el hibridoma secreta un anticuerpo monoclonal que se une a PAR-2.

Aunque los anticuerpos humanos, parcialmente humanos o humanizados serán adecuados para muchas aplicaciones, particularmente aquellas en que está implicada la administración del anticuerpo a un sujeto humano. Otros tipos de proteínas ligantes de antígeno serán adecuados para ciertas aplicaciones. Los anticuerpos no humanos de la invención pueden derivar de, por ejemplo, cualquier animal que produzca anticuerpos, tales como un ratón, una rata, un conejo, una cabra, un burro o un primate no humano [tal como un mono (por ejemplo, un macaco

cangrejero o un macaco rhesus) o un simio (por ejemplo, un chimpancé)]. Los anticuerpos no humanos de la invención se pueden usar, por ejemplo, en aplicaciones basadas en cultivos celulares e *in vitro*, o en cualquier otra aplicación donde no se produzca, sea insignificante, se pueda evitar, no sea un asunto de interés o se deseé, una respuesta inmune al anticuerpo de la invención. En una realización, se administra un anticuerpo no humano de la invención a un sujeto no humano. En otra realización, el anticuerpo no humano no provoca una respuesta inmune en el sujeto no humano. En otra realización el anticuerpo no humano es de la misma especie que el sujeto no humano; por ejemplo, se administra un anticuerpo de ratón de la invención a un ratón. Se puede preparar un anticuerpo de una especie concreta, por ejemplo, inmunizando un animal de esa especie con el inmunógeno deseado (por ejemplo, un polipéptido de PAR-2 soluble), o usando un sistema artificial para generar anticuerpos de esa especie (por ejemplo, un sistema basado en presentación en bacterias o fagos para generar anticuerpos de una especie concreta), o convirtiendo un anticuerpo de una especie en un anticuerpo de otra especie al sustituir, por ejemplo, la región constante del anticuerpo por una región constante de la otra especie o al sustituir uno o más restos de aminoácido del anticuerpo para que se parezca más fielmente a la secuencia de un anticuerpo de la otra especie. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo químico que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpos de dos o más especies diferentes.

Se pueden preparar proteínas ligantes de antígeno mediante cualquiera de diversas técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden purificar a partir de células que las expresan naturalmente (por ejemplo, se puede purificar un anticuerpo a partir de un hibridoma que lo produce) o se pueden producir en sistemas de expresión recombinantes, usando cualquier técnica conocida en este campo técnico. Véanse, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, redactado por Kennet et al., Plenum Press, New York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, redactado por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988).

Se puede usar cualquier sistema de expresión conocido en la técnica para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, se transforman células huésped con un vector de expresión recombinante que comprende DNA que codifica un polipéptido deseado. Entre las células huésped que se pueden emplear están procariotes, levaduras y células eucarióticas superiores. Los procariotes incluyen organismos Gram negativos y Gram positivos, tales como, por ejemplo, *E. coli* y bacilos. Las células eucarióticas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células renales de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), y la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular CV1 de riñón de mono verde africano (ATCC CCL 70), como describen McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821. Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985) describen vectores de clonación y expresión apropiados para uso con huéspedes celulares de bacterias, hongos, levaduras y mamíferos.

Las células transformadas pueden ser cultivadas bajo unas condiciones que promuevan la expresión del polipéptido, y el polipéptido puede ser recuperado mediante procedimientos de purificación proteica convencionales. Uno de dichos procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad sobre, por ejemplo, una matriz que tenga todo, o una porción de (por ejemplo, el dominio extracelular), el PAR-2 unido a ella. Los polipéptidos considerados para uso en esta memoria incluyen polipéptidos de anticuerpo recombinante de mamífero anti-PAR-2 sustancialmente homogéneos y sustancialmente exentos de materiales endógenos contaminantes.

Se pueden preparar proteínas ligantes de antígeno, y se pueden explorar en cuanto a propiedades deseadas, mediante cualquiera de diversas técnicas conocidas. Algunas de las técnicas implican aislar un ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica (o una porción de la misma) de una proteína ligante de antígeno de interés (por ejemplo, un anticuerpo anti-PAR-2) y manipular el ácido nucleico por medio de tecnología de DNA recombinante. El ácido nucleico puede ser fusionado con otro ácido nucleico de interés o puede ser alterado (por ejemplo, mediante mutagénesis u otras técnicas convencionales) para, por ejemplo, añadir, suprimir o sustituir uno o más restos de aminoácido.

En un aspecto, la presente invención proporciona fragmentos ligantes de antígeno de un anticuerpo anti-PAR-2 de la invención. Dichos fragmentos pueden consistir totalmente en secuencias derivadas de anticuerpo o pueden comprender secuencias adicionales. Los ejemplos de fragmentos ligantes de antígeno incluyen Fab, F(ab')₂, anticuerpos de cadena única, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos de dominio. En Lunde et al., 2002, Biochem. Soc. Trans. 30: 500-06, se proporcionan otros ejemplos.

Se pueden formar anticuerpos de cadena única al unir fragmentos de dominio variable (región Fv) de cadenas pesadas y ligeras por medio de un puente de aminoácidos (conector peptídico corto), para dar lugar a una sola cadena polipeptídica. Se han preparado dichos Fvs de cadena única (scFvs) al fusionar DNA que codifica un conector peptídico entre DNAs que codifican los dos polipéptidos de dominio variable (V_L y V_H). Los polipéptidos resultantes se pueden plegar sobre sí mismos para formar monómeros ligantes de antígeno, o pueden formar multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros o tetrámeros), dependiendo de la longitud del conector flexible entre los

dos dominios variables (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10: 423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18: 95-108). Al combinar polipéptidos que comprenden V_L y V_H diferentes, se pueden formar scFvs multímeros que se unan a epítopos diferentes (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18: 31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena única incluyen las descritas en la Patente de EE.UU. nº 4.946.778; Bird, 1988, Science 242: 423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879; Ward et al., 1989, Nature 334: 544; y de Graaf et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178: 379-87.

Las proteínas ligantes de antígeno (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo) de la invención pueden comprender cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu humana. En una realización, la región constante de cadena ligera o pesada es un fragmento, derivado, variante o muteína de una región constante presente en la naturaleza.

Se conocen técnicas para obtener un anticuerpo de una subclase o un isotipo diferentes a partir de un anticuerpo de interés, es decir, realizar un cambio de subclase. De esta manera, por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos IgG a partir de un anticuerpo IgM, y viceversa. Dichas técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades ligantes de antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo originario) pero que también presentan propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente del isotipo o subclase del anticuerpo originario. Se pueden emplear técnicas de DNA recombinante. En dichos procedimientos se puede emplear DNA clonado que codifica polipéptidos de anticuerpo particulares, por ejemplo, DNA que codifica el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Véase también Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178: 313-16. Además, si se desea una IgG4, puede ser también deseable introducir una mutación puntual (CPSCP --> CPPCP) en la región bisagra, como se describe en Bloom et al., 1997, Protein Science 6: 407, incorporado en esta memoria por referencia, para aliviar una tendencia a formar enlaces disulfuro intra-cadenas H que puedan conducir a heterogeneidad en los anticuerpos IgG4.

Además, también se conocen técnicas para obtener proteínas ligantes de antígeno que tengan propiedades diferentes (es decir, afinidades variables por el antígeno al cual se unen). Una de dichas técnicas, a la que se hace referencia como "barajadura de cadenas", implica presentar repertorios génicos de dominios variables inmunoglobulínicos en la superficie de un bacteriófago filamentoso, a la que a menudo se hace referencia como "presentación en fagos". Se ha utilizado la barajadura de cadenas para preparar anticuerpos de alta afinidad hacia el hapteno 2-feniloxazol-5-ona, como describen Marks et al., 1992, BioTechnology 10: 779.

En realizaciones particulares, las proteínas ligantes de antígeno de la presente invención tienen una afinidad ligante (K_a) por PAR-2 de al menos 10^6 . En otras realizaciones, las proteínas ligantes de antígeno presentan una K_a de al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} . En otra realización, la proteína ligante de antígeno presenta una K_a sustancialmente igual a la de un anticuerpo descrito en los Ejemplos de esta memoria.

En otra realización, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que tiene una baja velocidad de disociación de PAR-2. En una realización, la proteína ligante de antígeno tiene una K_{off} de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos. En otra realización, la K_{off} es $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos. En otra realización, la K_{off} es sustancialmente la misma que la de un anticuerpo descrito en los Ejemplos de esta memoria. En otra realización, la proteína ligante de antígeno se une a PAR-2 con una K_{off} sustancialmente igual a la de un anticuerpo descrito en los Ejemplos de esta memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que inhibe una actividad de PAR-2, por ejemplo, la movilización de Ca^{2+} . En una realización, la proteína ligante de antígeno tiene una IC_{50} de 1000 nM o menos. En otra realización, la IC_{50} es 100 nM o menos; en otra realización, la IC_{50} es 10 nM o menos. En otra realización, la IC_{50} es sustancialmente la misma que la de un anticuerpo descrito en los Ejemplos de esta memoria. En otra realización, la proteína ligante de antígeno inhibe una actividad de PAR-2 con una IC_{50} sustancialmente igual a la de un anticuerpo descrito en los Ejemplos de esta memoria.

En otra realización, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2 de longitud completa y se une en menor grado a PAR-2 escindido. En diversas realizaciones, la proteína ligante de antígeno se une al PAR-2 de longitud completa al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% y 99,9% más de lo que se une al PAR-2 escindido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que se une a, o cerca de, el sitio de escisión por proteasa del PAR-2 humano. En una realización, una proteína ligante de antígeno se une corriente abajo del sitio de escisión (es decir, se une tanto al PAR-2-Fc amino-terminal de longitud completa como al truncado), mientras que, en otra realización, una proteína ligante de antígeno se une corriente arriba del sitio de escisión (es decir, sólo se une al PAR-2 de longitud completa/Fc). Se pueden preparar proteínas ligantes de

antígeno que se unen al sitio de escisión por proteasa, usando cualquier técnica conocida en este campo técnico. Por ejemplo, dichas proteínas ligantes de antígeno pueden ser aisladas usando el polipéptido de PAR-2 de longitud completa (por ejemplo, en una preparación unido a membranas), un fragmento de dominio extracelular soluble de PAR-2, o un fragmento más pequeño del dominio extracelular de PAR-2 que comprende, o consiste en, el sitio de escisión por proteasa (ejemplos de los cuales se proporcionan en esta memoria). Las proteínas ligantes de antígeno así aisladas pueden ser exploradas para determinar su especificidad de unión usando cualquier método conocido en la técnica (ejemplos de los cuales se proporcionan en esta memoria).

En otra realización, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que compite por unirse a PAR-2 con un anticuerpo descrito en esta memoria. Dicha capacidad competitiva puede ser determinada mediante métodos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por competición en cuanto a unirse a PAR-2/Fc en una transferencia Western (u otro ensayo de base peptídica) o por competición en un ensayo de flujo de Ca^{2+} como el descrito en esta memoria. En un aspecto, una proteína ligante de antígeno que compite por unirse a PAR-2 con un anticuerpo descrito en esta memoria se une al mismo epítopo que el anticuerpo. En otro aspecto, la proteína ligante de antígeno que compite por unirse a PAR-2 con un anticuerpo descrito en esta memoria inhibe la activación proteolítica de PAR-2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2 humano expresado en la superficie de una célula y que, cuando está así unida, inhibe la actividad de señalización de PAR-2 en la célula sin causar una reducción significativa en la cantidad de PAR-2 sobre la superficie de la célula. Se puede utilizar cualquier método para determinar o estimar la cantidad de PAR-2 en la superficie y/o el interior de la célula. En una realización, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que se une a, o cerca de, el sitio de escisión por proteasa de un PAR-2 humano expresado en la superficie de una célula y que, cuando está así unida, inhibe la actividad de señalización de PAR-2 en la célula sin aumentar significativamente el índice de internalización del PAR-2 desde la superficie de la célula. En otras realizaciones, la unión de la proteína ligante de antígeno a la célula que expresa PAR-2 causa que se internalice menos de aproximadamente el 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o 0,1% del PAR-2 de la superficie celular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno que tiene una semivida de al menos un día *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano). En una realización, la proteína ligante de antígeno tiene una semivida de al menos tres días. En otra realización, la proteína ligante de antígeno tiene una semivida de cuatro días o más. En otra realización, la proteína ligante de antígeno tiene una semivida de ocho días o más. En otra realización, la proteína ligante de antígeno es derivatizada o modificada para que tenga una semivida mayor en comparación con la proteína ligante de antígeno no derivatizada o no modificada. En otra realización, la proteína ligante de antígeno contiene una o más mutaciones puntuales para aumentar su semivida en suero, tal como se describe en el documento WO 00/09560, publicado el 24 de febrero de 2000.

La presente invención proporciona además proteínas ligantes de antígeno multiespecíficas, por ejemplo, proteínas ligantes de antígeno biespecíficas, por ejemplo, proteínas ligantes de antígeno que se unen a dos epítopos diferentes de PAR-2, o a un epítopo de PAR-2 y un epítopo de otra molécula, a través de dos sitios o regiones ligantes de antígeno diferentes. Además, una proteína ligante de antígeno biespecífica como la descrita en esta memoria puede comprender un sitio ligante de PAR-2 de uno de los anticuerpos descritos en esta memoria y una segunda región ligante de PAR-2 de otro de los anticuerpos descritos en esta memoria, incluyendo los descritos en esta memoria por referencia a otras publicaciones. Alternativamente, una proteína ligante de antígeno biespecífica puede comprender un sitio ligante de antígeno de uno de los anticuerpos descritos en esta memoria y un segundo sitio ligante de antígeno de otro anticuerpo PAR-2 que es conocido en la técnica, o de un anticuerpo que se prepara mediante métodos conocidos o mediante los métodos descritos en esta memoria.

Se conocen en la técnica y se discuten en la Solicitud de Patente de EE.UU. 09/839.632, presentada el 20 de abril de 2001, numerosos métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Dichos métodos incluyen el uso de hibridomas-híbridos como los descritos por Milstein et al., 1983, *Nature* 305: 537, y otros (Patente de EE.UU. nº 4.474.893 y Patente de EE.UU. nº 6.106.833), y la copulación química de fragmentos de anticuerpo (Brennan et al., 1985, *Science* 229: 81; Glennie et al., 1987, *J. Immunol.* 139: 2367; y Patente de EE.UU. nº 6.010.902). Además, se pueden producir anticuerpos biespecíficos a través de medios recombinantes, por ejemplo, usando componentes de cremalleras de leucina (es decir, de las proteínas Fos y Jun, que forman preferentemente heterodímeros; Kostelnik et al., 1992, *J. Immunol.* 148: 1547) u otras estructuras de dominios interactivos de cerradura y llave como las descritas en la Patente de EE.UU. nº 5.582.996. Técnicas útiles adicionales incluyen las descritas en Kortt et al., 1997, *supra*; la Patente de EE.UU. nº 5.959.083 y la Patente de EE.UU. nº 5.807.706.

En otro aspecto, la proteína ligante de antígeno de la presente invención comprende un derivado de un anticuerpo. El anticuerpo derivatizado puede comprender cualquier molécula o sustancia que imparta una propiedad deseada al anticuerpo, tal como una semivida aumentada en un uso concreto. El anticuerpo derivatizado puede comprender, por ejemplo, un componente detectable (o de etiquetado) {por ejemplo, una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, un glóbulo detectable [tal como un glóbulo magnético o electrodenso (por ejemplo, oro)], o

una molécula que se une a otra molécula (por ejemplo, biotina o estreptavidina)}, un componente terapéutico o diagnóstico (por ejemplo, un componente radiactivo, citotóxico o farmacéuticamente activo), o una molécula que aumenta la idoneidad del anticuerpo para un uso concreto (por ejemplo, la administración a un sujeto, tal como un sujeto humano, u otros usos *in vivo* o *in vitro*). Los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar para derivatizar un anticuerpo incluyen albúmina (por ejemplo, albúmina sérica humana) y polietilenglicol (PEG). Se pueden preparar derivados unidos a albúmina y PEGilados de anticuerpos usando técnicas bien conocidas en este campo técnico. En una realización, el anticuerpo es conjugado con, o de otro modo unido a, transtirretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o variante de TTR puede ser químicamente modificada con, por ejemplo, un producto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(N-vinilpirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de polí(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxietilados y polí(alcoholes vinílicos) (Solicitud de Patente de EE.UU. nº 20030195154).

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de exploración para una molécula que se une a PAR-2, usando las proteínas ligantes de antígeno de la presente invención. Se puede utilizar cualquier técnica de exploración adecuada. En una realización, se pone en contacto una molécula de PAR-2, o un fragmento de la misma al cual se une una proteína ligante de antígeno de la presente invención, con la proteína ligante de antígeno de la invención y con otra molécula, en donde la otra molécula se une a PAR-2 si reduce la unión de la proteína ligante de antígeno a PAR-2. La unión de la proteína ligante de antígeno puede ser detectada usando cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, un ELISA. La detección de la unión de la proteína ligante de antígeno a PAR-2 puede ser simplificada al etiquetar detectablemente la proteína ligante de antígeno, como se discutió anteriormente. En otra realización, la molécula ligante de PAR-2 es adicionalmente analizada para determinar si inhibe la activación y/o señalización de PAR-2.

Ácidos nucleicos

En un aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas. Los ácidos nucleicos comprenden, por ejemplo, polinucleótidos que codifican toda, o parte de, una proteína ligante de antígeno, tal como, por ejemplo, una o ambas cadenas de un anticuerpo de la invención, o un fragmento, derivado, mutéína o variante de la misma, polinucleótidos suficientes para uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para identificar, analizar, mutar o multiplicar un polinucleótido que codifica un polipéptido, ácidos nucleicos antisentido para inhibir la expresión de un polinucleótido, y secuencias complementarias de los precedentes. Los ácidos nucleicos pueden tener cualquier longitud. Pueden tener una longitud de, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1500, 3000, 5000 o más nucleótidos, y/o pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias reguladoras, y/o ser parte de un ácido nucleico más grande, por ejemplo, un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o cadena doble y pueden comprender nucleótidos de RNA y/o DNA, y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos).

Se pueden aislar ácidos nucleicos que codifiquen polipéptidos de anticuerpo (por ejemplo, una cadena pesada o ligera, sólo un dominio variable, o la longitud completa), a partir de células B de ratones que hayan sido inmunizados con PAR-2. El ácido nucleico puede ser aislado mediante procedimientos convencionales, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction).

La invención proporciona además ácidos nucleicos que se hibridan con otros ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación particulares. Los métodos para hibridar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York (1989), 6.3.1-6.3.6. Como se define en esta memoria, en una condición de hibridación moderadamente rigurosa se usa una disolución de lavado que contiene cloruro sódico/citrato sódico (SSC) 5X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH de 8,0), tampón de hibridación de formamida a aproximadamente el 50%, SSC 6X, y una temperatura de hibridación de 55 °C (u otras disoluciones de hibridación similares, tal como una que contiene formamida a aproximadamente el 50%, con una temperatura de hibridación de 42 °C), y unas condiciones de lavado de 60 °C en SSC 0,5X, SDS al 0,1%. En una condición de hibridación rigurosa se hibrida en SSC 6X a 45 °C, lo que va seguido de uno o más lavados en SSC 0,1X, SDS al 0,2%, a 68 °C. Además, quien tiene experiencia en la técnica puede manipular las condiciones de hibridación y/o lavado para aumentar o disminuir el rigor de la hibridación de modo que los ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que tienen una identidad de al menos 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99% entre sí permanezcan típicamente hibridados entre sí. Los parámetros básicos que afectan a la elección de las condiciones de hibridación y las directrices para idear condiciones adecuadas son expuestos, por ejemplo, por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, capítulos 9 y 11), y Ausubel et al. (redactores) ("Current Protocols in Molecular Biology", 1995, John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4), y pueden ser fácilmente determinados por quienes tienen una experiencia normal en la técnica basándose en, por ejemplo, la longitud y/o la composición de bases del DNA.

Se pueden introducir cambios por mutación en un ácido nucleico, lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, una proteína ligante de antígeno) que codifica. Se pueden introducir

5 mutaciones usando cualquier técnica conocida en este campo técnico. En una realización, se cambian uno o más restos de aminoácido concretos usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigida al sitio. En otra realización, se cambian uno o más restos aleatoriamente seleccionados usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis aleatoria. De cualquier modo que se haga, se puede expresar un polipéptido mutante y se puede explorar en cuanto a una propiedad deseada (por ejemplo, la unión a PAR-2 o el bloqueo de la activación proteolítica de PAR-2).

10 Se pueden introducir mutaciones en un ácido nucleico sin alterar significativamente la actividad biológica de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos que conduzcan a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácido no esenciales. En una realización, una secuencia de nucleótidos, o un fragmento, variante o derivado deseado de la misma, es mutada de modo que codifique una secuencia de aminoácidos que comprenda una o más supresiones o sustituciones de restos de aminoácido. En otra realización, la mutagénesis permite insertar un aminoácido adyacente a uno o más restos de aminoácido. Alternativamente, se pueden introducir una o más mutaciones en un ácido nucleico que cambien selectivamente la actividad biológica (por ejemplo, la unión de PAR-2, la inhibición de la activación proteolítica de PAR-2, etcétera) de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, la mutación puede cambiar cuantitativa o cualitativamente la actividad biológica. Los ejemplos de cambios cuantitativos incluyen aumentar, reducir o eliminar la actividad. Los ejemplos de cambios cualitativos incluyen cambiar la especificidad antigénica de una proteína ligante de antígeno.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que son adecuadas para uso como cebadores o sondas de hibridación para la detección de secuencias de ácido nucleico de la invención. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender sólo una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa de la invención, por ejemplo, un fragmento que pueda ser utilizado como una sonda o cebador o un fragmento que codifique una porción activa (por ejemplo, una porción ligante de PAR-2) de un polipéptido de la invención.

20 Se pueden usar sondas basadas en la secuencia de un ácido nucleico de la invención para detectar el ácido nucleico o ácidos nucleicos similares, por ejemplo, transcritos que codifican un polipéptido de la invención. La sonda puede comprender un grupo etiqueta, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas pueden ser utilizadas para identificar una célula que expresa el polipéptido.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o una porción del mismo. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores víricos, vectores no episomales de mamífero y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes.

30 Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped que se van a utilizar para la expresión, que están operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Las secuencias reguladoras incluyen aquéllas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped (por ejemplo, el potenciador génico precoz del SV40, el promotor del virus del sarcoma de Rous y el promotor del citomegalovirus), aquéllas que sólo dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras tisularmente específicas; véanse Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11: 287, y Maniatis et al., 1987, Science 236: 1237, incorporados en sus totalidades por referencia en esta memoria), y aquéllas que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en respuesta a un tratamiento o un estado particulares [por ejemplo, el promotor de metalotioneína en células de mamífero y el promotor sensible a tet y/o sensible a estreptomicina en sistemas tanto procarióticos como eucarióticos (véase *id.*). Quienes tienen experiencia en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células huésped para producir por ello proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como los descritos en esta memoria.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariótica (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariótica [por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero (por ejemplo, células CHO)]. Se puede introducir un DNA vector en células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas de transformación o transfección convencionales. Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizados, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el DNA extraño en su genoma. Con objeto de identificar y seleccionar estos productos de integración, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para resistencia a antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato). Las células establemente

transfectadas con el ácido nucleico introducido pueden ser identificadas mediante selección con fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán), entre otros métodos.

Indicaciones

5 Se describen métodos para tratar a un sujeto. El método puede tener, por ejemplo, un efecto generalmente saludable sobre el sujeto; por ejemplo, puede aumentar la esperada longevidad del sujeto. Alternativamente, el método puede, por ejemplo, servir para tratar, prevenir, curar, aliviar o mejorar ("tratar") una enfermedad, trastorno, estado o mal ("un estado"). Entre los estados que se van a tratar de acuerdo con la presente invención están los estados caracterizados por una inapropiada expresión o actividad de PAR-2. En algunos de dichos estados, el nivel 10 de expresión o actividad es demasiado elevado y el tratamiento comprende administrar un antagonista de PAR-2 como el descrito en esta memoria.

Las enfermedades y estados médicos específicos que son tratables o prevenibles con las proteínas ligantes de antígeno de esta invención incluyen estados inflamatorios del sistema gastrointestinal, incluyendo enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, gastroparesia idiopática, pancreatitis, incluyendo pancreatitis crónica, 15 enfermedad inflamatoria intestinal y úlceras, incluyendo úlceras gástricas y duodenales. Las proteínas ligantes de antígeno de esta invención son también útiles para tratar o mejorar estados inflamatorios de las vías aéreas, tales como asma (incluyendo asmas extrínseca e intrínseca así como estados inflamatorios crónicos relacionados, o hipersensibilidad, de las vías aéreas), enfermedad pulmonar obstructiva crónica [COPD (del inglés, *chronic 20 obstructive pulmonary disease*), es decir, bronquitis crónica, enfisema], síndrome de trastorno respiratorio agudo (ARDS; del inglés, *acute respiratory disorder syndrome*), síndrome de insuficiencia respiratoria, fibrosis quística, hipertensión pulmonar, vasoconstricción pulmonar, lesión pulmonar aguda, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinófila, bronquitis, bronquiectasia por bronquitis alérgica, tuberculosis, 25 neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, trastornos de tipo asmático, sarcoidosis, síndrome de enfermedad (o disfunción) reactiva de las vías aéreas, bisinosis, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinófilo, rinitis, sinusitis, enfermedad pulmonar parasitaria, e hipersensibilidad de las vías aéreas asociada 30 con estados víricamente inducidos [por ejemplo, por virus respiratorio sincitial (RSV; del inglés, *respiratory syncytial virus*), parainfluenzavirus (PIV), rinovirus (RV) y adenovirus].

Los trastornos reumáticos que son tratables con las proteínas ligantes de antígeno de esta invención incluyen artritis reumatoide adulta y juvenil, esclerodermia, lupus sistémico eritematoso, síndromes de tipo lupus, enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo, gota, osteoartritis, polimialgia reumática, espondiloartropatías seronegativas, 35 incluyendo espondilitis anquilosante y enfermedad de Reiter, artritis psoriásica, y artritis crónica de Lyme. La enfermedad de Still y la uveítis asociada con artritis reumatoide son también tratables o prevenibles con estos polipéptidos. Además, las terapias polipeptídicas de la invención se usan para tratar trastornos que dan lugar a inflamación del músculo voluntario y otros músculos, incluyendo dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, 40 polimiositis y linfangioleiomomatosis. Otros trastornos son también tratables con la presente invención, incluyendo la enfermedad de Guillain-Barre, la diabetes mellitus de tipo I, la enfermedad de Graves, la enfermedad de Addison, el fenómeno de Raynaud (incluyendo la enfermedad de Raynaud y el síndrome de Raynaud), la hepatitis autoinmune, la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD; del inglés, *graft versus host disease*), y similares.

45 Los trastornos descritos en esta memoria pueden ser tratados con las proteínas ligantes de antígeno de esta invención en combinación con otras citocinas, inhibidores citocínicos y reactivos (a los que también se hace referencia en esta memoria como inmunomoduladores). Por ejemplo, los inmunomoduladores incluyen antagonistas de IL-18 tales como el receptor soluble de IL-18, anticuerpos contra IL-18 o el receptor de IL-18, y proteína ligante de IL-18; inhibidores de TNF, incluyendo ENBREL®; inhibidores de IL-1, incluyendo formas solubles de IL-1R de tipo I, IL-1R de tipo II, anticuerpos contra IL-1 y anticuerpos contra IL-1R de tipo I; y otros agentes activos que son eficaces en el tratamiento de las enfermedades y estados médicos descritos.

50 Las composiciones y/o métodos de la presente invención se pueden también utilizar, por ejemplo, en tratamientos cosméticos, en tratamientos veterinarios, para aumentar la longevidad, para tratar de efectos reproductivos, y para tratar una diversidad de trastornos relacionados con PAR-2. Además, en algunos de dichos estados, el nivel de expresión o actividad de PAR-2 es demasiado bajo y el tratamiento comprende administrar un agonista de PAR-2; dichos tratamientos están también comprendidos en esta memoria.

Métodos terapéuticos y administración de proteínas ligantes de antígeno

Ciertos métodos proporcionados en esta memoria comprenden administrar una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2 a un sujeto, reduciendo por ello una respuesta biológica inducida por PAR-2 que desempeña una función en un estado particular. En realizaciones particulares, los métodos de la invención implican poner PAR-2 55 endógeno en contacto con una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2, por ejemplo, por medio de la administración a un sujeto o en un procedimiento *ex vivo*.

El término "tratamiento" abarca el alivio o la prevención de al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno, o la reducción de la gravedad de una enfermedad, y similares. No es necesario que una proteína ligante de antígeno efectúe una curación completa, ni que erradique todos los síntomas o manifestaciones de una enfermedad, para que constituya un agente terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado morboso dado, pero no es necesario que supriman toda manifestación de la enfermedad para que sean considerados agentes terapéuticos útiles. Similarmente, no es necesario que un tratamiento profilácticamente administrado sea completamente eficaz en cuanto a prevenir el inicio de un estado para que constituya un agente profiláctico viable. Basta simplemente con reducir el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o la gravedad de sus síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso) o reducir la probabilidad de que la enfermedad aparezca o empeore en un sujeto. Una realización de la invención se dirige a un método que comprende administrar a un paciente un antagonista de PAR-2 en una cantidad y durante un tiempo suficientes para provocar una mejora ininterrumpida con respecto a la línea de base de un indicador que refleja la gravedad del trastorno concreto.

Como se entiende en el campo pertinente, se administran composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención a un sujeto de un modo apropiado a la indicación. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a, parenteral y tópicamente, y por inhalación. Si se inyecta, la composición farmacéutica se puede administrar, por ejemplo, por las vías intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal y subcutánea, mediante la inyección de bolos o mediante infusión continua. Se contempla la administración localizada, por ejemplo, en un sitio de una enfermedad o lesión, como se contemplan la distribución transdérmica y la liberación ininterrumpida desde implantes. La distribución por inhalación incluye, por ejemplo, la inhalación nasal u oral, el uso de un nebulizador, la inhalación del antagonista en forma de aerosol, y similares. Otras alternativas incluyen gotas oculares; preparaciones orales, incluyendo píldoras, jarabes, pastillas y chicles; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, composiciones pulverizables y ungüentos.

25 También se contempla el uso de proteínas ligantes de antígeno en procedimientos *ex vivo*. Por ejemplo, se puede poner la sangre u otro fluido corporal de un paciente en contacto con una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2 *ex vivo*. La proteína ligante de antígeno puede estar unida a una matriz insoluble o un material de soporte sólido adecuados.

30 De forma ventajosa, las proteínas ligantes de antígeno se administran en forma de una composición que comprende uno o más componentes adicionales, tal como un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende además uno o más agentes fisiológicamente activos, por ejemplo, una segunda sustancia que inhibe la inflamación o la respuesta inmune, una sustancia anti-angiogénica, una sustancia analgésica, etc., ejemplos no exclusivos de los cuales se proporcionan en esta memoria. En diversas realizaciones particulares, la composición comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes fisiológicamente activos además de una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2.

35 En una realización, la composición farmacéutica comprende una proteína ligante de antígeno de la invención junto con una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un tampón, un antioxidante tal como ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tal como aquellos que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, un aminoácido, un carbohidrato tal como glucosa, sacarosa o dextrinas, un agente quelante tal como EDTA, glutatión, un estabilizante y un excipiente. La disolución salina tamponada neutra y la disolución salina mezclada con albúmina sérica de la misma especie son ejemplos de diluyentes apropiados. De acuerdo con normas industriales apropiadas, también se pueden añadir conservantes tales como el alcohol bencílico. La composición puede ser formulada como un producto de liofilización usando apropiadas disoluciones de excipiente (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Los componentes adecuados son atóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición (1980) y 20^a edición (2000), Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, se presentan más ejemplos de componentes que se pueden emplear en formulaciones farmacéuticas.

40 Los kits para uso por facultativos incluyen una sustancia inhibidora de PAR-2 de la invención y un prospecto u otras instrucciones para uso en el tratamiento de cualquiera de los estados discutidos en esta memoria. En una realización, el kit incluye una preparación estéril de una o más proteínas ligantes de antígeno que se unen a PAR-2, que puede estar en forma de una composición como la anteriormente descrita, y puede estar en uno o más viales.

45 Las dosis y la frecuencia de administración pueden variar de acuerdo con factores tales como la vía de administración, las proteínas ligantes de antígeno particulares empleadas, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se va a tratar, si el estado es agudo o crónico, y el tamaño y el estado general del sujeto. Las dosis apropiadas se pueden determinar mediante procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo, en pruebas clínicas que pueden implicar estudios de elevación de dosis.

50 Se puede administrar una sustancia inhibidora de PAR-2 de la invención, por ejemplo, una vez o más de una vez,

por ejemplo, a intervalos regulares durante un periodo de tiempo. En realizaciones particulares, se administra una proteína ligante de antígeno durante un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo, durante uno, dos o tres meses o incluso indefinidamente. Para tratar estados crónicos, el tratamiento de larga duración es generalmente el más eficaz. Sin embargo, para tratar estados agudos, puede bastar la administración durante periodos más cortos, 5 por ejemplo, de una a seis semanas. En general, la proteína ligante de antígeno se administra hasta que el paciente manifiesta un grado médicalemente relevante de mejora con respecto a la línea de base del indicador o los indicadores elegidos.

Realizaciones particulares de la presente invención implican administrar una proteína ligante de antígeno en una dosis de aproximadamente 1 ng de proteína ligante de antígeno por kg de peso del sujeto al día ("1 ng/kg/día") a 10 aproximadamente 10 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 500 ng/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 µg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, a un sujeto. En realizaciones adicionales, se administra una proteína ligante de antígeno a adultos una vez a la semana, dos veces a la semana, o tres veces o más a la semana, para tratar una enfermedad, estado o trastorno mediado por PAR-2, por ejemplo, un trastorno médico descrito en esta memoria. Si se inyecta, la cantidad eficaz de proteína 15 ligante de antígeno por dosis de adulto puede estar en el intervalo de 1-20 mg/m², y preferiblemente es aproximadamente 5-12 mg/m². Alternativamente, se puede administrar una dosis fija; la cantidad puede estar en el intervalo de 5-100 mg/dosis. Un intervalo para una dosis fija es aproximadamente 20-30 mg por dosis. En una realización de la invención, se administra repetidamente una dosis fija de 25 mg/dosis por inyección. Si se utiliza una 20 vía de administración distinta de la inyección, la dosis es apropiadamente ajustada de acuerdo con prácticas médicas estándares. Un ejemplo de un régimen terapéutico implica inyectar una dosis de aproximadamente 20-30 mg de proteína ligante de antígeno de una a tres veces a la semana durante un periodo de al menos tres semanas, aunque puede ser necesario un tratamiento durante períodos más prolongados para provocar el grado deseado de 25 mejora. Para sujetos pediátricos (4-17 años de edad), un régimen adecuado ejemplar implica la inyección subcutánea de 0,4 mg/kg, hasta una dosis máxima de 25 mg de proteína ligante de antígeno administrados dos o tres veces a la semana.

Realizaciones particulares de los métodos proporcionados en esta memoria implican la inyección subcutánea de 0,5 mg a 10 mg, preferiblemente de 3 a 5 mg, de una proteína ligante de antígeno, una o dos veces a la semana. Otra realización se dirige a la administración pulmonar (por ejemplo, mediante un nebulizador) de 3 mg o más de proteína ligante de antígeno una vez a la semana.

30 Los ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en esta memoria comprenden la inyección subcutánea de una proteína ligante de antígeno una vez a la semana, en una dosis de 1,5 a 3 mg, para tratar un estado en que la señalización de PAR-2 desempeña un papel. En esta memoria se proporcionan ejemplos de dichos estados, que incluyen, por ejemplo, estados reumáticos como los previamente descritos y otros estados en que una inflamación excesiva desempeña un papel (descritos en esta memoria; por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, 35 pancreatitis, etc.). Se continúa la administración semanal de proteína ligante de antígeno hasta que se alcanza un resultado deseado, por ejemplo, la remisión de síntomas del sujeto. Se puede reanudar el tratamiento cuando sea necesario o, alternativamente, se pueden administrar dosis de mantenimiento.

Otros ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en esta memoria comprenden la administración 40 subcutánea o intravenosa de una dosis de 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 o 20 miligramos de inhibidor de PAR-2 de la presente invención por kilogramo de masa corporal del sujeto (mg/kg). La dosis se puede administrar una vez al sujeto o más de una vez con un cierto intervalo, por ejemplo, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, tres veces al mes, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses, o una vez al año. La duración del tratamiento y cualesquier cambios 45 en la dosis y/o la frecuencia del tratamiento se pueden alterar o variar durante el curso del tratamiento con objeto de satisfacer las necesidades concretas del sujeto.

En otra realización, se administra una proteína ligante de antígeno al sujeto en una cantidad y durante un tiempo suficientes para provocar una mejora, preferiblemente una mejora ininterrumpida, en al menos un indicador que 50 refleja la gravedad del trastorno que se está tratando. Se pueden evaluar diversos indicadores que reflejan el grado del mal, la enfermedad o el estado del sujeto, para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. Dichos indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores clínicamente reconocidos de gravedad de enfermedad, síntomas, o manifestaciones del trastorno en cuestión. En una realización se considera que una mejora es ininterrumpida si el sujeto presenta la mejora en al menos dos ocasiones separadas por un periodo de dos a cuatro semanas. El grado de mejora es generalmente determinado por un médico, quien puede hacer esta determinación basándose en signos, síntomas, biopsias u otros resultados de ensayos, y quien puede emplear además cuestionarios que se administran al sujeto, tales como cuestionarios de calidad de vida desarrollados para una enfermedad dada.

Unos niveles elevados de PAR-2 y/o activación de PAR-2 se asocian con diversos trastornos que incluyen, por ejemplo, estados inflamatorios de la piel, las articulaciones, el sistema gastrointestinal y/o las vías aéreas. Los

5 sujetos con un trastorno dado pueden ser examinados para identificar aquellos individuos que tienen una activación de PAR-2 elevada, identificándose por ello los sujetos que más se pueden beneficiar del tratamiento con una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2. De esta manera, los métodos de tratamiento proporcionados en esta memoria comprenden opcionalmente una primera operación de medir los niveles de activación de PAR-2 de un sujeto. Se puede administrar una proteína ligante de antígeno a un sujeto en quien la activación de PAR-2 está elevada por encima de lo normal.

10 Se pueden controlar los niveles de actividad de PAR-2 de un sujeto antes, durante y/o después del tratamiento con una proteína ligante de antígeno, para detectar cambios, si los hubiera, en la actividad de PAR-2. Para algunos trastornos, la incidencia de una actividad de PAR-2 elevada puede variar de acuerdo con factores tales como la fase 15 de la enfermedad o la forma concreta de la enfermedad. Se pueden emplear técnicas conocidas para medir la actividad de PAR-2 en, por ejemplo, muestras de suero, sangre o tejido de un sujeto. La actividad de PAR-2 se puede medir usando cualquier técnica adecuada.

15 Realizaciones particulares de métodos y composiciones de la invención implican el uso de una proteína ligante de antígeno y uno o más antagonistas de PAR-2 adicionales, por ejemplo, dos o más proteínas ligantes de antígeno de la invención, o una proteína ligante de antígeno de la invención y uno o más antagonistas de PAR-2 distintos. En otras realizaciones, la proteína ligante de antígeno se administra sola o en combinación con otros agentes útiles 20 para tratar el estado que afecta al paciente. Los ejemplos de tales agentes incluyen fármacos proteicos y no proteicos. Cuando se coadministran múltiples compuestos terapéuticos, se pueden ajustar las dosis en consecuencia, como es reconocido en la técnica pertinente. La "coadministración" y la terapia de combinación no se limitan a la administración simultánea sino que también incluyen regímenes de tratamiento en que se administra una proteína ligante de antígeno al menos una vez durante el curso de un tratamiento que implica administrar al menos un agente terapéutico distinto al paciente.

25 Los ejemplos de otros agentes que se pueden coadministrar con una proteína ligante de antígeno son otras proteínas ligantes de antígeno o polipéptidos terapéuticos que se eligen de acuerdo con el estado concreto que se va a tratar. Alternativamente, se pueden coadministrar fármacos no proteicos que sean útiles en el tratamiento de uno de los estados particulares anteriormente discutidos, con un antagonista de PAR-2.

Terapia de combinación

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto con una proteína ligante de antígeno que inhibe PAR-2, y uno o más tratamientos distintos. En una realización, dicha terapia de combinación consigue sinergia o un efecto aditivo al, por ejemplo, atacar múltiples sitios o dianas moleculares de un tumor. Los tipos de terapias de combinación que se pueden utilizar en relación con la presente invención incluyen inhibir o 35 activar (según sea apropiado) múltiples centros de una sola vía relacionada con la enfermedad, múltiples vías en una célula diana y múltiples tipos celulares dentro de un tejido diana.

35 En otra realización, un método de terapia de combinación comprende administrar al sujeto dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los agonistas o antagonistas de PAR-2 descritos en esta memoria. En otra realización, el método comprende administrar al sujeto dos o más tratamientos que inhiben o activan conjuntamente (directa o indirectamente) la transducción de señales mediada por PAR-2. Los ejemplos de dichos métodos incluyen utilizar combinaciones de dos o más proteínas ligantes de antígeno que inhiben PAR-2, de una proteína ligante de antígeno que inhibe PAR-2 y uno o más componentes terapéuticos distintos que tienen propiedades antiinflamatorias (por 40 ejemplo, agentes antiinflamatorios no esteroideos, esteroideos y/o inmunomoduladores), o de una proteína ligante de antígeno que inhibe PAR-2 y uno o más tratamientos distintos (por ejemplo, cirugía, ultrasonidos, o un tratamiento eficaz para reducir la inflamación). Además, se pueden usar uno o más anticuerpos o derivados de anticuerpo anti-PAR-2 en combinación con una o más moléculas u otros tratamientos, en donde la(s) otra(s) molécula(s) y/o tratamiento(s) no se une(n) o afecta(n) directamente a PAR-2, combinación que sin embargo es eficaz para tratar o 45 prevenir el estado que se trata. En una realización, una o más de las moléculas y/o tratamientos tratan o evitan un estado que es causado por una o más de las otras moléculas o tratamientos en el curso de la terapia, por ejemplo, náuseas, fatiga, alopecia, caquexia, insomnio, etc. En todos los casos en que se usa una combinación de moléculas y/o otros tratamientos, la(s) molécula(s) y/o el(los) tratamiento(s) individuales se pueden administrar en cualquier orden, durante cualquier período de tiempo, que sea eficaz, por ejemplo, simultánea, consecutiva o alternativamente. En una realización, el método de tratamiento comprende completar un primer curso de tratamiento 50 con una molécula u otro tratamiento antes de comenzar un segundo curso de tratamiento. El período de tiempo entre el final del primer curso de tratamiento y el comienzo del segundo curso de tratamiento puede ser cualquier período de tiempo que permita que el curso total de la terapia sea eficaz, tal como, por ejemplo, segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años.

55 En otra realización, el método comprende administrar uno o más de los antagonistas de PAR-2 descritos en esta memoria y uno o más tratamientos distintos (por ejemplo, un tratamiento terapéutico o paliativo). Cuando un método comprende administrar más de un tratamiento a un sujeto, se entiende que el orden, la regulación temporal, el

número, la concentración y el volumen de las administraciones están solo limitados por los requisitos médicos y las limitaciones del tratamiento; es decir, se pueden administrar dos tratamientos al sujeto, por ejemplo, simultánea, consecutiva o alternativamente o de acuerdo con cualquier otro régimen.

5 Los ejemplos siguientes, tanto reales como de predicción, se proporcionan con el fin de ilustrar realizaciones o características específicas de la presente invención y no limitan su alcance.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos monoclonales

Se llevan a cabo inmunizaciones usando una o más formas adecuadas de antígeno PAR-2, incluyendo péptido soluble de PAR-2 [un péptido del bucle 1 de PAR-2 (TNRSSKGRSLIGKVDGTS; aminoácidos 29 a 46 de la ID. SEC. nº 2), que tiene un resto de cisteína C-terminal adicional para facilitar la conjugación, conjugado con hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH; del inglés, keyhole limpet hemocyanin; obtenible, por ejemplo, de Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois) activada con maleimida], una proteína de fusión de PAR-2/Fc, y PAR-2 unido a células (por ejemplo, transfectantes de CHO que expresan PAR-2 humano en la superficie celular, obtenibles al transfectar células CHO con cDNA humano de PAR-2 de longitud completa que codifica un polipéptido de ID. SEC. nº 2), o combinaciones de los mismos.

10 15 Se usa una cantidad adecuada de inmunógeno (es decir, diez microgramos/ratón de PAR-2 soluble o 3×10^6 células/ratón de células CHO transfectadas) para la inmunización inicial en XenoMouse™ de acuerdo con los métodos descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996, y las Solicitudes de Patente Internacional números WO 98/24893, presentada el 11 de junio de 1998, y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Después de la inmunización inicial, se administran subsiguientes 20 inmunizaciones de refuerzo con inmunógeno (cinco μ g/ratón de PAR-2 soluble o 1.5×10^6 células transfectadas con PAR-2/ratón) siguiendo un programa y durante el tiempo necesario para provocar un título adecuado de anticuerpo anti-PAR-2 en los ratones. Se determinan los títulos mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, un inmunoensayo enzimático o una separación de células activadas por fluorescencia, o mediante otros métodos (incluyendo combinaciones de los mismos).

25 30 35 Se identifican los animales que presentan títulos adecuados, y se obtienen linfocitos de ganglios linfáticos de drenaje y, si es necesario, se reúnen para cada cohorte. Los linfocitos pueden ser disociados del tejido linfoide por trituración en un medio adecuado [por ejemplo, medio Eagle modificado de Dulbecco, DMEM (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium), obtenible de Invitrogen, Carlsbad, California] para liberar las células de los tejidos, y pueden ser suspendidos en DMEM. Se pueden seleccionar y/o multiplicar células B usando un método adecuado, y se pueden fusionar con una pareja de fusión adecuada, por ejemplo, células de mieloma P3X63Ag8.653 no secretor (American Type Culture Collection CRL 1580; Kearney et al., J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550), usando técnicas que son conocidas en este campo técnico.

40 45 50 En un método de fusión adecuado, se mezclan linfocitos con parejas celulares de fusión en una relación de 1:4. Se recoge la mezcla de células como sedimento de una centrifugación suave a $400 \times g$ durante 4 minutos, se separa el sobrenadante por decantación y se mezcla suavemente la mezcla de células (por ejemplo, usando una pipeta de 1 ml de capacidad). Se induce la fusión con PEG/DMSO (polietilenglicol/dimetilsulfóxido; obtenible de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri; 1 ml por millón de linfocitos). Se añade lentamente PEG/DMSO con agitación suave a lo largo de un minuto, seguido de un minuto de mezclamiento. Luego se añade IDMEM (DMEM sin glutamina; 2 ml por millón de células B) a lo largo de 2 minutos con agitación suave, seguido de IDMEM adicional (8 ml por millón de células B) que se añade a lo largo de 3 minutos.

45 50 55 Las células fusionadas son recogidas como sedimento de una centrifugación suave ($400 \times g$, 6 minutos) y son resuspendidas en 20 ml de medio de selección [por ejemplo, DMEM que contiene azaserina e hipoxantina (HA) y otros materiales complementarios según sea necesario] por millón de células B. Las células son incubadas durante 20-30 minutos a $37^{\circ}C$ y son luego resuspendidas en 200 ml de medio de selección y cultivadas durante tres a cuatro días en matraces T175 antes de ser sembradas en placas de 96 pocillos.

Las células se distribuyen en placas de 96 pocillos usando técnicas estándares para maximizar la capacidad de las colonias resultantes para ser clonadas. Después de varios días de cultivo, los sobrenadantes son recogidos y son sometidos a ensayos de exploración del modo detallado en los ejemplos posteriores, incluyendo la confirmación de la unión a PAR-2 humano, la evaluación de la reactividad cruzada con PAR-2 de otras especies (por ejemplo, PAR-2 de macaco cangrejero y/o PAR-2 murino), unión a PAR-2 escindido frente a PAR-2 no escindido, y capacidad para inhibir la activación proteolítica de PAR-2. Las células positivas son adicionalmente seleccionadas y sometidas a técnicas de clonación y subclonación estándares. Se pueden multiplicar las líneas clonales *in vitro* o *in vivo*, y se pueden obtener los anticuerpos humanos secretados para su análisis.

55 Los clones de hibridoma así generados son explorados en cuanto a reactividad con PAR-2. En la exploración inicial de los sobrenadantes de hibridomas se puede utilizar un ELISA para péptidos, un ELISA para células completas y/o un ensayo de base celular adecuado para exploración de alto rendimiento [tecnología de ensayo fluorométrico en

microvolúmenes o FMAT (del inglés, fluorometric microvolume assay technology), sustancialmente del modo descrito por Fischella et al., *Nature Biotechnology* 21: 302-307, 2003). Los hibridomas que son positivos en este método de exploración pueden ser adicionalmente cultivados para obtener mayores cantidades de anticuerpo, el cual puede ser luego purificado del modo descrito más adelante y ser explorado mediante un(os) ensayo(s) de base celular adicional(es) (por ejemplo, un ensayo de resolución rápida en placa usando células que coexpresan apoaequorina, una fotoproteína sensible al Ca^{2+} , sustancialmente del modo descrito por Le Poul et al., *J. Biomol. Screen.* 7 (1): 57-65, 2002, y PAR-2) o un ensayo con un lector de placas mediante obtención de imágenes fluorométricas (FLIPR; del inglés, fluorometric imaging plate reader), que se utiliza para determinar cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, sustancialmente del modo descrito por S. Pitchford, *Genetic Engineering News*, volumen 18, número 15 (1998), y/o Sullivan et al., *Methods in Molecular Biology*, volumen 114, páginas 125-133 (1999).

De esta manera, se inmunizaron ratones con PAR-2 soluble, células que expresan PAR-2, o la proteína PAR-2/Fc, para un total de 19 o 20 inmunizaciones a lo largo de un periodo de aproximadamente dos meses – dos meses y medio. Se obtuvieron varias líneas celulares que secretaban anticuerpos específicos para PAR-2 y se caracterizaron adicionalmente los anticuerpos. Las secuencias de los mismos se presentan en la Lista de Secuencias y se resumen a continuación en la Tabla 1, y se muestran en esta memoria los resultados de diversos ensayos en que se utilizaron estos anticuerpos. Quienes tienen experiencia en la técnica reconocerán que pueden variar los límites entre regiones de armazón y regiones determinantes de la complementariedad; por ejemplo, el aminoácido 22 de una FR1 de cadena ligera puede ser considerado parte de CDR1 en ciertos casos, etc. Además, ciertos sistemas de numeración designan a CDR3 y FR4 de una cadena pesada como una región J, y pueden incluir una región D entre FR3 y CDR3. En consecuencia, la numeración de las regiones expuestas a continuación puede variar en de uno a cinco aminoácidos.

Tabla 1

	VR	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1A1, pesada, ID. SEC. nº 9	1-126	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-115	116-126
1A1, ligera, ID. SEC. nº 11	1-107	1-22	23-33	34-48	49-55	56-87	88-97	98-107
1B5, pesada, ID. SEC. nº 13	1-126	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-115	116-126
1B5, ligera, ID. SEC. nº 15	1-107	1-22	23-33	34-48	49-55	56-87	88-97	98-107
1C7, pesada, ID. SEC. nº 17	1-126	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-115	116-126
1C7, ligera, ID. SEC. nº 19	1-107	1-22	23-33	34-48	49-55	56-87	88-97	98-107
2A5, ligera, ID. SEC. nº 21	1-106	1-22	23-33	34-48	49-55	56-87	88-96	97-106
2C6, pesada, ID. SEC. nº 23	1-122	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-122
2C6, ligera, ID. SEC. nº 25	1-111	1-22	23-35	35-50	51-57	58-89	90-100	101-111
9B12, pesada, ID. SEC. nº 27	1-121	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
9B12, ligera, ID. SEC. nº 29	1-111	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-101	102-111
12D5, pesada, ID. SEC. nº 31	1-125	1-30	31-37	38-51	52-69	70-101	102-114	115-125
12D5, ligera, ID. SEC. nº 33	1-107	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107
13F2, pesada, ID. SEC. nº 35	1-125	1-30	31-37	38-51	52-69	70-101	102-114	115-125
13F2, ligera, ID. SEC. nº 37	1-107	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107

Ejemplo 2: Purificación de anticuerpos de hibridoma anti-PAR-2 para exploración

Se cultivan células de hibridoma durante un tiempo y bajo unas condiciones para producir una muestra de aproximadamente 35 ml de fluidos sobrenadante de hibridoma. Se purifican los anticuerpos monoclonales usando un método adecuado, por ejemplo, usando proteína A. Se añaden 12 ml de tampón 4x para unión de proteína A (ácido cítrico 1,6 M, Tris 100 mM, pH de 9,15) y aproximadamente 300 μl de una suspensión de medio MabSelect™ (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey) al 67% a cada muestra. La suspensión resultante es hecha girar

suavemente durante la noche a 4 °C.

Después de la incubación durante la noche, las muestras son centrifugadas para que sedimenten la resina y los anticuerpos monoclonales unidos a ella, por ejemplo, a 2000 rpm en un rotor de centrifuga G3.8 (Beckman Coulter, Fullerton, California) durante 5 minutos a 4 °C sin freno. Se separa todo salvo aproximadamente 300 µl del fluido sobrenadante y se resuspende la resina para formar una suspensión concentrada.

5 Se transfiere la suspensión concentrada a un tubo de microcentrifuga y se añade suficiente tampón 1x para unión de proteína A (ácido cítrico 400 mM, Tris 25 mM, pH de 8,9) para llevar el volumen total hasta aproximadamente 1 ml. La suspensión es resuspendida y es luego centrifugada a aproximadamente 14.000 g durante 5 segundos. El fluido sobrenadante es separado del sedimento de centrifugación resultante, que es lavado un total de tres veces de un modo similar (es decir, resuspendiendo en aproximadamente 1 ml de tampón 1x para unión de proteína A, centrifugando, separando el sobrenadante y resuspendiendo en tampón fresco).

10 15 20 25 Despues de tres lavados, se resuspende el sedimento de centrifugación en 400 µl de tampón de elución (ácido fórmico 200 mM) y se agita la suspensión durante 10 minutos a temperatura ambiental y luego se centrifuga a 14.000 g durante 5 segundos. El sobrenadante es cuidadosamente separado como producto de elución, y el sedimento de centrifugación es eluido de nuevo de un modo similar al anteriormente descrito para un total de tres ciclos de elución. Los productos de elución de los tres ciclos de elución son combinados, centrifugados a 14.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiental y transferidos a un tubo nuevo. Se ajusta el pH a 7,8-8,2 añadiendo Tris-base 2 M (235 mM) y mezclando rápidamente. Las muestras son de nuevo centrifugadas a 14.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiental y son denominadas "Soluble por Cambio de pH". Se lleva a cabo un barrido espectral de cada muestra (diluida al añadir 20 µl de la muestra a 700 µl de agua), de 250 a 350 nm, y se verifica la concentración de proteína cargando 0,5 µg de cada muestra que contiene anticuerpo en un gel reductor al 4-20% para SDS-PAGE con un apropiado anticuerpo patrón.

Ejemplo 3: Purificación del polipéptido PAR-2/Fc

25 30 35 Se hace que se exprese el polipéptido PAR-2 N-terminal/Fc (ID. SEC. nº 6) en células de mamífero adecuadas, tales como células CHO. El sobrenadante de expresión de las células de expresión CHO cultivadas en medio exento de suero contiene una serina proteasa de tipo tripsina de células CHO que escinde PAR-2/Fc por el enlace Arg-Ser de activación, lo que genera la versión "recortada" del polipéptido PAR-2/Fc. Las células de expresión CHO cultivadas en suero de ternera fetal al 10% (que contiene niveles normales de inhibidores plasmáticos de proteinasas en concentraciones muy superiores a la concentración de la serina proteasa de tipo tripsina de células CHO) expresan PAR-2 N-terminal no escindido/Fc en los sobrenadantes de los cultivos. Tanto las proteínas recortadas como las no escindidas son purificadas usando métodos que son adecuados para el aislamiento y la purificación de proteínas que comprenden unas regiones Fc (por ejemplo, usando unos sistemas de resina MabSelect™, de GE Healthcare, Piscataway, New Jersey). Los constructos de Fc purificados resultantes son analizados por análisis amino terminal de secuencias (degradación de Edman), cromatografía de exclusión por tamaños, barrido espectral de absorbancias y spectrometría de masas, según se necesite.

40 45 50 En un ejemplo de un sistema de purificación adecuado, se carga medio acondicionado que contiene PAR-2/Fc en una columna de 10 ml de proteína A-Sepharose™ HiTrap, de GE Healthcare, a 6 ml/minuto y 7 °C. La columna es lavada con varios volúmenes de columna de disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin cationes divalentes y es luego sometida a elución con glicocola 100 mM en un pH de 3,0. La proteína eluida se diluye en un tampón de Tris y se ajusta el pH a 7,0 con H₃PO₄ 1 M. El producto de elución es luego cargado en una columna de 5 ml de SP-HP HiTrap de GE Healthcare en S-Buffer A (NaH₂PO₄ 20 mM en un pH de 7,0), a 5 ml/min y 7 °C. La columna es lavada con varios volúmenes de columna de S-Buffer A , lo que va seguido de elución con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna hasta S-Buffer B (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 1 M, pH de 7,0) al 40% seguido de un paso hasta S-Buffer B al 100% a 5 ml/min y 7 °C. Las fracciones pueden ser analizadas mediante SDS-PAGE con tinción por Coomassie y pueden ser reunidas. Las fracciones reunidas pueden ser filtradas a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm, y se puede llevar a cabo un barrido espectral sobre una muestra usando una masa molecular calculada de 30.226 y un coeficiente de extinción calculado de 35.410 M⁻¹ cm⁻¹. El material reunido es concentrado (por ejemplo, usando una membrana Pall Macrosep® de 10 kDa a temperatura ambiental, lo que va seguido de filtración a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm); se puede llevar a cabo otro barrido espectral para verificar la concentración. El producto final puede ser luego analizado mediante SDS-PAGE con tinción por Coomassie (gel de 1,0 mm al 4-20% en Tris-glicocola) y mediante SE-HPLC usando una columna Phenomenex BioSep 3000 (7,8 x 300 mm) en NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 250 mM, pH de 6,9.

Ejemplo 4: Expresión y purificación del heterodímero PAR-2/Fc:FLAG®/Fc

55 Se hace que se exprese una proteína heterodímera PAR-2/Fc:FLAG®/Fc y se purifica para facilitar el análisis de la avidez y afinidad de los anticuerpos hacia PAR-2. Se cotransfectan células adecuadas, por ejemplo, células de mamífero o células humanas tales como células HEK293, con ácido nucleico que codifica PAR-2/Fc (ID. SEC. nº 5)

y ácido nucleico que codifica FLAG®/Fc (ID. SEC. nº 43). El cultivo de las células transfectadas bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, en medio que contiene suero con bajo nivel de IgG) da lugar a la expresión de las proteínas PAR-2/Fc homodímera, FLAG®/Fc homodímera y PAR-2/Fc:FLAG®/Fc heterodímera. La última se obtiene mediante operaciones secuenciales de purificación, sustancialmente del modo descrito a continuación.

- 5 En un ejemplo de un sistema de purificación adecuado, se somete medio acondicionado que contiene PAR-2/Fc:FLAG®/Fc a métodos de purificación que facilitan la purificación de proteínas Fc, similarmente a los métodos previamente descritos para PAR-2/Fc. En resumen, se carga el medio acondicionado en una columna de proteína A bajo unas condiciones que permiten que el Fc se una a la proteína A. La columna es lavada con varios volúmenes de columna de PBS y es luego sometida a elución en un pH bajo. La proteína eluida es diluida y adicionalmente 10 purificada mediante chromatografía de intercambio iónico [por ejemplo, usando una columna de SP Sepharose™ de alta eficacia, de GE Healthcare, en S-Buffer A (NaH₂PO₄ 20 mM en un pH de 7,0), que es luego lavada con varios volúmenes de columna de S-Buffer y es sometida a elución con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de 1 a 20% y un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de 20 a 50 % de S-Buffer B (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 1 M, pH de 7,0), lo que va seguido de un paso hasta 100% de S-Buffer B a 5 ml/min].
- 15 Las fracciones son analizadas mediante SDS-PAGE con tinción por Coomassie, y las fracciones que contienen la mayor parte del producto deseado son reunidas. El material reunido es luego incubado con gel de afinidad anti-FLAG® M2 (Sigma A2220; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) durante la noche. La resina es luego lavada con disolución salina tamponada con Tris y es sometida a elución con HOAc 100 mM, pH de 3,5. El pH de la colección final es neutralizado a 7,0 con Tris-HCl 1 M, pH de 8,0.
- 20 En cualquier momento, el material puede ser filtrado a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm; se puede llevar a cabo un barrido espectral sobre una muestra usando una masa molecular calculada de 30.226 y un coeficiente de extinción calculado de 35.410 M⁻¹ cm⁻¹. Si se desea, el material reunido final puede ser concentrado (por ejemplo, usando una membrana Pall Macrosep® de 10 kDa a temperatura ambiental, lo que va seguido de filtración a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm); se puede llevar a cabo otro barrido espectral para 25 verificar la concentración. El producto final puede ser luego analizado mediante SDS-PAGE con tinción por Coomassie (gel de 1,0 mm al 4-20% en Tris-glicocola) y mediante SE-HPLC usando una columna Phenomenex BioSep 3000 (7,8 x 300 mm) en NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 250 mM, pH de 6,9.

Se usó una secuenciación N-terminal de aminoácidos para verificar que el material purificado de este modo contenía heterodímeros PAR-2/Fc:FLAG®/Fc. Se detectaron dos secuencias: TIQGTNRSSKG (que corresponde a los aminoácidos 25 a 35 de la ID. SEC. nº 2) y DDYKDDDD (que corresponde a la ID. SEC. nº 7). La relación de los dos péptidos era próxima a 1. La tinción con Coomassie y el análisis por SEC confirmaron que el material era la proteína heterodímera PAR-2/Fc:FLAG®/Fc con niveles indetectables de proteínas homodímeras.

Ejemplo 5: Análisis de anticuerpos PAR-2 mediante transferencia Western

Para analizar la unión a PAR-2 no escindido frente a PAR-2 escindido, se someten diversas cantidades de PAR-2 N-terminal no escindido y recortado:Fc purificado, a SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 8-16% en gradiente (geles Novex, Invitrogen Life Technologies) en un sistema de tampón de Tris-glicocola. También se incluyen carriles de gel que contienen patrones See Blue (Novex, Invitrogen Life Technologies) para la identificación de pesos moleculares. Despues de la electroforesis, se transfieren las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa usando un módulo de transferencia Novex XCell II (Invitrogen Life Technologies). Se bloquean las membranas con 30 tampón de bloqueo Odyssey, OBB (LI-COR Biosciences):disolución salina tamponada con Tris (TBS; del inglés, Tris buffer saline), 1:1, durante la noche a 4 °C con sacudimiento. Los anticuerpos que se van a analizar son diluidos en OBB:TBS 1:1 a una concentración final deseada durante 1 hora a temperatura ambiental. Las membranas son lavadas a fondo con Tween 20 al 0,1% en TBS (3-4 cambios de 100 ml a lo largo de ~ 1 hora). Las membranas son luego expuestas al apropiado producto de conjugación de anticuerpo secundario (IgG anti-conejo generada en cabra, o IgG anti-ratón generada en cabra)-Alexa 680 (Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies), diluido a 1:5000 en OBB:TBS (1:1), durante 1 hora a temperatura ambiental. Las membranas son lavadas del modo anteriormente descrito y, si se desea, son analizadas usando un sistema LI-COR Odyssey para obtención de imágenes infrarrojas (LI-COR Biosciences).

Ejemplo 6: Actividad ligante de anticuerpos PAR-2

50 En este ejemplo se describe la actividad ligante según se evalúa mediante resonancia de plasmones superficiales usando un biosensor BIAcore® (BIAcore International AB, Uppsala, Suecia). En resumen, se copula covalentemente anti-Fc humano (o anti-Fc murino) con chips biosensores (es decir, un chip CM5) usando un procedimiento de copulación amílica estándar y reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se inyecta anticuerpo PAR-2 (humano o murino, o una químera, por ejemplo, la ID. SEC. nº 38) o un anticuerpo testigo sobre el anti-Fc inmovilizado, y se hacen pasar independientemente cantidades variables de PAR-2 (PAR-2-huFc homodímero o PAR-2-huFc/FLAG-huFc heterodímero) sobre un chip copulado con un anticuerpo irrelevante (testigo negativo) y

también sobre un chip revestido con anti-PAR-2. La regeneración del chip se puede llevar a cabo con un pulso de 10 microlitros de ácido fosfórico 100 mM a 10 microlitros/minuto. Toda la unión se lleva a cabo en HBS (HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 3,4 mM, NaN₃ al 0,02%, agente tensioactivo P2O al 0,005%, pH de 7,4) o un medio equivalente.

Ejemplo 7: Comparación de anticuerpos PAR-2

- 5 Se examinaron diversos anticuerpos PAR-2 en diferentes formatos de ensayo; en la Tabla 2 se resumen los resultados. Se determinaron los valores de IC₅₀ mediante un ensayo FLIPR para movilización de Ca²⁺ previamente descrito; se determinó la unión a la región corriente arriba del sitio de escisión frente a la unión a la región corriente abajo del sitio de escisión usando el ensayo por transferencia Western previamente descrito.

Tabla 2

Anticuerpo	IC ₅₀	Unión al sitio de escisión*	
		Corriente arriba	Corriente abajo
1A1	2 nM	xxx	—
1B5	3 nM	xxx	—
1C7	3 nM	xxx	—
2C6	> 1 µM	—	xx
9B12	> 1 µM	—	xx
12D5	> 1 µM	—	xx
13F2	> 1 µM	—	xx

*En esta transferencia Western, un anticuerpo que se une corriente abajo del sitio de escisión se unirá al PAR-2 amino-terminal tanto de longitud completa como truncado/Fc, mientras que un anticuerpo que se une corriente arriba del sitio de escisión sólo se unirá al PAR-2 de longitud completa/Fc.

10 Ejemplo 8: Modelos de artritis inducida con adyuvante (AIA)

En este ejemplo se describen modelos agudo y crónico de artritis. En ambos modelos, los animales son anestesiados, por ejemplo, mediante una mezcla de ketamina/xilazina (mezcla para ratón o mezcla para rata, respectivamente) o isoflurano para todas las inyecciones intraarticulares (IA) y periarticulares (PA) o las inyecciones intradérmicas (ID).

- 15 Las inyecciones en las articulaciones, IA o PA, se dirigen a las rodillas o a las patas traseras. Las inyecciones PA son igualmente divididas a través de cuatro sitios que rodean la articulación de interés. Las inyecciones en las patas se administran ID en la zona plantar de la pata trasera. Para que sirva como testigo interno, se inyecta vehículo solo o PBS estéril en una rodilla o una pata trasera. La preparación de la zona de inyección incluye rasurar la zona de la articulación una vez que se han anestesiado los animales y frotar con una disolución de yodo seguida de un desinfectante alcohólico. Todas las inyecciones articulares se administran con una aguja de calibre 30 o equivalente y, cuando es necesario, mediante una jeringa impermeable a gases (es decir, Hamilton) para pequeños volúmenes de inyección (es decir, 10 µl).

25 Para la inducción de AIA aguda (aAIA), el día cero (D0) se inyectan a los animales carragenano lambda al 1-4% y caolín al 1-4% (C/K) mediante una inyección IA en disolución salina. Las concentraciones de ambos compuestos dependen de la pretendida gravedad de la enfermedad. Los volúmenes totales de inyección para el agente de inducción son entre 10 y 20 µl para los ratones y entre 60 y 80 µl para las ratas. Tanto la concentración como el volumen de inyección son consistentes con metodologías publicadas [J. Clin. Invest. 2003, 111 (1): 35-41; y J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006, 316 (3): 1017-24]. Alternativamente, se pueden usar agonistas peptídicos de PAR-2 específicos u otros agentes activadores de la inflamación [tal como tripsina, o beta-triptasa humana (J. Clin. Invest. 2003, 111 (1): 35-41; J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006, 316 (3): 1017-24; J. Pharmacol. Sci. 2005, 97 (1): 38-42; y Br. J. Pharmacol. 1999, 127 (5): 1083-90)] o el agente equivalente. Las concentraciones usadas son seleccionadas para la pretendida gravedad de la enfermedad, y los volúmenes totales de inyección son apropiados para el animal al cual se inyectan.

Para la inducción de AIA crónica (cAIA), el día cero (D0) se inyectan a los animales 10-20 μ l (ratón) y 60-80 μ l (rata) de adyuvante de Freund complementado con 10 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb.*) H37Ra [adyuvante completo de Freund (CFA; del inglés, complete Freund's adjuvant)] mediante inyección IA, seguidos de 40-80 μ l (ratón) y 120-200 μ l (rata) mediante inyección PA. Las concentraciones, el volumen de inyección y el régimen de inyecciones son consistentes con metodologías publicadas [J. Clin. Invest. 2003, 111 (1): 35-41]. El uso de adyuvante sigue los IACUC Global Adjuvant Usage Standards internos, no sobrepasando un total de 0,4 ml para ratones y un total de 1 ml para ratas. Todas las inyecciones cumplen con los Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Dose Administration Standards internos, para no incluir más de 20 ml/kg IP, 1 ml/kg IA y 5 ml/kg IV para ratones y 10 ml/kg IP, 0,5 ml/kg IA y 5 ml/g IV para ratas.

- 5 Para la inducción de AIA crónica (cAIA), el día cero (D0) se inyectan a los animales 10-20 μ l (ratón) y 60-80 μ l (rata) de adyuvante de Freund complementado con 10 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb.*) H37Ra [adyuvante completo de Freund (CFA; del inglés, complete Freund's adjuvant)] mediante inyección IA, seguidos de 40-80 μ l (ratón) y 120-200 μ l (rata) mediante inyección PA. Las concentraciones, el volumen de inyección y el régimen de inyecciones son consistentes con metodologías publicadas [J. Clin. Invest. 2003, 111 (1): 35-41]. El uso de adyuvante sigue los IACUC Global Adjuvant Usage Standards internos, no sobrepasando un total de 0,4 ml para ratones y un total de 1 ml para ratas. Todas las inyecciones cumplen con los Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Dose Administration Standards internos, para no incluir más de 20 ml/kg IP, 1 ml/kg IA y 5 ml/kg IV para ratones y 10 ml/kg IP, 0,5 ml/kg IA y 5 ml/g IV para ratas.
- 10 La intervención del tratamiento incluye las vías de administración intraperitoneal (IP), intraarticular (IA) e intravenosa (IV); en lugar o además de éstas, se pueden usar otras vías de administración adecuadas. Cualquier régimen de tratamiento a través de inyección IA se realiza en un momento distinto de D0, o en D0 pero secuencialmente en un sitio de inyección diferente de la misma articulación (por ejemplo, una primera inyección en la cara interior de la rodilla y una segunda inyección en la cara exterior).
- 15 Para los estudios de AIAs tanto aguda como crónica, se realizan mediciones del diámetro articular de todas las articulaciones de interés con un calibre antes de cualquier inyección. El seguimiento de la enfermedad puede incluir mediciones del diámetro articular con un calibre así como mediciones de la circunferencia articular con una cinta flexible, y calificación visual. También se pueden utilizar métodos alternativos (es decir, el uso de un pletismómetro). La gravedad de la cAIA se califica mediante uno de los criterios mostrados a continuación o mediante ambos:

Criterios de uso articular en cAIA

- 0 - Uso articular normal
1 - Curvatura de los dedos
2 - Desviación de la articulación o la pata
3 - Soporte parcial del peso
4- Falta de soporte del peso y posición defensiva

Criterios de aspecto articular en cAIA

- 0 - Articulación normal
1 - Rojez/hinchazón en de 1 a 3 dedos
2- Rojez/hinchazón en más de 3 dedos, leve hinchazón que se extiende a la pata, tobillo hinchado/rojo, o hinchazón/rojez leves de la pata delantera
3 - Pata hinchada, rojez de leve a moderada
4 - Rojez extrema e hinchazón extrema en toda la pata

- 20 De esta manera, se inyectaron C/K más tratamiento (o testigo) en la rodilla izquierda, y testigo negativo en cada rodilla derecha, de ratas Lewis de 6-8 semanas de edad, como para el modelo agudo. Después del tratamiento se midió el grosor de la articulación en puntos temporales establecidos, usando la media de tres lecturas con calibre. El cambio de grosor de la rodilla izquierda en comparación con el de la rodilla derecha se expresó como porcentaje de cambio y se muestra a continuación en la Tabla 3.

25

Tabla 3

	0 h	2 h	6 h	24 h	48 h	72 h
PBS	0,00 ± 0,00	-0,26 ± 0,71	0,26 ± 0,65	-0,84 ± 0,53	-0,84 ± 0,55	-0,48 ± 0,50
C/K	0,00 ± 0,00	3,88 ± 2,88	15,76 ± 1,74	17,51 ± 2,45	16,41 ± 1,39	8,07 ± 1,02
SLIGRL	0,00 ± 0,00	4,84** ± 0,87	8,02*** ± 1,17	5,68*** ± 1,07	3,47* ± 0,95	3,55* ± 0,81
1A1	0,00 ± 0,00	1,10 ± 1,13	4,12*** ± 1,29	3,57*** ± 1,20	4,70** ± 1,39	3,48 ± 0,66
hIgG	0,00 ± 0,00	4,80 ± 0,88	15,20 ± 2,91	13,77 ± 2,29	10,89 ± 1,30	5,95 ± 1,32

Los valores representan la media del grupo \pm error estándar de la media. Datos estadísticos calculados mediante ANOVA de 2 factores con Bonferroni. Se comparó el anticuerpo monoclonal 1A1 con hIgG; se comparó SLIGRL con PBS.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Estos resultados demuestran que un anticuerpo anti-PAR-2 antagonista reduce la inflamación observada en un modelo de artritis inducida con adyuvante.

Ejemplo 9: Modelos de artritis inducida con adyuvante (AIA)

En este ejemplo se describen los efectos de anticuerpos PAR-2 sobre el edema de pata en un modelo de AIA aguda sustancialmente como el descrito previamente. En resumen, a ratas Sprague Dawley o Lewis de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) se les inyectaron subcutáneamente (SC) carragenano lambda al 1% en la región plantar de una pata trasera y testigo (disolución salina) en la región plantar de la otra. Se administró intraperitonealmente (IP) anticuerpo monoclonal PAR-2 bloqueante (1A1) o testigo (testigo positivo o negativo; véanse las notas al pie de la Tabla 4) dieciocho horas antes de la inyección de adyuvante en una cantidad de 1,5 mg/rata (aproximadamente 8-10 mg/kg); luego se midió la hinchazón por plethysmografía en puntos temporales seleccionados. Los datos se expresaron como volumen de agua desplazada por pata, en mililitros (ml), frente a las mediciones de línea de base para esa pata. En las Tablas 4-5 siguientes se muestran resultados de experimentos representativos.

Tabla 4: ·Edema de pata en rata Lewis

	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Disolución salina	0,00 \pm 0,00	0,09 \pm 0,05	0,03 \pm 0,05	0,01 \pm 0,04	0,01 \pm 0,04
Carragenano	0,00 \pm 0,00	0,21 \pm 0,05	0,24 \pm 0,07	0,31 \pm 0,04	0,46 \pm 0,05
2B5 ¹	0,00 \pm 0,00	0,13 \pm 0,04	0,10 \pm 0,02	0,06 \pm 0,05	0,17 \pm 0,09
1A1	0,00 \pm 0,00	0,15 \pm 0,06	0,09*** \pm 0,04	0,14*** \pm 0,07	0,30*** \pm 0,06
2C6 ²	0,00 \pm 0,00	0,22 \pm 0,02	0,22 \pm 0,05	0,32 \pm 0,06	0,51 \pm 0,11

¹2B5: anti-PGE2 Testigo Positivo, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan

²2C6: mAb anti-PAR-2 no bloqueante y ligante, Testigo Negativo

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ por ANOVA de 2 factores con Bonferroni después del ensayo frente al testigo.

15

Tabla 5: ·Edema de pata en rata Sprague Dawley

	0 h	2 h	4 h	6 h
Disolución salina	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,08	-0,01 \pm 0,06	-0,01 \pm 0,04
Carragenano	0,00 \pm 0,00	0,61 \pm 0,12	1,16 \pm 0,13	1,36 \pm 0,19
Indometacina ¹	0,00 \pm 0,00	0,26 \pm 0,22	0,28 \pm 0,08	0,49 \pm 0,16
1A1	0,00 \pm 0,00	0,15*** \pm 0,05	0,45*** \pm 0,08	0,49*** \pm 0,08
2C6 ²	0,00 \pm 0,00	0,57 \pm 0,08	1,06 \pm 0,16	1,13 \pm 0,08

¹Testigo Positivo de indometacina en una cantidad de 5 mg/kg

²2C6: mAb anti-PAR-2 no bloqueante y ligante, Testigo Negativo

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ por ANOVA de 2 factores con Bonferroni después del ensayo frente al testigo.

En otros experimentos, un anticuerpo PAR-2 bloqueante (1A1) disminuyó significativamente la hinchazón de la pata cuando se administró IP pero no cuando se administró SC; el subsiguiente análisis farmacocinético reveló que la biodisponibilidad del 1A1 SC administrado era subóptima en el estudio del edema de pata. Además, la inhibición de la hinchazón mediante el anticuerpo PAR-2 bloqueante IP administrado se producía de un modo dependiente de la dosis. Estos resultados confirman hallazgos previos relativos a que un anticuerpo anti-PAR-2 antagónico reduce la inflamación observada en un modelo de artritis inducida con adyuvante.

5

Ejemplo 10: Alteración en citocinas proinflamatorias

En este ejemplo se describen los efectos de anticuerpos PAR-2 o anticuerpos testigo positivo de referencia (es decir, 2B5 anti-PGE2, de Cayman Chemical) sobre la inducción de citocinas proinflamatorias. En resumen, se prepararon lisados tisulares procedentes de patas inflamadas o patas testigo (naíf) de rata mediante desmenuzamiento en tampón de lisis y colocación en un Qiagen Tissue Lyser. Se reunieron partes alícuotas de muestras, se evaluaron en cuanto a proteína total por absorbancia (A_{280}) usando un sistema de espectroscopía para microvolúmenes (NanoDrop™, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts), y se enviaron a Rules-Based Medicine, Inc. (Austin, Texas) para el análisis del perfil de múltiples analitos (MAP; del inglés, multi-analyte profile) sobre el Rodent Panel v2.0. Numerosos analitos estaban alterados con la actividad morbosa; las comparaciones mostradas incluían las diferenciadas por los tratamientos con 1A1 y 2B5. Se normalizaron los analitos con respecto a la proteína total [es decir, (pg, ng, μ g)/mg de proteína total]; los datos se muestran en la Figura 1. Estos resultados confirman los hallazgos bibliográficos relativos a que una liberación elevada de mediadores proinflamatorios, tales como citocinas y prostaglandina, es un rasgo distintivo de un edema inducido por carragenano. Los menores niveles de estos factores observados en lisados de patas de animales tratados con anticuerpo antagónico anti-PAR-2 sugieren que estos anticuerpos se unen a PAR-2 y reducen significativamente la subsiguiente producción de mediadores proinflamatorios. La disminución de la producción de estos analitos confirma la actividad antiinflamatoria de los anticuerpos neutralizantes de PAR-2.

10

15

20

Ejemplo 11: Propiedades ligantes de las proteínas ligantes de antígeno

En este ejemplo se describe el análisis de las propiedades ligantes de proteínas ligantes de antígeno PAR-2 con respecto al PAR-2 expresado en la superficie celular, utilizando un Ensayo Cinético de Exclusión que permite medir procesos de unión en fase de disolución y puede ser utilizado para calcular K_D , K_{on} y K_{off} (KinExA®; Sapidyne Instruments, Boise, Indiana), sustancialmente del modo previamente descrito por Xie et al., J. Imm. Methods 304: 1 (2005), y Rathanaswami et al., Anal. Biochem. 373: 52 (2008). En resumen, se incuban diluciones sucesivas de células que expresan PAR-2 humano (por ejemplo, CHO transfectantes que expresan PAR-2 humano en la superficie celular, obtenibles al transfectar células CHO con cDNA humano de PAR-2 de longitud completa que codifica un polipéptido de ID. SEC. nº 2) y células testigo (es decir, células CHO no transfectadas) en un medio DMEM modificado [exento de rojo fenol, que contiene FBS térmicamente inactivado al 10%, aminoácidos no esenciales de MEM 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, penicilina-estreptomicina-glutamina, y azida sódica al 0,025% (peso/peso)], con cantidades establecidas de anticuerpo durante un periodo de 24 a 36 horas a 4 °C, con rotación. Al final del tiempo de incubación, se recogen las células como sedimento de centrifugación (es decir, a 2000 rpm durante 4 minutos) y se separa el sobrenadante que contiene anticuerpo no unido (libre). Se mide el mAb libre mediante KinExA® usando los apropiados glóbulos de captura y anticuerpos secundarios anti-ser humano conjugados con Cy5, del modo descrito por Rathanaswami et al., Biochem. Biophys. Research Commun.: 1004 (2005). Se obtiene la constante de disociación en equilibrio (K_D) usando el software KinExA® y mediante una "análisis de n curvas" que ajusta simultáneamente todas las curvas dadas a un único valor de K_D (Rathanaswami et al., 2005, y Xie et al., *supra*).

25

30

35

40

La K_D de ciertos anticuerpos PAR-2 se determinó de este modo. Según se mide mediante KinExA®, la K_D para la interacción del anticuerpo 1A1 anti-PAR-2 con el PAR-2 humano expresado en la superficie celular es 62,8 pM con un intervalo de confianza al 95% de 24,8 a 134,7 pM (valor medio para N = 5 experimentos). Un análisis inicial del anticuerpo 1B5 en este sistema indicó una K_D de 3,39 nM con un intervalo de confianza al 95% de 1,36 a 5,47 pM (N = 2 experimentos).

45

Ejemplo 12: Inducción de artritis inducida con colágeno

En este ejemplo se describe un modelo de artritis inducida con colágeno (CIA; del inglés, collagen-induced arthritis) utilizando ratas. Se disuelve colágeno porcino de tipo II (10 mg; Chondrex, Redmond, Washington) en ácido acético 0,1 N (5 ml), dos días antes de su uso, en una placa giratoria a 2-4 °C. Posteriormente, se emulsiona el colágeno a 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (FIA; del inglés, Freund's incomplete adjuvant; Difco, Detroit, Michigan) usando una aguja para preparar emulsiones y jeringas de vidrio, para obtener una concentración final de 1 mg/ml. Se induce la enfermedad en hembras de rata Lewis de 8 semanas de edad (Charles River, Wilmington, Massachusetts) mediante la inyección intradérmica de colágeno emulsionado en IFA en 10 sitios diferentes (100 μ l por sitio) del lomo. El inicio clínico de la artritis varía, normalmente entre 10 y 12 días, según viene indicado por hinchazón de las patas traseras y dificultades ambulatorias. Antes de la inmunización con colágeno, se disponen

50

55

aleatoriamente las ratas en grupos de tratamiento y se inicia la terapia con una administración intraperitoneal de anticuerpo neutralizante de PAR-2, anticuerpos testigo (es decir anticuerpos no bloqueantes de PAR-2) o testigo vehicular (A5Su). Se administra una segunda dosis de los anticuerpos y el vehículo el día antes del inicio, el Día 9.

- 5 Durante el estudio, la progresión de la inflamación es clínicamente evaluada mediante la medición intermitente del diámetro de las patas traseras usando calibres. Se toman lecturas en la articulación tibiotarsiana (tobillo) antes de la inducción de la artritis, el día del inicio (Día 10), los días 11-17, y en la necropsia (Día 18). Se calcula la inhibición de la inflamación de las patas basándose en el área bajo la curva (AUC; del inglés, area under the curve) de acuerdo con la fórmula:

$$[(CIA \text{ tratada con vehículo} - CIA \text{ tratada})/(CIA \text{ tratada con vehículo})] \times 100$$

- 10 Además, se determina diariamente el peso corporal total durante el régimen de tratamiento como un punto final complementario ya que la pérdida de peso corporal corre paralelamente a la progresión de la inflamación articular en este modelo de artritis.

15 A la terminación del estudio, se pueden evaluar las articulaciones de los tobillos en cuanto a pérdida de densidad mineral ósea (BMD; del inglés, bone mineral density) así como en cuanto a cambios en la fosforilación de cinasa 2 activada por proteína cinasa activada por mitógeno (MAPKAPK-2 o MK-2). La BMD se examina usando absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA; del inglés, dual-energy X-ray absorptiometry) en un punto temporal adecuado después de la necropsia. Las patas traseras son extirpadas por la línea del pelaje [justo proximal al tobillo (jarrete)], sumergidas en etanol al 70% y almacenadas a temperatura ambiental hasta que se determina la BMD. Las articulaciones son luego barridas en orientación horizontal usando un densíómetro de rayos X con haz en abanico (modelo QDR-4500A; Hologic, Waltham, Massachusetts), sustancialmente del modo descrito por Feige et al., Cell Mol. Life Sci. 57: 1457; 2000. Después del barrido, se sitúa una caja rectangular (29 x 25 mm) centrada en el calcáneo para delimitar el sitio que se va a analizar y se utilizan algoritmos validados para la instrumentación usada (por ejemplo, el software Hologic) para calcular el área ósea, el contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea. Para el análisis de fósforo, se congela un tobillo en N₂ líquido para triturarlo hasta un polvo proteico que es desarrollado en una transferencia Western usando un ensayo para MK-2 comercialmente asequible.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC. VIRCA, G. Duke HU, Shaw-Fen Sylvia

<120> PROTEÍNAS LIGANTES DE ANTÍGENO QUE SE UNEN A PAR-2.

<130> A-1290-WO-PCT

5 <140> pendiente de asignar
 <141> 26-06-2008

10 <150> US 60/947.264
 <151> 2007-06-29

10 <150> US 61/058.094
 <151> 02-06-2008

15 <160> 43
 <170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1
 <211> 1194
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1191)

20 <400> 1

atg	cg	agc	ccc	agc	g	cg	tg	ctg	ctg	gg	gg	g	cc	atc	ctg	ct	ta	48		
Met	Arg	Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	Trp	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu					
1																15				
gca	g	cc	tct	tc	c	tcc	tgc	agt	ggc	acc	atc	caa	g	ga	cc	aa	at	aga	tcc	96
Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr	Ile	Gln	Gly	Thr	Asn	Arg	Ser					
																30				
tct	aa	g	ga	ag	ac	ctt	att	gg	aag	gtt	gat	gg	ac	tcc	cac	gtc		144		
Ser	Lys	Gly	Arg	Ser	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Asp	Gly	Thr	Ser	His	Val					
																45				
act	gg	aa	gg	gtt	ac	gtt	gaa	ac	gtc	ttt	tct	gt	gat	gag	ttt		192			
Thr	Gly	Lys	Gly	Val	Thr	Val	Glu	Thr	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Glu	Phe					
																50				
																55				
																60				
tct	g	ca	tct	gtc	ctc	act	gg	aa	ctg	acc	act	gtc	ttc	ctt	cc	att		240		
Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Gly	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Phe	Leu	Pro	Ile					
																65				
																70				
																75				
																80				
gtc	ta	ac	at	gt	tt	gt	gt	gg	tt	cc	ag	aa	gg	at	gg		288			
Val	Tyr	Thr	Ile	Val	Phe	Val	Val	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Gly	Met	Ala					
																85				
																90				
																95				
ctg	tgg	gtc	ttt	ctt	ttc	cga	act	aag	aag	aag	cac	cct	gct	gt	tt		336			
Leu	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Arg	Thr	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Ala	Val	Ile					
																100				
																105				
																110				

ES 2 406 429 T3

tac atg gcc aat ctg gcc ttg gct gac ctc ctc tct gtc atc tgg ttc			384
Tyr Met Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ser Val Ile Trp Phe			
115	120	125	
ccc ttg aag att gcc tat cac ata cat ggc aac aac tgg att tat ggg			432
Pro Leu Lys Ile Ala Tyr His Ile His Gly Asn Asn Trp Ile Tyr Gly			
130	135	140	
gaa gct ctt tgt aat gtg ctt att ggc ttt ttc tat ggc aac atg tac			480
Glu Ala Leu Cys Asn Val Leu Ile Gly Phe Phe Tyr Gly Asn Met Tyr			
145	150	155	160
tgt tcc att ctc ttc atg acc tgc ctc agt gtg cag agg tat tgg gtc			528
Cys Ser Ile Leu Phe Met Thr Cys Leu Ser Val Gln Arg Tyr Trp Val			
165	170	175	
atc gtg aac ccc atg ggg cac tcc agg aag aag gca aac att gcc att			576
Ile Val Asn Pro Met Gly His Ser Arg Lys Lys Ala Asn Ile Ala Ile			
180	185	190	
ggc atc tcc ctg gca ata tgg ctg ctg att ctg ctg gtc acc atc cct			624
Gly Ile Ser Leu Ala Ile Trp Leu Leu Ile Leu Val Thr Ile Pro			
195	200	205	
ttg tat gtc gtg aag cag acc atc ttc att cct gcc ctg aac atc acg			672
Leu Tyr Val Val Lys Gln Thr Ile Phe Ile Pro Ala Leu Asn Ile Thr			
210	215	220	
acc tgt cat gat gtt ttg cct gag cag ctc ttg gtg gga gac atg ttc			720
Thr Cys His Asp Val Leu Pro Glu Gln Leu Leu Val Gly Asp Met Phe			
225	230	235	240
aat tac ttc ctc tct ctg gcc att ggg gtc ttt ctg ttc cca gcc ttc			768
Asn Tyr Phe Leu Ser Leu Ala Ile Gly Val Phe Leu Phe Pro Ala Phe			
245	250	255	
ctc aca gcc tct gcc tat gtg ctg atg atc aga atg ctg cga tct tct			816
Leu Thr Ala Ser Ala Tyr Val Leu Met Ile Arg Met Leu Arg Ser Ser			
260	265	270	
gcc atg gat gaa aac tca gag aag aaa agg aag agg gcc atc aaa ctc			864
Ala Met Asp Glu Asn Ser Glu Lys Lys Arg Lys Arg Ala Ile Lys Leu			
275	280	285	
att gtc act gtc ctg gcc atg tac ctg atc tgc ttc act cct agt aac			912
Ile Val Thr Val Leu Ala Met Tyr Leu Ile Cys Phe Thr Pro Ser Asn			
290	295	300	
ctt ctg ctt gtg gtg cat tat ttt ctg att aag agc cag ggc cag agc			960
Leu Leu Leu Val Val His Tyr Phe Leu Ile Lys Ser Gln Gly Gln Ser			
305	310	315	320
cat gtc tat gcc ctg tac att gta gcc ctc tgc ctc tct acc ctt aac			1008
His Val Tyr Ala Leu Tyr Ile Val Ala Leu Cys Leu Ser Thr Leu Asn			
325	330	335	
agc tgc atc gac ccc ttt gtc tat tac ttt gtt tca cat gat ttc agg			1056
Ser Cys Ile Asp Pro Phe Val Tyr Phe Val Ser His Asp Phe Arg			
340	345	350	

ES 2 406 429 T3

gat cat gca aag aac gct ctc ctt tgc cga agt gtc cgc act gta aag	1104
Asp His Ala Lys Asn Ala Leu Leu Cys Arg Ser Val Arg Thr Val Lys	
355	360
365	
cag atg caa gta tcc ctc acc tca aag aaa cac tcc agg aaa tcc agc	1152
Gln Met Gln Val Ser Leu Thr Ser Lys Lys His Ser Arg Lys Ser Ser	
370	375
380	
tct tac tct tca agt tca acc act gtt aag acc tcc tat tga	1194
Ser Tyr Ser Ser Thr Thr Val Lys Thr Ser Tyr	
385	390
395	
<210> 2	
<211> 397	
<212> PRT	
5 <213> Homo sapiens	
<400> 2	
Met Arg Ser Pro Ser Ala Ala Trp Leu Leu Gly Ala Ala Ile Leu Leu	1152
1	5
10	15
Ala Ala Ser Leu Ser Cys Ser Gly Thr Ile Gln Gly Thr Asn Arg Ser	1194
20	25
30	
Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ile Gly Lys Val Asp Gly Thr Ser His Val	1194
35	40
45	
Thr Gly Lys Gly Val Thr Val Glu Thr Val Phe Ser Val Asp Glu Phe	1194
50	55
60	
Ser Ala Ser Val Leu Thr Gly Lys Leu Thr Thr Val Phe Leu Pro Ile	1194
65	70
75	80
Val Tyr Thr Ile Val Phe Val Val Gly Leu Pro Ser Asn Gly Met Ala	1194
85	90
95	
Leu Trp Val Phe Leu Phe Arg Thr Lys Lys His Pro Ala Val Ile	1194
100	105
110	
Tyr Met Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ser Val Ile Trp Phe	1194
115	120
125	
Pro Leu Lys Ile Ala Tyr His Ile His Gly Asn Asn Trp Ile Tyr Gly	1194
130	135
140	
Glu Ala Leu Cys Asn Val Leu Ile Gly Phe Phe Tyr Gly Asn Met Tyr	1194
145	150
155	160
Cys Ser Ile Leu Phe Met Thr Cys Leu Ser Val Gln Arg Tyr Trp Val	

ES 2 406 429 T3

165

170

175

Ile Val Asn Pro Met Gly His Ser Arg Lys Lys Ala Asn Ile Ala Ile
180 185 190

Gly Ile Ser Leu Ala Ile Trp Leu Leu Ile Leu Leu Val Thr Ile Pro
195 200 205

Leu Tyr Val Val Lys Gln Thr Ile Phe Ile Pro Ala Leu Asn Ile Thr
210 215 220

Thr Cys His Asp Val Leu Pro Glu Gln Leu Leu Val Gly Asp Met Phe
225 230 235 240

Asn Tyr Phe Leu Ser Leu Ala Ile Gly Val Phe Leu Phe Pro Ala Phe
245 250 255

Leu Thr Ala Ser Ala Tyr Val Leu Met Ile Arg Met Leu Arg Ser Ser
260 265 270

Ala Met Asp Glu Asn Ser Glu Lys Lys Arg Lys Arg Ala Ile Lys Leu
275 280 285

Ile Val Thr Val Leu Ala Met Tyr Leu Ile Cys Phe Thr Pro Ser Asn
290 295 300

Leu Leu Leu Val Val His Tyr Phe Leu Ile Lys Ser Gln Gly Gln Ser
305 310 315 320

His Val Tyr Ala Leu Tyr Ile Val Ala Leu Cys Leu Ser Thr Leu Asn
325 330 335

Ser Cys Ile Asp Pro Phe Val Tyr Tyr Phe Val Ser His Asp Phe Arg
340 345 350

Asp His Ala Lys Asn Ala Leu Leu Cys Arg Ser Val Arg Thr Val Lys
355 360 365

Gln Met Gln Val Ser Leu Thr Ser Lys Lys His Ser Arg Lys Ser Ser
370 375 380

Ser Tyr Ser Ser Ser Thr Thr Val Lys Thr Ser Tyr
385 390 395

<210> 3

ES 2 406 429 T3

<211> 399
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

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

Ala Ala Ser Val Ser Cys Ser Arg Thr Glu Asn Leu Ala Pro Gly Arg
20 25 30

Asn Asn Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ile Gly Arg Leu Glu Thr Gln Pro
35 40 45

Pro Ile Thr Gly Lys Gly Val Pro Val Glu Pro Gly Phe Ser Ile Asp
50 55 60

Glu Phe Ser Ala Ser Ile Leu Thr Gly Lys Leu Thr Thr Val Phe Leu
65 70 75 80

Pro Val Val Tyr Ile Ile Val Phe Val Ile Gly Leu Pro Ser Asn Gly
85 90 95

Met Ala Leu Trp Ile Phe Leu Phe Arg Thr Lys Lys Lys His Pro Ala
100 105 110

Val Ile Tyr Met Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ser Val Ile
115 120 125

Trp Phe Pro Leu Ala Ile Ala Tyr His Leu His Gly Asn Asn Trp Val
130 135 140

Tyr Gly Glu Ala Leu Cys Lys Val Leu Ile Gly Phe Phe Tyr Gly Asn
145 150 155 160

Met Tyr Cys Ser Ile Leu Phe Met Thr Cys Leu Ser Val Gln Arg Tyr
165 170 175

Trp Val Ile Val Asn Pro Met Gly His Pro Arg Lys Lys Ala Asn Ile
180 185 190

Ala Val Gly Val Ser Leu Ala Ile Trp Leu Leu Ile Phe Leu Val Thr
195 200 205

Ile Pro Leu Tyr Val Met Lys Gln Thr Ile Tyr Ile Pro Ala Leu Asn
210 215 220

ES 2 406 429 T3

Ile Thr Thr Cys His Asp Val Leu Pro Glu Glu Val Leu Val Gly Asp
225 230 235 240

Met Phe Asn Tyr Phe Leu Ser Leu Ala Ile Gly Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Ala Ile Leu Thr Ala Ser Ala Tyr Val Leu Met Ile Lys Thr Leu Arg
260 265 270

Ser Ser Ala Met Asp Glu His Ser Glu Lys Lys Arg Gln Arg Ala Ile
275 280 285

Arg Leu Ile Ile Thr Val Leu Ala Met Tyr Phe Ile Cys Phe Ala Pro
290 . 295 300

Ser Asn Leu Leu Leu Val Val His Tyr Phe Leu Ile Lys Thr Gln Arg
305 310 315 320

Gln Ser His Val Tyr Ala Leu Tyr Leu Val Ala Leu Cys Leu Ser Thr
325 330 335

Leu Asn Ser Cys Ile Asp Pro Phe Val Tyr Tyr Phe Val Ser Lys Asp
340 345 350

Phe Arg Asp His Ala Arg Asn Ala Leu Leu Cys Arg Ser Val Arg Thr
355 360 365

Val Asn Arg Met Gln Ile Ser Leu Ser Ser Asn Lys Phe Ser Arg Lys
370 375 380

Ser Gly Ser Tyr Ser Ser Ser Thr Ser Val Lys Thr Ser Tyr
385 390 395

<210> 4

<211> 397

<212> PRT

5 <213> Rattus rattus

<400> 4

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

Ala Ala Ser Ala Ser Cys Asn Arg Thr Val Asn Ala Pro Gly Pro Asn
20 25 30

Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ile Gly Arg Leu Asp Thr Pro Pro Pro Ile
35 40 45

ES 2 406 429 T3

Thr Gly Lys Gly Ala Pro Val Glu Pro Gly Phe Ser Val Asp Glu Phe
50 55 60

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

Ile Tyr Ile Ile Val Phe Val Ile Gly Leu Pro Ser Asn Gly Met Ala
85 90 95

Leu Trp Val Phe Phe Arg Thr Lys Lys Lys His Pro Ala Val Ile
100 105 110

Tyr Met Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ser Val Ile Trp Phe
115 120 125

Pro Leu Lys Ile Ser Tyr His Leu His Gly Asn Asp Trp Thr Tyr Gly
130 135 140

Asp Ala Leu Cys Lys Val Leu Ile Gly Phe Phe Tyr Gly Asn Met Tyr
145 150 155 160

Cys Ser Ile Leu Phe Met Thr Cys Leu Ser Val Gln Arg Tyr Trp Val
165 170 175

Ile Val Asn Pro Met Gly His Ser Arg Lys Arg Ala Asn Ile Ala Val
180 185 190

Gly Val Ser Leu Ala Ile Trp Leu Leu Ile Phe Leu Val Thr Ile Pro
195 200 205

Leu Tyr Val Met Arg Gln Thr Ile Tyr Ile Pro Ala Leu Asn Ile Thr
210 215 220

Thr Cys His Asp Val Leu Pro Glu Glu Val Leu Val Gly Asp Met Phe
225 230 235 240

Ser Tyr Phe Leu Ser Leu Ala Ile Gly Val Phe Leu Phe Pro Ala Leu
245 250 255

Leu Thr Ala Ser Ala Tyr Val Leu Met Ile Lys Thr Leu Arg Ser Ser
260 265 270

Ala Met Asp Glu His Ser Glu Lys Lys Arg Arg Arg Ala Ile Arg Leu
275 280 285

ES 2 406 429 T3

Ile Ile Thr Val Leu Ser Met Tyr Phe Ile Cys Phe Ala Pro Ser Asn
 290 295 300

Val Leu Leu Val Val His Tyr Phe Leu Ile Lys Ser Gln Arg Gln Ser
 305 310 315 320

His Val Tyr Ala Leu Tyr Leu Val Ala Leu Cys Leu Ser Thr Leu Asn
 325 330 335

Ser Cys Ile Asp Pro Phe Val Tyr Tyr Phe Val Ser Lys Asp Phe Arg
 340 345 350

Asp Gln Ala Arg Asn Ala Leu Leu Cys Arg Ser Val Arg Thr Val Lys
 355 360 365

Arg Met Gln Ile Ser Leu Thr Ser Asn Lys Phe Ser Arg Lys Ser Ser
 370 375 380

Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Ser Val Lys Thr Ser Tyr
 385 390 395

<210> 5

<211> 903

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<400> 5

atg cgg agc ccc agc gcg gcg tgg ctg ctg ggg gcc gcc atc ctg cta 48
 Met Arg Ser Pro Ser Ala Ala Trp Leu Leu Gly Ala Ala Ile Leu Leu
 1 5 10 15

gca gcc tct ctc tcc tgc agt ggc acc atc caa gga acc aat aga tcc 96
 Ala Ala Ser Leu Ser Cys Ser Gly Thr Ile Gln Gly Thr Asn Arg Ser
 20 25 30

tct aaa gga aga agc ctt att ggt aag gtt gat ggc aca tcc cac gtc 144
 Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ile Gly Lys Val Asp Gly Thr Ser His Val
 35 40 45

act gga aaa gga gtt aca gtt gaa aca gtc ttt tct gtg gat gag ttt 192
 Thr Gly Lys Gly Val Thr Val Glu Thr Val Phe Ser Val Asp Glu Phe
 50 55 60

tct gca tct gtc ctc act gga aaa gtc gac aaa act cac aca tgc cca 240
 Ser Ala Ser Val Leu Thr Gly Lys Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 65 70 75 80

10 ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc 288

ES 2 406 429 T3

Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
						85										95
ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	336
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
								100		105					110	
aca	tgc	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	384	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
								115		120					125	
aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	432
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
								130		135					140	
cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	480
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
								145		150					155	
gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	528
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
								165		170					175	
tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	576
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
								180		185					190	
aaa	ggg	cag	ccc	cga	gag	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	ccg	624
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
								195		200					205	
gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	672
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
								210		215					220	
ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	720
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
								225		230					235	
gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	768
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	
								245		250					255	
ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	816
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	
								260		265					270	
ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	864
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
								275		280					285	
tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga			903	
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
								290		295					300	
<210> 6																
<211> 300																
<212> PRT																
5	<213> Homo sapiens															
<400> 6																

ES 2 406 429 T3

Met Arg Ser Pro Ser Ala Ala Trp Leu Leu Gly Ala Ala Ile Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ser Leu Ser Cys Ser Gly Thr Ile Gln Gly Thr Asn Arg Ser
20 25 30

Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ile Gly Lys Val Asp Gly Thr Ser His Val
35 40 45

Thr Gly Lys Gly Val Thr Val Glu Thr Val Phe Ser Val Asp Glu Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Val Leu Thr Gly Lys Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
65 70 75 80

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
85 90 95

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
100 105 110

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

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
145 150 155 160

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
165 170 175

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
180 185 190

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
195 200 205

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
225 230 235 240

ES 2 406 429 T3

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295 300

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 7

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

10 <210> 8

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgttaagg gttctggata caactttatc agccactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatg atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcaa taccgcctac 240
 ctgcagtggaa gaaggctgaa ggcctcgac accgcatgt atttctgtgc gagacatgg 300
 ggtataactg gaactacatt ctactacgac ttccgttatgg acgtctgggg ccaaggacc 360

15 acggtcaccc ttcctca

378

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 9

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

ES 2 406 429 T3

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

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Met Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Arg Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr Phe Tyr Tyr Asp Phe Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcatt gccaaagcaa tatgcttctt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggccccctc tattgggtat atatacagac agtgagaggc cctcagggtc ccctgagcga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gacgaggctg actattactg tcaatcgca gacagcggtg gttcttatgt ctccggcact 300
 gggaccaagg tcaccgtcct a 321

<210> 11

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala

ES 2 406 429 T3

20

25

30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Leu Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Arg Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Leu Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Gly Gly Ser Tyr
 85 90 95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 12

<211> 378

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

gaggtgcagc tggcgcagtc tggagcagag gtgaaaaagt ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgttaagg gttctggata cagctttcc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggaatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccagggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag aaccgcctac 240
 ctacagtgga gcagttgaa ggcctcgac accgccatgt attactgtgc gagacataaa 300
 ggtataactg gaactacatt ctactacgac tacggcatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcacccg tctcctca 378

<210> 13

<211> 126

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Ser Gly Glu
 1 5 10 15

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

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

ES 2 406 429 T3

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Lys Gly Ile Thr Gly Thr Thr Phe Tyr Tyr Asp Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 14

<211> 321

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

tcctatgagt tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
acctgctctg gagaagctt gccaaaacaa tatgcttctt ggtaccagca gaagccagc 120
caggccccctg tcttgggtat atatagagac actgagaggc cctcaggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcaatg gtgcttatgt cttcggaact 300
gggaccaggg tcaccgtcct a 321

<210> 15

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Arg Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

ES 2 406 429 T3

50

55

60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Asn Gly Ala Tyr
85 90 95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
100 105

<210> 16

<211> 378

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

gaggtgcagt tggcgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgttaagg gttctggata cagcttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgaaaag gcctggagtg gatggaaatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag aaccgcctac 240
ctacagtggaa gcagttgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacataaa 300
ggtataactg gaactacatt ctactacgac tacggcatgg acgtctgggg ccaaggacc 360
acggtcacccg tctcctca 378

<210> 17

<211> 126

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 406 429 T3

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Lys Gly Ile Thr Gly Thr Thr Phe Tyr Tyr Asp Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 18

<211> 321

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 18

tcctatgagt tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagaagctt gccaaagcaa tatgcttctt ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggccccctg tcttgggtat atataaagac agtgagaggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcaatg gtgcttatgt cttcgaaact 300
 ggaacccaagg tcaccgtcct a 321

<210> 19

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Asn Gly Ala Tyr

ES 2 406 429 T3

	85	90	95
	Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
	100	105	
	<210> 20		
	<211> 318		
	<212> DNA		
5	<213> Homo sapiens		
	<400> 20		
	tcctatgagc tgactcagcc actctcagtg tcagtggccc tgggacagac ggccaggatt	60	
	acctgtgggg gaaacaacat tggaaagtaaa aatgtgcact ggtaccagca gaagccaggc	120	
	caggccccctg tgctggtcat ctatagggat agcaaccggc cctctggat ccctgagcga	180	
	ttctctggct ccaactcggg gaacacggcc accctgacca tcagcagac ccaagccggg	240	
	gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgcggatt cggcggaggg	300	
	accaagctga ccgtccta	318	
	<210> 21		
	<211> 106		
10	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 21		
	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln		
	1	5	10
			15
	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val		
	20	25	30
	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr		
	35	40	45
	Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
	50	55	60
	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly		
	65	70	75
			80
	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val		
	85	90	95
	Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
	100	105	
15	<210> 22		
	<211> 366		
	<212> DNA		

ES 2 406 429 T3

<213> Homo sapiens

<400> 22

```

caggtgcaac tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60
tcctgcaagg cttctggata cacccacc ggctactttt ttcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctttagtg ggtggatgg atcaacccta acagtggtgc cacacactt 180
gcacagaaat ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag tacagcctac 240
atggaactga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggc 300
tccaaactgga accgcgacta cggtatggac gtctgggccc aggggaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366

```

<210> 23

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

```

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

```

```

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

```

```

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr His Phe Ala Gln Lys Phe
50 55 60

```

```

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

```

```

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```

```

Ala Arg Asp Gly Ser Asn Trp Asn Arg Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

```

```

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

```

10 <210> 24

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

ES 2 406 429 T3

```

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga attaatcatg tatattggta ccagcaactc      120
ccaggaacgg cccccaaaat cttcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcaag tgggctccgg      240
tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gtatggatg acagtctgag tggtgtggta      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta                                330

```

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

```

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1           5           10          15

```

```

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
20          25          30

```

```

His Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Ile Phe
35          40          45

```

```

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50          55          60

```

```

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65          70          75          80

```

```

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
85          90          95

```

```

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100         105         110

```

<210> 26

<211> 363

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 406 429 T3

caggtgcagc tggtgaggc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc 60
 tcctgtcagc cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatg atgaaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 ggagcagcag ctggtactgg ttttactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 27

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ala Gly Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28

<211> 333

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

ES 2 406 429 T3

	cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc	60
	tcctgtctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tattctggta ccagcagctc	120
	ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcaccg tcagccaccc tgggcacatcac cgactccag	240
	actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatggata gcagcctgag tgctggtgt	300
	gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta	333
	<210> 29	
	<211> 111	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 29	
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln	
	1 5 10 15	
	Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn	
	20 25 30	
	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
	35 40 45	
	Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
	50 55 60	
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln	
	65 70 75 80	
	Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu	
	85 90 95	
	Ser Ala Gly Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
	100 105 110	
	<210> 30	
10	<211> 375	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 30	

ES 2 406 429 T3

	caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtaagc cctcgacagac cctctcactc	60
	acctgtgcca tctccgggaa cagtgtctct agcaacagag ctgcttggaa ctggatcagg	120
	cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggc tcaggatgtat	180
	aatgattttg cagtatctgt gagaagtcga ataaccatca ccccagacac atccaagaac	240
	cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca	300
	agagatagga acagtggcta ctactactac gggttggacg tctggggcca agggaccacg	360
	gtcaccgtct cctca	375
	<210> 31	
	<211> 125	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 31	
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
	1	5 10 15
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn	
	20	25 30
	Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu	
	35	40 45
	Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Phe Ala	
	50	55 60
	Val Ser Val Arg Ser Arg Ile Thr Ile Thr Pro Asp Thr Ser Lys Asn	
	65	70 75 80
	Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val	
	85	90 95
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Asn Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu	
	100	105 110
	Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115	120 125
10	<210> 32	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 32	

ES 2 406 429 T3

aaaatagtga tgacgcagtc tccagctacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgttagt aacaacttag cctggtatca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc	180
agtttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcaccag cctacagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctctcac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 33

Lys Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly				
1	5	10	15	

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn				
20	25	30		

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile				
35	40	45		

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly				
50	55	60		

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser				
65	70	75	80	

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu				
85	90	95		

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
100	105			

<210> 34

<211> 375

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

ES 2 406 429 T3

	caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtaagc cctcgacagac cctctcactc	60
	acctgtgcca tctccgggaa cagtgtctct agcaacagag ctgcttggaa ctggatcagg	120
	cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggc tcaggatgtat	180
	aatgatcatg cagtatctgt gaaaagtgcga ataaccatca ccccagacac atccaagaac	240
	cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca aagctgtgta ttactgtgca	300
	agagatagga acagtggcta ctactactac ggttggacg tctggggcca agggaccacg	360
	gtcaccgtct cctca	375
	<210> 35	
	<211> 125	
	<212> PRT	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 35	
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
	1 5 10 15	
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn	
	20 25 30	
	Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu	
	35 40 45	
	Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp His Ala	
	50 55 60	
	Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Thr Pro Asp Thr Ser Lys Asn	
	65 70 75 80	
	Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Lys Ala Val	
	85 90 95	
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Asn Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu	
	100 105 110	
	Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115 120 125	
	<210> 36	
	<211> 321	
10	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 36	

gaaaatgtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagt aacaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcaccag cctacagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 37

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asn
				20				25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
				35			40					45			

Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
				50			55					60			

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Ser
				65			70			75			80		

Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Asn	Trp	Pro	Leu
				85				90					95		

Thr	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
				100					105					

<210> 38

<211> 473

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> quimera humano-ratón 1A1

<400> 38

ES 2 406 429 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly
35 40 45

Tyr Asn Phe Ile Ser His Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Met Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
65 70 75 80

Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys
85 90 95

ES 2 406 429 T3

Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Arg Ser Leu Lys Ala Ser Asp
100 105 110

Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala Arg His Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr
115 120 125

Phe Tyr Tyr Asp Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
130 135 140

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
145 150 155 160

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
165 170 175

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
210 215 220

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
225 230 235 240

Lys Val Asp Lys Thr Val Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
245 250 255

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
290 295 300

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
 340 345 350

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
 355 360 365

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
 370 375 380

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro
 385 390 395 400

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
 405 410 415

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
 420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
 435 440 445

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 39

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Consenso de cadena ligera

<220>

<221> característica_misclánea

10 <222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Thr o Met

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (25)..(25)

15 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (33)..(33)

<223> Xaa puede ser Ser o Tyr

20 <220>

<221> característica_misclánea

<222> (44)..(44)

5 <223> Xaa puede ser Leu o Val
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (49)..(49)
 5 <223> Xaa puede ser Arg o Lys
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (51)..(51)
 <223> Xaa puede ser Thr o Ser
 10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu
 15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (93)..(93)
 <223> Xaa puede ser Asn o Gly
 <220>
 <221> característica_misclánea
 20 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa puede ser Ala o Ser
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (96)..(96)
 25 <223> Xaa puede ser Tyr o ninguno
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (104)..(104)
 <223> Xaa puede ser Arg o Lys
 30 <400> 39
 Ser Tyr Glu Leu Xaa Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Xaa Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30

 Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Xaa Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

 Xaa Asp Xaa Glu Arg Pro Ser Gly Xaa Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (111)..(111)
 <223> Xaa puede ser Tyr o Phe

5 <400> 40

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Xaa Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Xaa Phe Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Xaa Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Xaa Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Xaa Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Xaa Cys
 85 90 95

Ala Arg His Xaa Gly Ile Thr Gly Thr Thr Phe Tyr Tyr Asp Xaa Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Consenso de cadena ligera

<220>

<221> característica_misclánea

15 <222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser Lys o Glu

<400> 41

ES 2 406 429 T3

Xaa Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Consenso de cadena pesada

<220>

<221> característica_misclánea

10 <222> (63)..(63)

<223> Xaa puede ser Phe o His

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (68)..(68)

15 <223> Xaa puede ser Arg o Lys

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (94)..(94)

<223> Xaa puede ser Thr o Lys

20 <400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

ES 2 406 429 T3

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Xaa Ala
50 55 60

Val Ser Val Xaa Ser Arg Ile Thr Ile Thr Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Xaa Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Asn Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43

<211> 256

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Flag/constructo de Fc

<400> 43

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Lys Thr
20 25 30

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
35 40 45

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
50 55 60

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
65 70 75 80

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
85 90 95

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

ES 2 406 429 T3

100

105

110

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
115 120 125

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
130 135 140

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
145 150 155 160

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
165 170 175

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
180 185 190

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
195 200 205

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
210 215 220

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
225 230 235 240

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250 255

REIVINDICACIONES

1. Una proteína ligante de antígeno aislada que tiene una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo la cadena pesada una región variable que tiene una identidad de al menos 95% con respecto a la ID. SEC. nº 9, y comprendiendo la cadena ligera una región variable que tiene una identidad de al menos 95% con respecto a la ID. SEC. nº 11, en donde la proteína ligante de antígeno se une a PAR2 humano no escindido y se une en menor grado a PAR2 humano escindido.
2. Una proteína ligante de antígeno aislada que tiene una cadena ligera y una cadena pesada, comprendiendo la cadena ligera una región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 39, y comprendiendo la cadena pesada una región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 40, en donde la proteína ligante de antígeno se une a PAR2 humano no escindido y se une en menor grado a PAR2 humano escindido.
3. La proteína ligante de antígeno de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en donde la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en la ID. SEC. nº 11, la ID. SEC. nº 15 y la ID. SEC. nº 19, y la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en la ID. SEC. nº 9, la ID. SEC. nº 13 y la ID. SEC. nº 17.
4. La proteína ligante de antígeno de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, seleccionada del grupo que consiste en
- 20 a) una proteína ligante de antígeno en donde la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 11, y la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 9;
- b) una proteína ligante de antígeno en donde la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 15, y la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 13; y
- 25 c) una proteína ligante de antígeno en donde la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 19, y la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 17.
5. La proteína ligante de antígeno de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, comprendiendo la cadena pesada tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) denominadas CDR1, CDR2 y CDR3, y comprendiendo la cadena ligera tres regiones determinantes de la complementariedad denominadas CDR1, CDR2 y CDR3, en donde
- 30 a) la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 31 a 35 de la ID. SEC. nº 9, los aminoácidos 31 a 35 de la ID. SEC. nº 13 y los aminoácidos 31 a 35 de la ID. SEC. nº 17;
- b) la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 50 a 66 de la ID. SEC. nº 9, los aminoácidos 50 a 66 de la ID. SEC. nº 13 y los aminoácidos 50 a 66 de la ID. SEC. nº 17; y
- 35 c) la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 99 a 115 de la ID. SEC. nº 9, los aminoácidos 99 a 115 de la ID. SEC. nº 13 y los aminoácidos 99 a 115 de la ID. SEC. nº 17; y
- 40 a') la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 23 a 33 de la ID. SEC. nº 11, los aminoácidos 23 a 33 de la ID. SEC. nº 15 y los aminoácidos 23 a 33 de la ID. SEC. nº 19;
- b') la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 49 a 55 de la ID. SEC. nº 11, los aminoácidos 49 a 55 de la ID. SEC. nº 15 y los aminoácidos 49 a 55 de la ID. SEC. nº 19; y
- 45 c') la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 88 a 97 de la ID. SEC. nº 11, los aminoácidos 88 a 97 de la ID. SEC. nº 15 y los aminoácidos 88 a 97 de la ID. SEC. nº 19.
- 50 6. La proteína ligante de antígeno de la Reivindicación 5, comprendiendo además la cadena pesada de una a cuatro regiones de armazón (FRs) denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4, y comprendiendo además la cadena ligera de una

a cuatro regiones de armazón denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4, en donde

a) la FR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1 a 30 de la ID. SEC. nº 9, los aminoácidos 1 a 30 de la ID. SEC. nº 13 y los aminoácidos 1 a 25 de la ID. SEC. nº 17;

5 b) la FR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 36 a 49 de la ID. SEC. nº 9, los aminoácidos 36 a 49 de la ID. SEC. nº 13 y los aminoácidos 36 a 49 de la ID. SEC. nº 17;

10 c) la FR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 67 a 98 de la ID. SEC. nº 9, los aminoácidos 67 a 98 de la ID. SEC. nº 13 y los aminoácidos 67 a 98 de la ID. SEC. nº 17; y

d) la FR4 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 116 a 126 de la ID. SEC. nº 9, los aminoácidos 116 a 126 de la ID. SEC. nº 13 y los aminoácidos 116 a 126 de la ID. SEC. nº 17; y

15 a') la FR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1 a 22 de la ID. SEC. nº 11, los aminoácidos 1 a 22 de la ID. SEC. nº 15 y los aminoácidos 1 a 22 de la ID. SEC. nº 19;

b') la FR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 34 a 48 de la ID. SEC. nº 11, los aminoácidos 34 a 48 de la ID. SEC. nº 15 y los aminoácidos 34 a 48 de la ID. SEC. nº 19;

20 c') la FR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 56 a 87 de la ID. SEC. nº 11, los aminoácidos 56 a 87 de la ID. SEC. nº 15 y los aminoácidos 56 a 87 de la ID. SEC. nº 19; y

d') la FR4 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 98 a 107 de la ID. SEC. nº 11, los aminoácidos 98 a 107 de la ID. SEC. nº 15 y los aminoácidos 98 a 107 de la ID. SEC. nº 19.

7. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína ligante de antígeno de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde el ácido nucleico es opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en:

a) un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 10, y un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 8;

30 b) un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 12, y un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 14; y

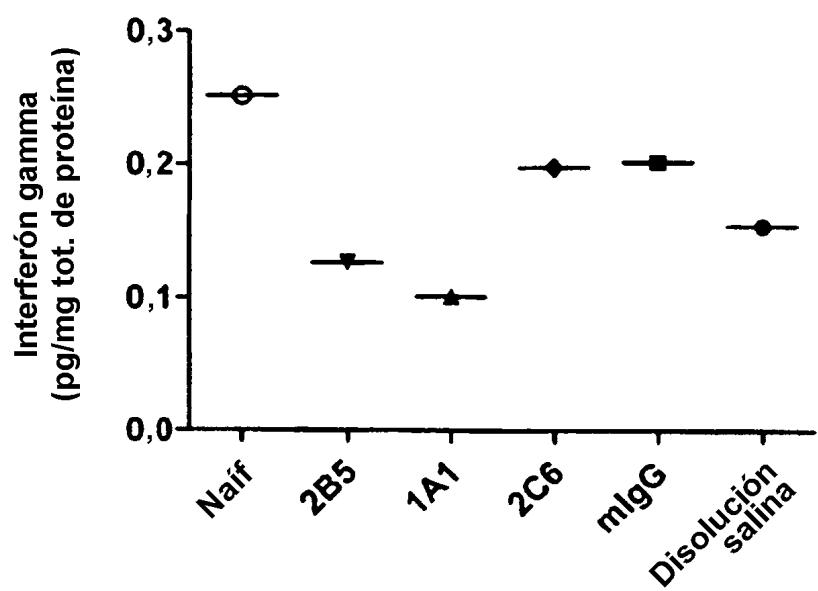
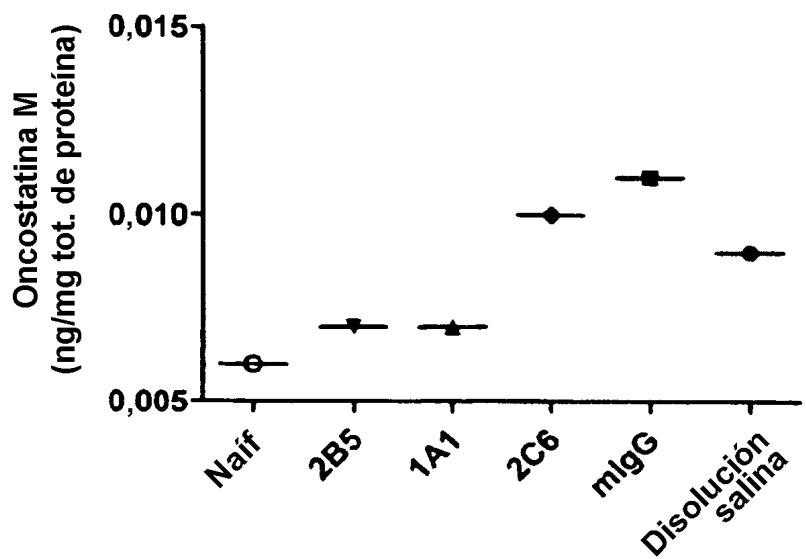
c) un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 16, y un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 18.

8. Un vector que comprende un ácido nucleico según la Reivindicación 7.

35 9. Una célula huésped aislada, transfectada o transformada con el vector de la Reivindicación 8.

10. Un método para la producción de una proteína ligante de antígeno, que comprende cultivar una célula huésped de la Reivindicación 9 bajo unas condiciones que promueven la expresión y recuperar la proteína del medio de cultivo.

40 11. Una composición que comprende un polipéptido de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 y un diluyente, excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable.

**FIG 1A****FIG 1B**

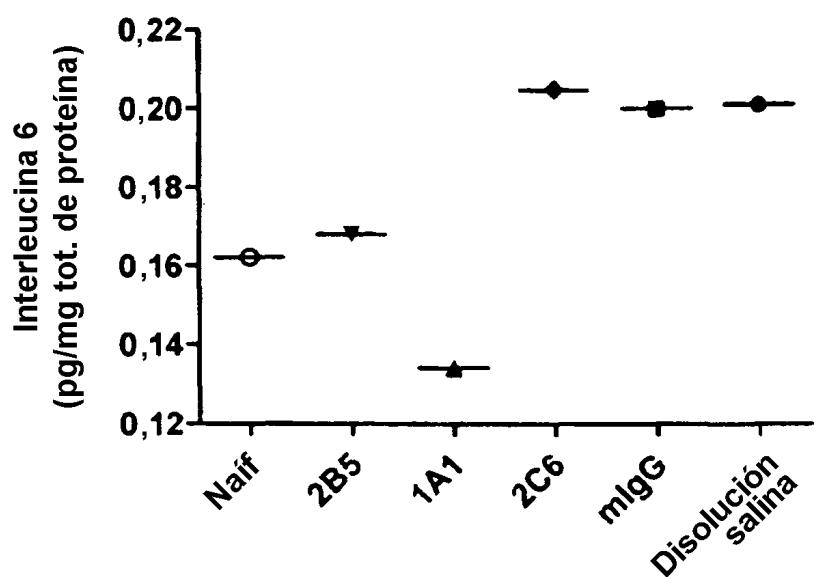


FIG 1C

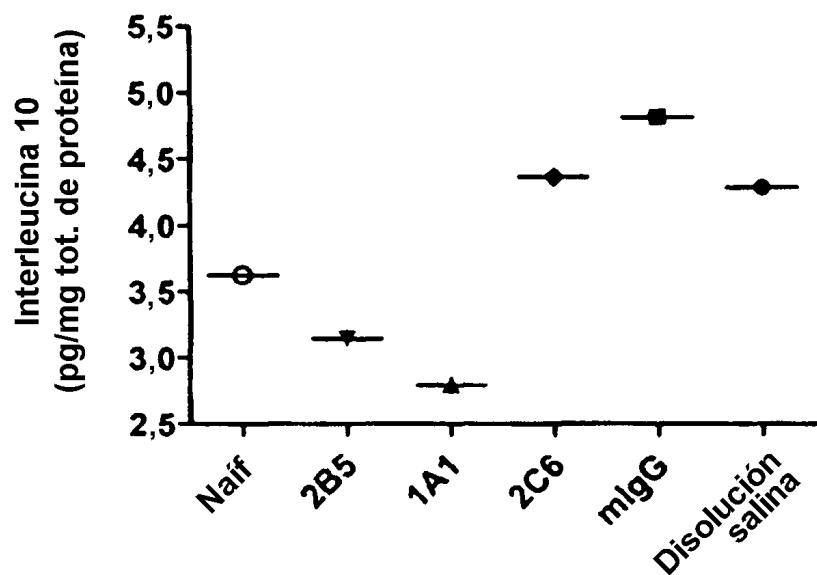


FIG 1D