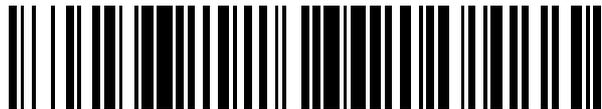


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 892**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 07763386 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1981913**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a PAR-2**

30 Prioridad:

10.02.2006 US 772456 P

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

15.07.2014

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 2 476 892 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

Anticuerpos que se unen a PAR-2

Campo de la invención

Esta solicitud proporciona composiciones y métodos relativos a anticuerpos anti-PAR-2.

5 Antecedentes de la invención

La familia de receptores activados por proteinasas (PAR; del inglés, proteinase-activated receptors) 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.

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. n° 2), que está conservado entre los PAR-2 humano, murino y de rata. Se ha mostrado que péptidos que remedan 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)].

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

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una transferencia Western en que se compara la unión de varios anticuerpos PAR-2 a PAR-2 de longitud completa frente a PAR-2 cortado/Fc.

La Figura 2 demuestra esa capacidad de un anticuerpo PAR-2 para producir antagonismo de la activación de PAR-2 en un ensayo FLIPR, usando diversas células que expresan PAR-2.

La Figura 3 presenta los resultados de una transferencia Western para un anticuerpo PAR-2 antagónico así como para un anticuerpo que no produce antagonismo de PAR-2.

La Figura 4 compara esa capacidad de varios anticuerpos PAR-2 para producir antagonismo de la activación de PAR-2 en un ensayo FLIPR.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína ligante de antígeno aislada, como es definida por las reivindicaciones, que se une al receptor 2 activado por proteinasa (PAR-2). La proteína ligante de antígeno aislada, cuando se une a un PAR-2 humano, inhibe la escisión proteolítica y la subsiguiente señalización a través de dicho PAR-2 humano. La proteína ligante de antígeno aislada se une a PAR-2 de longitud completa y se une en menor grado a PAR-2 escindido.

En otro aspecto de la invención, la proteína ligante de antígeno aislada se une específicamente al PAR-2 de un primate no humano, un macaco cangrejero, un chimpancé, un mamífero no primate, un roedor, un ratón, una rata, un hámster, un cobayo, un gato o un perro. En otra realización, la proteína ligante de antígeno aislada comprende: un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo ligante de antígeno, un fragmento Fab, o un fragmento F(ab')₂.

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 permiten que exprese dicha proteína ligante de antígeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína ligante de antígeno. En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un estado de un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto dicha composición farmacéutica, en donde dicho estado es tratable por reducción de la actividad de PAR-2 en dicho sujeto. En otra realización, dicho sujeto es un ser humano. En otra realización, dicho estado es un estado inflamatorio de la piel, las articulaciones, el sistema gastrointestinal y/o las vías aéreas. El método puede comprender además administrar a dicho sujeto un segundo tratamiento. Dicho segundo tratamiento se administra a dicho sujeto antes de que, y/o simultáneamente con, y/o después de que, se administre dicha composición farmacéutica a dicho sujeto. Dicho segundo tratamiento puede comprender un agente antiinflamatorio. Dicha segunda composición farmacéutica comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos, esteroides, y agentes inmunomoduladores. Dicho método puede comprender administrar a dicho sujeto un tercer tratamiento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para disminuir la actividad de PAR-2 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto dicha composición farmacéutica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para disminuir la señalización de PAR-2 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto dicha composición farmacéutica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la activación proteolítica de PAR-2 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto dicha composición farmacéutica.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción 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 antagónicos. También se proporcionan 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, 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, métodos para preparar composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden una molécula que se une a PAR-2, y métodos para administrar una molécula que se une a PAR-2 a un sujeto, por ejemplo, métodos para tratar un estado mediado por PAR-2 y para producir agonismo o antagonismo de una actividad biológica de PAR-2, *in vivo* o *in vitro*.

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 aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en este campo técnico. Los métodos y técnicas 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", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), y 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, del modo habitualmente realizado en este campo técnico, o del modo descrito en esta memoria. La terminología usada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y las 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 las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación, formulación y distribución farmacéuticas, y el 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 encuentra en la naturaleza. 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 muteínas, variantes, y proteínas de fusión) de una secuencia proteica, así como proteínas postraduccionalmente, 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 incluyen polipéptidos que han sido modificados de algún modo y por alguna 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 muteínas 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 encuentra en la secuencia originaria ni a alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia originaria 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 solicitud 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 Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992)], 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 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 muteínas 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 utilizando componentes de unión a fibronectina como un andamio.

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 aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, esencialmente responsable del reconocimiento antigénico. La porción carboxilo-terminal de cada cadena tiene una 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 epsilon, 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 aminoácidos más. Véase, en general, "Fundamental Immunology", capítulo 7 [redactado por W. Paul, 2ª 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.

Las cadenas inmunoglobulínicas presentes en la naturaleza muestran la misma estructura general de regiones de armazón (FR; del inglés, *framework regions*) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs (del inglés, *complementarity determining regions*). 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*, 5ª edición, US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, Publicación nº 91-3242 del NIH, 1991.

Se pueden obtener anticuerpos presentes en la naturaleza de fuentes, tales como suero y plasma, que contienen inmunoglobulinas que tienen una especificidad antigénica variada. Si dichos anticuerpos son sometidos a una purificación por afinidad, pueden resultar enriquecidos en cuanto a una especificidad antigénica 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. A los anticuerpos preparados de esta manera se hace a menudo referencia como "monoespecíficos".

Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una porción ligante de antígeno de la misma que compete 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 quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir una unión antigénica específica al polipéptido.

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, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507 y 03/0039958, Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989).

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 aparee 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. 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. en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, Publicación nº 91-3242 del NIH, 1991. 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) CDR(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.

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.

La expresión "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes procedentes 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.

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, para producir el anticuerpo humanizado se mutan ciertos aminoácidos del armazón y de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo de especie no humana. 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 inmuno-específica 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.

La expresión "anticuerpo quimérico" 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 quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico 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. 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 quimérico, 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.

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 encuentran 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 de prevista conformación proteica que se encuentran 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 epítipo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un "anticuerpo biespecífico" que reconoce dos epítipos 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", una "región ligante de antígeno" o un "sitio ligante de antígeno" es una porción de una proteína ligante de antígeno que contiene restos de aminoácido (u otros componentes) que interactúan 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 "epítipo" es la porción de una molécula a la que se une una proteína ligante de antígeno (por ejemplo, un anticuerpo). Un epítipo 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 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 encuentran 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 desapareados 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 regulativa si la secuencia regulativa afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, la regulación temporal, o la posición de la expresión) de la secuencia nucleotídica. Una "secuencia regulativa" 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 unido. Por ejemplo, la secuencia regulativa 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 regulativa y/o el ácido nucleico). Los ejemplos de secuencias regulativas 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 regulativas.

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 procarionte, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser un eucarionte, por ejemplo, un eucarionte 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 regulativa 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. n° 3 y la del PAR-2 de rata se muestra en la ID. SEC. n° 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

En un aspecto, la presente descripción proporciona proteínas ligantes de antígeno (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo, muteínas de anticuerpo y variantes de anticuerpo) que se unen

a PAR-2, por ejemplo, a PAR-2 humano.

Las proteínas ligantes de antígeno de acuerdo con la presente descripción 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 epítomos de PAR-2 o actuar mediante diferentes mecanismos de acción. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, proteínas ligantes de 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 que se unen a PAR-2 en el tratamiento de enfermedades particulares son sólo ilustrativas, y los métodos presentados en esta memoria no están vinculados a ellas).

Otros derivados de anticuerpos anti-PAR-2 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 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 epítipo 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, St. Louis, Missouri) de reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que esté fusionado el péptido FLAG con un polipéptido dado.

Como antagonistas de PAR-2 se pueden emplear oligómeros que contienen una o más proteínas ligantes de antígeno. 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, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc.

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.

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 en 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.

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.

Una realización 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.

La expresión "polipéptido de Fc", como se usa en esta memoria, incluye formas nativas y muteínicas 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.

Un polipéptido de Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151 (incorporada por referencia en esta memoria), 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 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 oligómeras 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 oligómeras 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, documentos incorporados por referencia en esta memoria. 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 oligómeros solubles de anticuerpo anti-PAR-2 que se forman.

En un aspecto, la presente descripción 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 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 las 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, varios ejemplos de los cuales se describen en esta memoria, incluyen aquellos en que se compara cualitativa o cuantitativamente la unión de una proteína ligante de antígeno a un polipéptido PAR-2 maduro de longitud completa, con la unión de aquélla a un polipéptido PAR-2 proteolíticamente escindido.

En otro aspecto, la presente descripción 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+} .

- 5 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.

10 En otro aspecto, la presente descripción 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 infrarregulación relativamente pequeña del PAR-2 expresado en la superficie celular.

15 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 $F(ab')_2$. También se contemplan fragmentos y derivados de anticuerpo producidos mediante técnicas de ingeniería genética.

20 Realizaciones adicionales incluyen anticuerpos quiméricos, 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 antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y otros genéticamente modificados incluyen los descritos por 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 quimérico es un anticuerpo con CDR injertado. En, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 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.

30 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. 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, Advanced Drug Delivery Reviews 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, M. Trounstein, F. W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J. Loring, D. Huszar, "Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus", International Immunology 5 (1993): 647-656; Choi et al., 1993, Nature Genetics 4: 117-23, Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 845-51, Harding et al., 1995, Annals of the New York Academy of Sciences, 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, Internal. Reviews of Immunology 13: 65-93, Neuberger, 1996, Nature Biotechnology 14: 826, Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Research 20: 6287-95, Taylor et al., 1994, International Immunology 6: 579-91, Tomizuka et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-43, Tomizuka et al., 2000, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 722-27, Tuaille et al., 1993, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 90: 3720-24, y Tuaille et al., 1994, Journal of Immunology 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.

60 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 a un vector vírico (tal como un vector adenovírico) un ácido nucleico que codifica el antígeno de interés. 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.

La evolución molecular de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) en el centro del sitio ligante del anticuerpo ha sido empleada para aislar anticuerpos con una afinidad aumentada, por ejemplo, anticuerpos que tienen una afinidad aumentada por c-erB-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 inmunoafinidad. Aquellas proteínas ligantes de antígeno que pueden bloquear además la activación proteolítica de PAR-2 pueden ser usadas para inhibir una actividad biológica que resulte 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 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 aquéllas 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, tal 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 *in vitro* y basadas en cultivo celular, o en cualquier otra aplicación donde no se produzca, sea insignificante, se pueda evitar, no sea un asunto de interés o se desee, una respuesta inmune al anticuerpo de la invención. En una realización, se administra un anticuerpo no humano 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 quimérico 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).

Para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención se puede usar cualquier sistema de expresión conocido en la técnica. 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 procariontes, levaduras y células eucarióticas superiores. Los procariontes 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 bacteria, hongo, levadura y mamífero.

Las células transformadas pueden ser cultivadas bajo unas condiciones que promuevan la expresión del polipéptido, y el polipéptido puede ser recuperado mediante procedimientos convencionales para purificación de proteínas. Uno de dichos procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad, por ejemplo, sobre 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 descripción proporciona fragmentos ligantes de antígeno de un anticuerpo anti-PAR-2. 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 de un 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 epítomos 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) 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 isotipo diferente 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: 303-16. Además, si se desea una IgG4, puede ser también deseable introducir una mutación puntual (CPSCP --> CPPCP) en la región bisagra, como describen Bloom et al., 1997, *Protein Science* 6: 407, 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 lo que a menudo se hace referencia como "presentación en fagos". Se ha utilizado la barajadura de cadenas para preparar anticuerpos de alta afinidad por el hapteno 2-feniloxazol-5-ona, como describen Marks et al., 1992, *BioTechnology* 10: 779.

En realizaciones particulares, las proteínas ligantes de antígeno 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.

Se describe 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.

Otro aspecto 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.

Otra realización 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% menos de lo que se une al PAR-2 escindido.

Otro aspecto proporciona una proteína ligante de antígeno que se une a, o cerca de, el sitio de escisión por proteasas del PAR-2 humano. Se pueden preparar proteínas ligantes de antígeno que se unan al sitio de escisión por proteasas usando cualquier técnica conocida en este campo técnico. Por ejemplo, dichas proteínas ligantes de antígeno pueden ser aisladas usando el polipéptido PAR-2 de longitud completa (por ejemplo, en una preparación unido a membranas), un fragmento soluble de dominio extracelular de PAR-2, o un fragmento más pequeño del dominio extracelular de PAR-2 que comprende, o consiste en, el sitio de escisión por proteasas (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).

Otra realización 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 epítipo 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.

Otro aspecto 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 proteasas 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.

Otro aspecto 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 descripción 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 epítipo de PAR-2 y un epítipo 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. 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. n° 4.474.893 y Patente de EE.UU. n° 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. n° 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; Kostelny 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. n° 5.582.996. Técnicas útiles adicionales incluyen las descritas en Kortt et al., 1997, *supra*; la Patente de EE.UU. n° 5.959.083 y la Patente de EE.UU. n° 5.807.706.

En otro aspecto, la proteína ligante de antígeno 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, de 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 compuesto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(N-vinilpirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxietilados y poli(alcoholes

vinílicos) (Solicitud de Patente de EE.UU. nº 20030195154.

Otro aspecto 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

Un aspecto 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, o un fragmento, derivado, muteína o variante del mismo, 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 regulativas, 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 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction).

Se proporcionan 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 prelavado 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 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).

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 mutado 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.

5 Otro aspecto 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.

10 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.

15 Otro aspecto 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.

Los vectores de expresión recombinantes 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 regulativas, 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 regulativas 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 regulativas 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 estreptomycin 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 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 Otro aspecto 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 de 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

En un aspecto, la presente descripción proporciona 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 servir, por ejemplo, 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 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, 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, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y similares.

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, gota, osteoartritis, polimialgia reumática, espondiloartropatías seronegativas, 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, polimiositis y linfangioleiomiomatosis.

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.

Las composiciones y/o métodos se pueden también utilizar, por ejemplo, en tratamientos cosméticos, en tratamientos veterinarios, para aumentar la longevidad, para tratar defectos 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 implican poner PAR-2 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 todo síntoma o manifestación 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 morbozo 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 mejoría continua 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.

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.

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.

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, 16ª edición (1980) y 20ª edición (2000), Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, se presentan más ejemplos de componentes que se pueden emplear en formulaciones farmacéuticas.

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.

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.

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, por ejemplo, de una a seis semanas. En general, la proteína ligante de antígeno se administra hasta que el paciente manifiesta un grado médicamente relevante de mejoría con respecto a la línea de base del indicador o los indicadores elegidos.

Realizaciones particulares 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 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 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 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 periodos más prolongados para provocar el grado deseado de mejoría. 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.

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, 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 subcutánea o intravenosa de una dosis de 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 o 20 miligramos de un 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 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 mejoría, preferiblemente una mejoría continua, en al menos un indicador que 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 la enfermedad, síntomas, o manifestaciones del trastorno en cuestión. En una realización se considera que una mejoría es continua si el sujeto presenta la mejoría en al menos dos ocasiones separadas por un periodo de dos a cuatro semanas. El grado de mejoría 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 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.

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 de la enfermedad y 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.

Realizaciones particulares de métodos y composiciones 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 para tratar el estado que afecta al paciente. Los ejemplos de tales agentes incluyen fármacos tanto proteicos como 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.

Los ejemplos de otros agentes que se pueden coadministrar con una proteína ligante de antígeno son otras proteínas ligantes de antígeno y 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

Otro aspecto 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 una 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 activar (según sea apropiado) múltiples centros en una sola vía relacionada con la enfermedad, múltiples vías en una célula diana y múltiples tipos celulares en un tejido diana.

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

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 prevenir el estado que se trata. En una realización, una o más de las moléculas y/o tratamientos trata(n) o evita(n) 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 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.

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 ha de entender 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.

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 pueden emplear polipéptidos de PAR-2 como inmunógenos para generar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante técnicas descritas en la Patente de EE.UU. n° 5.599.905. En este campo técnico se conocen técnicas adicionales, tal como, por ejemplo, la estrategia de Inmunizaciones Repetitivas en Múltiples Sitios (RIMMS; del inglés, Repetitive Immunizations Multiple Sites) (Kilpatrick et al., *Hybridoma* 16 (4): 381-9, 1997). Se reconoce que como inmunógenos se pueden emplear polipéptidos en distintas formas, por ejemplo, proteínas de longitud completa, fragmentos de las mismas, proteínas de fusión tales como fusiones de Fc, células que expresan la proteína recombinante en la superficie celular, etc.

Para resumir un ejemplo de dicho procedimiento, un péptido del bucle 1 de PAR-2 (TNRSSKGRSLIGKVDGTS; aminoácidos 29 a 46 de la ID. SEC. n° 2), que tiene un resto de cisteína C-terminal adicional para facilitar la conjugación, es conjugado con hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH; del inglés, keyhole limpet hemocyanin; obtenible, por ejemplo, de Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois), activada con maleimida, para obtener un inmunógeno de PAR-2. Para una primera inmunización, se emulsionan 100 microgramos de inmunógeno (que contiene 50 microgramos de péptido) en adyuvante completo de Freund (CFA; del inglés, complete Freund's adjuvant) en relación volúmica 1:1 y se inyectan subcutáneamente en un volumen final de 200 microlitros a cada ratón.

Los animales inmunizados son estimulados de tres a cuatro veces más con inmunógeno adicional para aumentar la respuesta específica al antígeno, a intervalos de dos a cuatro semanas (aunque se pueden emplear intervalos mayores). Por ejemplo, se inyecta subcutáneamente a cada ratón, aproximadamente cuatro semanas después de la inmunización primaria, una segunda inyección de 50 microgramos de inmunógeno (que contiene 25 microgramos de péptido) mezclado con adyuvante incompleto de Freund en un volumen final de 200 μ l. Se puede administrar por vía subcutánea y/o intraperitoneal, de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 días después de la segunda inyección, una tercera inyección (20 microgramos de inmunógeno que contiene 10 microgramos de péptido, mezclado con un adyuvante tal como adyuvante Ribi). Si se desea, se puede administrar por vía subcutánea y/o intraperitoneal, de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 días después de la tercera inyección, una cuarta inyección (20 microgramos de inmunógeno que contiene 10 microgramos de péptido, mezclado con adyuvante incompleto de Freund). Se administra una inyección final por vía intraperitoneal, normalmente aproximadamente cinco días antes de la fusión, utilizando 50 microgramos de inmunógeno que contiene 25 microgramos de péptido en PBS.

Para evaluar el título de anticuerpos, se pueden tomar periódicamente muestras de suero por sangría retroorbital o escisión en la punta de la cola para ensayo mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) para péptidos u otro ensayo adecuado. En el momento de la fusión, se sacrifican los animales y se recogen esplenocitos y se fusionan con la línea celular SP2/O de mieloma murino (ATCC CRL 1581) u otra línea celular adecuada, varias de las cuales son conocidas en la técnica. Las líneas celulares de hibridoma resultantes son sembradas en múltiples placas para microtitulación, en medio selectivo HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina), para facilitar la proliferación de células híbridas de célula esplénica-mieloma.

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 Fiscella 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 a 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).

Los hibridomas seleccionados pueden ser adicionalmente clonados y examinados para asegurar la producción estable de anticuerpo monoclonal. Los hibridomas pueden ser cultivados *in vitro*, o subcultivados como fluido ascítico en mamíferos huésped adecuados. Los anticuerpos monoclonales resultantes pueden ser purificados mediante precipitación con sulfato amónico seguida de cromatografía de exclusión en gel, y/o mediante cromatografía de afinidad basada, por ejemplo, en la unión del anticuerpo a proteína G. Se generaron diversos hibridomas y se examinaron en cuanto a la unión en un ELISA con células completas usando células que expresaban PAR-2, y en un ensayo de resolución rápida en placa; los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

ID del clon	Unión	Bloqueo en ensayo de resolución rápida
n° 47	+	+
n° 21	+	no disponible
n° 48	+	+
n° 6	+	+
n° 15	+	no disponible
n° 13	+	+/-
n° 49	+	+
n° 10	+	-
n° 46	+	+/-

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 obtener una muestra de aproximadamente 35 ml de fluido sobrenadante de hibridoma. 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 μ l 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 μ l del fluido sobrenadante y se resuspende la resina para formar una suspensión concentrada.

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).

Después de tres lavados, se resuspende el sedimento de centrifugación en 400 μ l 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_f) 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 y transferencia Western del polipéptido PAR-2/Fc

Se hace que se exprese el polipéptido PAR-2 N-terminal de longitud completa/Fc (ID. SEC. n° 5) en células CHO. Los sobrenadantes de expresión de las células de expresión CHO cultivadas en medios exentos de suero contienen 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 de longitud completa/Fc en los sobrenadantes de los cultivos. Tanto las proteínas recortadas como las de longitud completa son purificadas usando la resina MabSelect™, sustancialmente del modo previamente descrito (véase el Ejemplo 2). Las construcciones de Fc purificadas resultantes son analizadas por análisis amino-terminal de secuencias (degradación de Edman), cromatografía de exclusión por tamaños, barrido espectral de absorbancias, y espectrometría de masas.

Se someten diversas cantidades de PAR-2 N-terminal de longitud completa y recortado/Fc purificado a SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 8-16% en gradiente (geles Novex, Invitrogen Life Technologies) en un sistema 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. Después 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 tampón de bloqueo Odyssey (OBB; del inglés, Odyssey blocking buffer) (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 4: Comparación de anticuerpos PAR-2

Se examinaron varios anticuerpos PAR-2 en diferentes formatos de ensayo; en la Tabla 2 se resumen los resultados.

Tabla 2

N° de ID del clon	IC ₅₀ (preclonación)	Unión al sitio de escisión	
		Cadena arriba	Cadena abajo
47	8 nM	xxx	–
49	35 nM	xx	–
6	40 nM	xx	–
13	50 nM	xx	–
15	50 nM	xx	–
48	60 nM	xx	–
10	> 1 mM	xx	xxx
46	> 0,5 mM	xxx	xx

Se determinaron los valores de IC₅₀ mediante el ensayo FLIPR para movilización de Ca²⁺ previamente descrito; se determinó la unión a la región cadena arriba del sitio de escisión frente a la región cadena abajo del sitio de escisión usando el ensayo por transferencia Western previamente descrito. En la Figura 1 se muestran resultados más detallados para un anticuerpo seleccionado. En la Figura 2 se presentan resultados de transferencias Western en que se analizaron varios anticuerpos por transferencia Western frente al PAR-2 escindido (indicado "clip")/Fc y el PAR-2 de longitud completa (indicado FL; del inglés, full-length)/Fc. En la Figura 3 se presentan resultados adicionales de transferencias Western y también comparaciones de las características de dos anticuerpos monoclonales que presentan un contraste en el reconocimiento de PAR-2 de longitud completa frente al recortado/Fc, que, como se detalla en la transparencia, se corresponde con la capacidad para producir antagonismo

sobre PAR-2. De este modo, el clon 10 era un débil antagonista en un ensayo de resolución rápida en placa, se unía a células que expresan PAR-2 humano (células HCT116), y a células CHO transfectadas con PAR-2 por medio de FACS, pero no a células CHO originarias, y se unía a las versiones tanto recortada como de longitud completa de PAR-2/Fc por transferencia Western. Por contraste, el clon 33 era un potente antagonista en un ensayo de resolución rápida en placa, se unía a células que expresan PAR-2 humano (células HCT116), y a células CHO transfectadas con PAR-2 por medio de FACS, pero no a células CHO originarias, y sólo se unía a la versión de longitud completa de PAR-2/Fc por transferencia Western.

Ejemplo 5: Comparación de subclones de anticuerpos PAR-2

Se subclonaron diversos anticuerpos PAR-2 y se examinaron en cuanto a la capacidad para inhibir la activación de PAR-2 inducida por tripsina; en la Tabla 3 se resumen los resultados.

Tabla 3

Nº de ID del clon	IC ₅₀	IC ₅₀
	HCT-116	KNRK
13-8 prep 1	8 nM	471 nM
13-8 prep 2	12 nM	188 nM
6-6	3 nM	1556 nM
21-5	8 nM	340 nM
47.6	2 nM	254 nM
47.7	2 nM	48 nM
49.2	5 M	152 nM
SAM11	> 2 µM	> 2 µM

Se determinaron los valores de IC₅₀ mediante un ensayo FLIPR en que se controla la movilización de Ca²⁺, del modo previamente descrito, usando células que expresan endógenamente PAR-2 humano (HCT-116) o células KNRK de rata establemente transfectadas que expresan PAR-2 (KNRK-PAR2). Se usaron dos preparaciones de purificación diferentes del subclón 13-8; una (prep nº 1) fue cultivada y purificada a una escala mayor que la previamente descrita, pero sustancialmente de la misma manera. SAM11 es un anticuerpo monoclonal comercialmente asequible hacia PAR-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, EE.UU.), generado contra la secuencia del ligando atado de PAR-2 humano. En las transferencias Western en que se usaron las formas recortada y de longitud completa de PAR-2 (previamente descritas), SAM11 se unía a las versiones tanto recortada como de longitud completa de PAR-2/Fc, lo que confirma que el epítipo del anticuerpo SAM11 está cadena abajo del sitio de escisión por proteasas. En la Figura 4 se muestran los resultados de un experimento similar usando células HCT-116. En este experimento también se incluye un antisuero mono específico policlonal generado contra el péptido de 16 monómeros del bucle 1, descrito en el Ejemplo 1.

25

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> ANTICUERPOS QUE SE UNEN A PAR-2

<130> A-1099-WO-PCT

<140> --para ser cedida--

<141> 2007-02-09

<150> 60/772.456

<151> 2006-02-10

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1194

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1191)

<400> 1

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 ctg acc act gtc ttc ctt cca att 240
 Ser Ala Ser Val Leu Thr Gly Lys Leu Thr Thr Val Phe Leu Pro Ile
 65 70 75 80

gtc tac aca att gtg ttt gtg gtg ggt ttg cca agt aac ggc atg gcc 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 gtg att 336
 Leu Trp Val Phe Leu Phe Arg Thr Lys Lys Lys His Pro Ala Val Ile
 100 105 110

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

ES 2 476 892 T3

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	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	Tyr	Phe	Val	Ser	His	Asp	Phe	Arg	
			340					345					350			
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				

ES 2 476 892 T3

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 Ser Thr Thr Val Lys Thr Ser Tyr
 385 390 395

<210> 3
 <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

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 Ser Thr Ser Val Lys Thr Ser Tyr
 385 390 395

<210> 4
 <211> 397
 <212> PRT
 <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

Thr Gly Lys Gly Ala Pro Val Glu Pro Gly Phe Ser Val Asp Glu Phe

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
<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
ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc 288
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
85 90 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 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
 145 150 155 160

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 cgg 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
 225 230 235 240

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
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Arg Ser Pro Ser Ala Ala Trp Leu Leu Gly Ala Ala Ile Leu Leu

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
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

<400> 7

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

Express Mail No.: EV 947188127 US

1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína ligante de antígeno aislada, que es un anticuerpo monoclonal, que se une al receptor 2 activado por proteinasas (PAR-2) y produce antagonismo de la activación proteolítica del mismo, en donde la proteína ligante de antígeno aislada se une al PAR-2 de longitud completa que se expone en la ID. SEC. nº 2 y se une en menor grado al PAR-2 que se expone en la ID. SEC. nº 2 cuando es escindido entre R36 y S37.
2. La proteína ligante de antígeno aislada de la Reivindicación 1, que se une específicamente al PAR-2 de un primate no humano, un macaco cangrejero, un chimpancé, un mamífero no primate, un roedor, un ratón, una rata, un hámster, un cobayo, un gato o un perro.
- 10 3. La proteína ligante de antígeno aislada de la Reivindicación 1, en donde dicha proteína ligante de antígeno comprende:
- a. un anticuerpo humanizado;
 - b. un anticuerpo quimérico;
 - c. un fragmento de anticuerpo, ligante de antígeno;
 - d. un fragmento Fab; o
 - 15 e. un fragmento F(ab')₂.
4. Una célula aislada que secreta una proteína ligante de antígeno de la Reivindicación 1, en donde la célula es un hibridoma.
5. Un método para preparar una proteína ligante de antígeno que se une a PAR-2, que comprende incubar la célula aislada de la Reivindicación 4 bajo unas condiciones que la permiten expresar la proteína ligante de antígeno.
- 20 6. Una composición farmacéutica que comprende la proteína ligante de antígeno de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.
7. La composición farmacéutica de la Reivindicación 6 para uso en el tratamiento de un estado de un sujeto, en donde el estado es tratable por reducción de la actividad de PAR-2 en el sujeto.
8. La composición de la Reivindicación 7, en donde el sujeto es un ser humano.
- 25 9. La composición de la Reivindicación 8, en donde dicho estado es seleccionado del grupo que consiste en estados inflamatorios de la piel, las articulaciones, el sistema gastrointestinal y/o las vías aéreas.
10. La composición de la Reivindicación 8, en donde la reducción de la actividad de PAR-2 en el sujeto es por disminución de la señalización de PAR-2 en el sujeto.

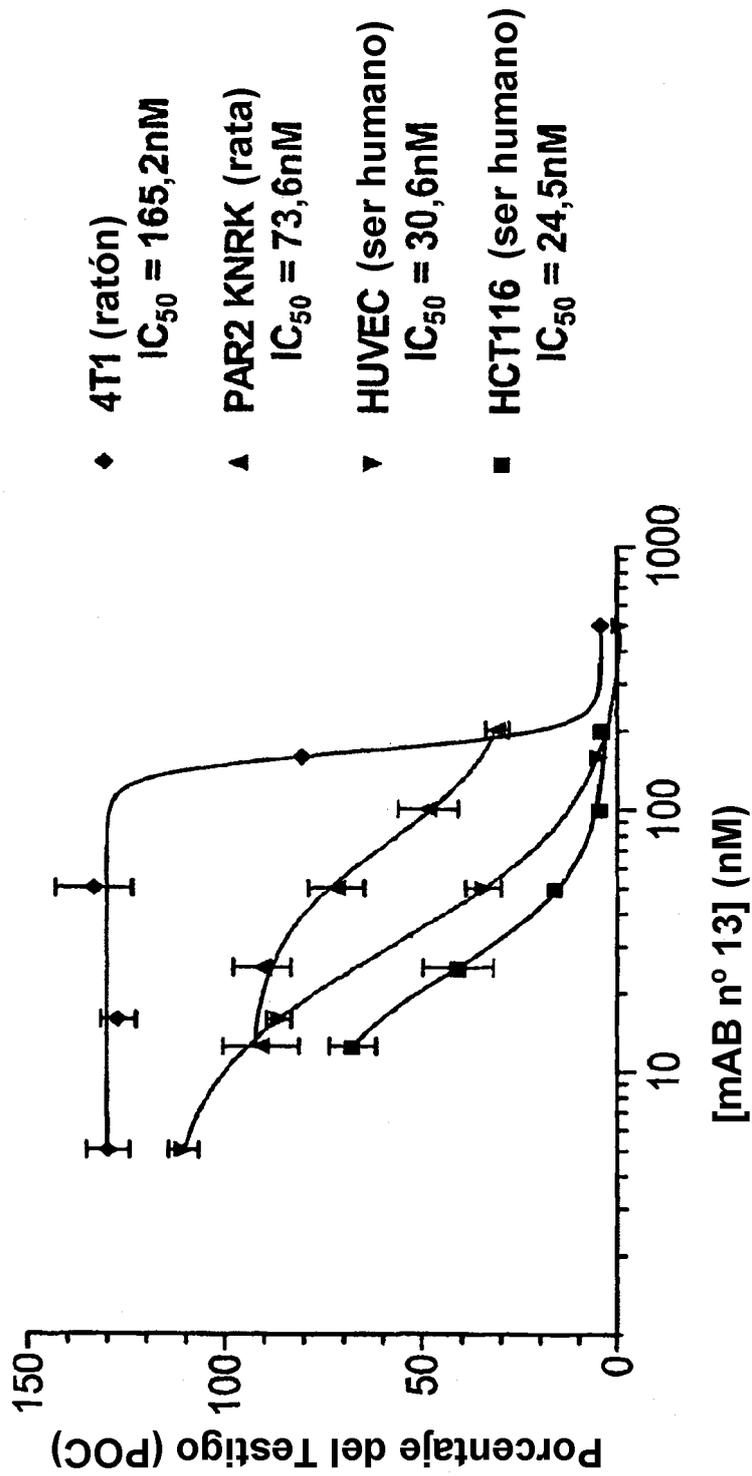


Figura 1

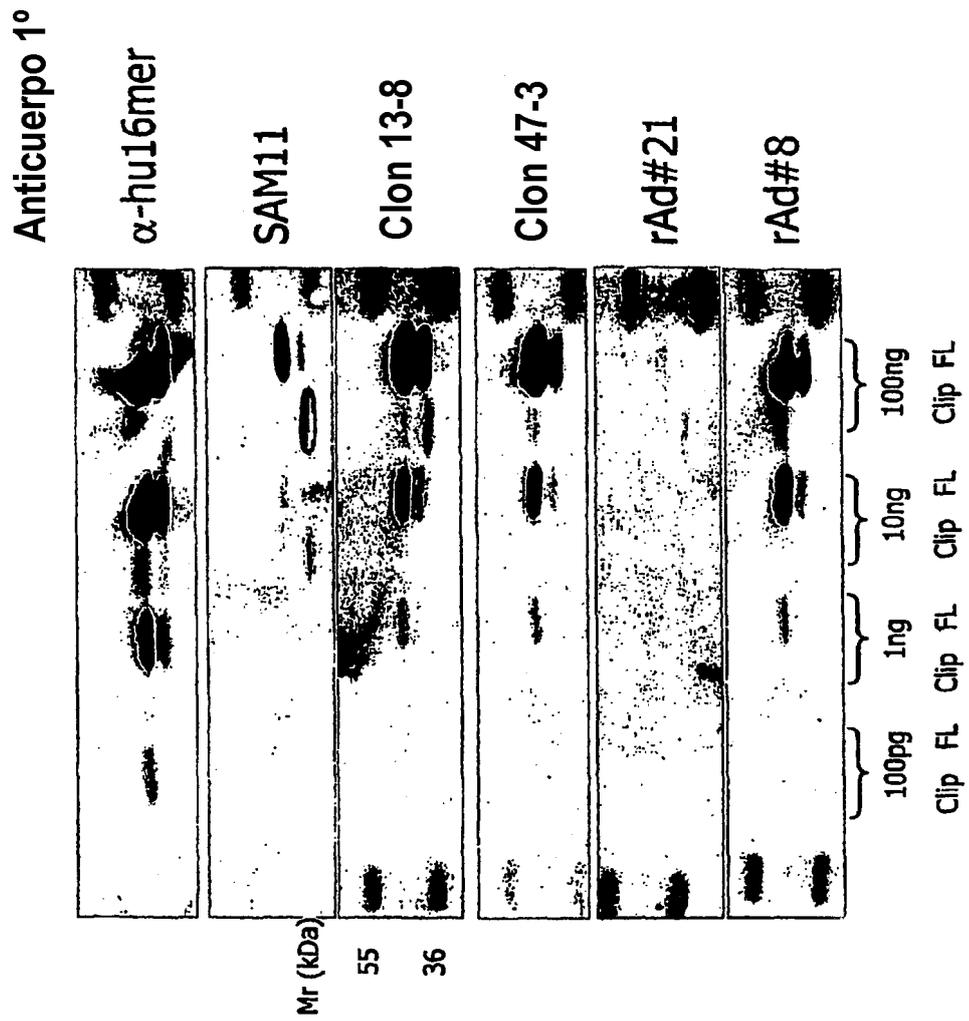


Figura 2

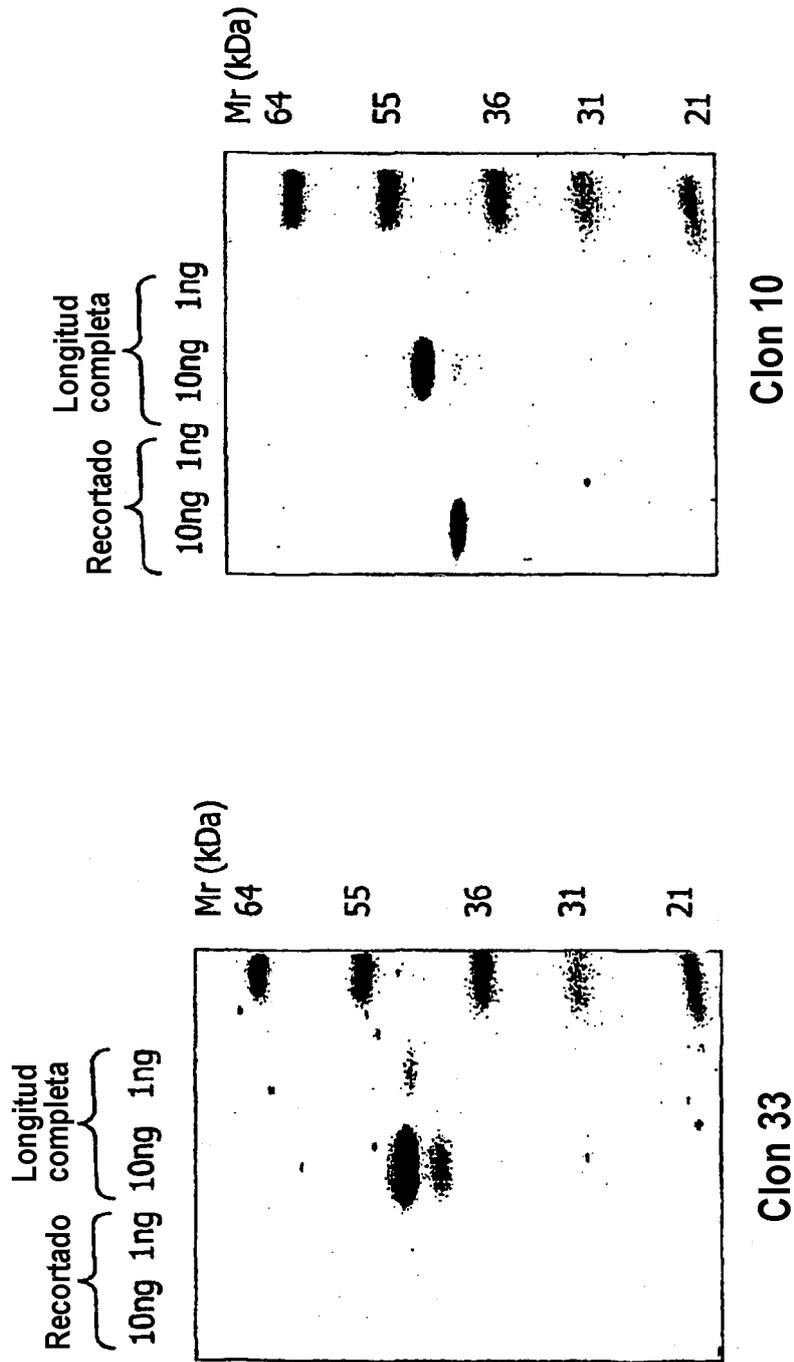


Figura 3

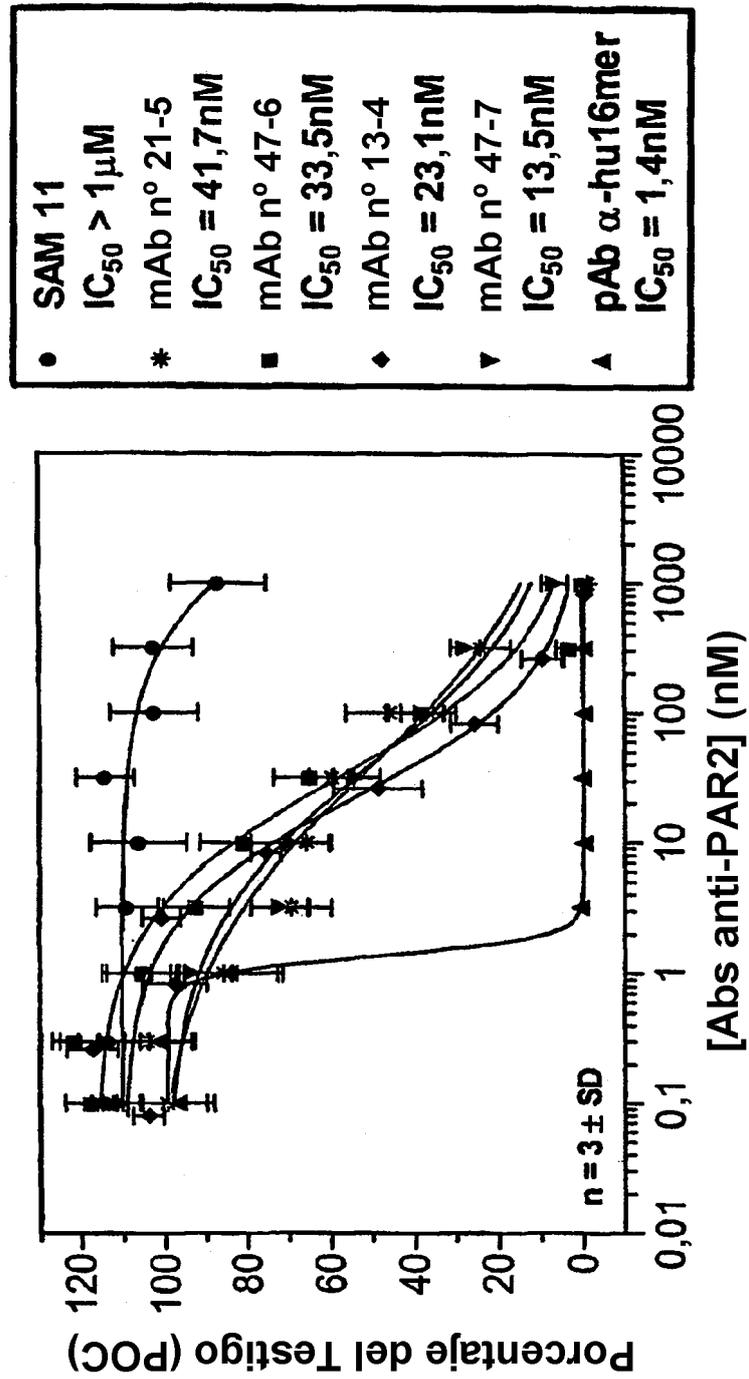


Figura 4