



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 678**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01964084 .6**

86 Fecha de presentación : **15.08.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1311663**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

54 Título: **Polipéptidos de Claudinas.**

30 Prioridad: **15.08.2000 US 225794 P**
15.08.2000 US 225513 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es: **Youakim, Adel;**
Dubose, Robert, F. y
Wiley, Steven, R.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 284 678 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

Polipéptidos de Claudinas.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se relaciona con los polipéptidos novedosos de humano y de murina de la familia del polipéptido de Claudina, y con los métodos para fabricarlos y utilizarlos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los polipéptidos de Claudina son un grupo relacionado de los polipéptidos “tetraspan”, polipéptidos que tienen cuatro dominios segmentos transmembranales o transmembrana, que se asocian con empalmes ajustados celulares. Los empalmes ajustados, que también se llaman “zona ocluida”, forman una barrera regulada, semipermeable en los espacios intercelulares dentro de las láminas de las células epiteliales o endoteliales. La función de la barrera epitelial o endotelial regulada inadecuada o inapropiadamente contribuye a la iniciación, mantenimiento, y exacerbación de la inflamación en tejidos tal como el intestino, pulmones, etc. Los empalmes ajustados también forman una “cerca” que separa las regiones apical y basolateral de estas membranas celulares, permitiendo el establecimiento de diferentes ambientes fisiológicos en los lados opuestos de la capa celular, tal como los diferentes ambientes fisiológicos requeridos para el transporte de materiales a lo largo del epitelio intestinal. También se ha propuesto que los empalmes ajustados contienen poros acuosos, con transporte paracelular entre las células de una capa epitelial o endotelial ocurriendo a través de estos poros. Los polipéptidos de la familia Claudina se expresan en las células epiteliales y/o células endoteliales durante todo el desarrollo, con los miembros individuales de la familia del polipéptido de Claudina que se expresan en diferentes tejidos. Las funciones fisiológicas asociadas con un polipéptido de Claudina particular se relacionan con las funciones desempeñadas por el o los tejidos particulares en los cuales este se expresa.

Los rasgos estructurales comunes de la familia de polipéptidos Claudina son los cuatro dominios de segmento transmembranal (transmembrana), los dos bucles extracelulares formados por los dominios transmembrana, y el dominio de la cola citoplasmática. El dominio de la cola citoplasmática tiene la intención de ser involucrado en las interacciones con otras proteínas asociadas de empalme ajustado tal como la familia ZO (zona ocluida) de las proteínas. Estas actividades interactivas de los polipéptidos de Claudina tienen el propósito de involucrar los polipéptidos que contienen el dominio-PDZ, con un enlace del dominio PDZ a los residuos C-terminal del dominio de la cola citoplasmática de un polipéptido de Claudina; la asociación de los polipéptidos que contienen PDZ pueden luego resultar en la oligomerización de los polipéptidos de Claudina. Los dominios del bucle extracelular de los polipéptidos de Claudina pueden contribuir a la formación del empalme ajustado, que es un aspecto importante de ambas, la función de barrera y la función de transportes de iones de los polipéptidos de Claudina, y/o actuar como un receptor para las proteínas virales, enterotoxinas, o alérgenos. Las actividades de la formación del empalme ajustado de la familia del polipéptido de Claudina se consideran que ocurren a través de las interacciones homotípicas con los bucles extracelulares del mismo polipéptido de Claudina expresado en las células epiteliales o endoteliales adyacentes, o las interacciones heterotípicas con los bucles extracelulares de otros miembros de la familia Claudina u otros no-polipéptidos de Claudina. Además, existe evidencia de que los efectos biológicos de los polipéptidos de Claudina involucran un requisito para los polipéptidos de Claudina, y particularmente su mayoría de dominio extracelular N-terminal, en el proceso de las metaloproteinasas de matriz para su forma activa (Miyamori *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 2804-2821). Puesto que sus papeles en la formación del empalme ajustado, función de barrera epitelial y endotelial, transporte de iones, y proteína viral, enterotoxina, o enlace alérgeno, polipéptidos de Claudina se asocian con las condiciones que involucran el transporte no regulado o inapropiadamente regulado a lo largo del epitelio o endotelio tal como la inflamación, asma, alergia, metástasis de células cancerosas, y desórdenes de transportes de iones tal como defectos de transporte de magnesio en el riñón. Además, porque se ha demostrado que se requiere, un polipéptido de Claudina expresado en células neurales, para la formación de la capa de mielina en los oligodendrocitos, los polipéptidos de Claudina se asocian con las condiciones de desmielinización tal como esclerosis múltiple (MS), encefalomiелitis autoinmune, neuritis óptica, leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), etc.

Las características y actividades de la familia de polipéptidos de Claudina se describen adicionalmente en las siguientes referencias: Fujitaab K *et al.*, 2000, *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein, *FEBS Lett.* 476: 258-261; Kinugasa T *et al.*, 2000, Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators, *Gastroentemlogy* 118: 1001-1011; Tsukita S and Furuse M, 2000, Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores, *J Cell Biol.* 149: 13-16; Bronstein JM *et al.*, 2000, Involvement of OSP/claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease, *J Neurosci Res.* 59: 706-711; Itob M *et al.*, 1999, Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins, *J Cell Biol.* 147: 1351-1363; Furuse M *et al.*, 1999, Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands, *J Cell Biol.* 147: 891-903; Morita K *et al.*, 1999, Endothelial claudin: claudin-5/TMVCFC constitutes tight junction strands in endothelial cells, *J Cell Biol.* 147: 185-194; Kubota K *et al.*, 1999, Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions, *Curr Biol.* 9: 1035-1038; Wan H *et al.*, 1999, Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions, *J Clin Invest.* 104:123-133; Simon DB *et al.*, 1999, Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption, *Science* 285: 103-106; Morita K *et al.*, 1999, Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 511-516; Furuse M *et al.*, 1998, A single gene

product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts, *J Cell Biol.* 143: 391-401; Furuse M *et al.*, 1998, Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, *J Cell Biol.* 141: 1539-1550.

5 Con el fin de desarrollar tratamientos más efectivos para las condiciones que involucran interrupción de la función de la barrera epitelial o endotelial o el transporte no regulado a lo largo de the epitelio o endotelio, tal como enfermedad inflamatoria del intestino, o que involucra la desmielinización, tal como esclerosis múltiple, se necesita información sobre los miembros de la familia del polipéptido de Claudina previamente sin identificar, así que las características y actividades de tales nuevos miembros de la familia Claudina se puede verificar. En particular, existe una necesidad de la caracterización de los polipéptidos de Claudina humanos previamente sin identificar.

Resumen de la invención

15 La presente invención se basa en el descubrimiento de un nuevo miembro de la familia del polipéptido de Claudina humano, Claudin-21 humano.

La invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de

20 (a) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:4 y los aminoácidos 1 a 13 de la SEQ ID NO: 4;

(b) SEQ ID NO:6;

25 (c) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los aminoácidos 1 a 10 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 1 a 33 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 11 a 30 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 12 a 26 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 25 a 220 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 34 a 81 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 82 a 101 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 82 a 102 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 103 a 116 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 117 a 145 de la SEQ ID NO: 6, los aminoácidos 118 a 137 de la SEQ ID NO:6, 30 los aminoácidos 146 a 161 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 162 a 181 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 162 a 191 de la SEQ ID NO:6, y los aminoácidos 192 a 220 de la SEQ ID NO:6;

35 (d) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprende al menos 20 aminoácidos contiguos y que tienen actividad del polipéptido de Claudina seleccionado del grupo constituido por la actividad de la formación del empalme ajustado, la función de la barrera epitelial o endotelial, actividad del transporte de iones, enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, enlace de enterotoxinas, y actividad del enlace del dominio PDZ;

40 (e) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprende las secuencias de aminoácido del dominio del bucle extracelular;

(f) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprende las secuencias de aminoácido del dominio de la cola citoplasmática;

45 (g) secuencias de aminoácido que tienen la actividad del polipéptido de Claudina seleccionado del grupo constituido por la actividad de la formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, actividad de transporte de iones, enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, enlace de enterotoxinas, y actividad del enlace del dominio PDZ, y que comprende al menos 30 aminoácidos y compartiendo la identidad del aminoácido con las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(f), en donde el porcentaje de identidad del aminoácido se selecciona del grupo constituido por: más del 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%; y

50 (h) una secuencia de aminoácido de (g), en donde un polipéptido que comprende dicha secuencia de aminoácido de (g) une a un anticuerpo que también une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de cualquiera de (a)-(f).

También se describe aquí un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por:

60 (i) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda al menos 20 aminoácidos contiguos;

(j) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda al menos 30 aminoácidos contiguos;

65 (k) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que tenga la actividad del polipéptido de Claudina;

ES 2 284 678 T3

(l) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda las secuencias de aminoácido del dominio de bucle extracelular;

5 (m) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda las secuencias del aminoácido del dominio de la cola citoplasmática;

(n) secuencias de aminoácido que comprenden al menos 20 aminoácidos y comparten la identidad del aminoácido con las secuencias de aminoácidos de cualquiera de (a)-(h), en donde el porcentaje de identidad del aminoácido se selecciona del grupo constituido por: al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%;

(o) una secuencia de aminoácido de (i), en donde un polipéptido que comprende dicha secuencia de aminoácido de (i) une a un anticuerpo que también une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de cualquiera de (a)-(h); y

15 (p) una secuencia de aminoácido de (n) u (o) que tiene actividad del polipéptido de Claudina.

La invención adicionalmente proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad del enlace del dominio PDZ y que comprende una secuencia de aminoácido que comparte más del 90% de identidad del aminoácido a lo largo de su longitud con los aminoácidos 192 a 220 de la SEQ ID NO: 6.

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado constituido por una secuencia de nucleótidos que codifica (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por una:

25 (a) SEQ ID NO: 4;

(b) SEQ ID NO: 6;

30 (c) una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo constituido por los aminoácidos 25 a 220 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 117 a 145 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 118 a 137 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 146 a 161 de la SEQ ID NO: 6, los aminoácidos 162 a 181 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 162 a 191 de la SEQ ID NO:6, y aminoácidos 192 a 220 de la SEQ ID NO:6; y

35 (d) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos 1 a 10 de la SEQ ID NO: 6, los aminoácidos 1 a 33 de la SEQ ID NO: 6, los aminoácidos 82 a 101 de la SEQ ID NO:6, y los aminoácidos 82 a 102 de la SEQ ID NO:6;

o (ii) un polipéptido de la reivindicación 2; y 1 a 100,000 nucleótidos adicionales covalentemente ligados a su extremo, cada extremo, o ambos extremos de la molécula del ácido nucleico. La invención adicionalmente proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la actividad del polipéptido de Claudina seleccionado del grupo constituido por la actividad de la formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, actividad de transporte de iones, enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteína virales, enlace de enterotoxinas, y actividad del enlace del dominio PDZ y comparte la identidad de la secuencias de nucleótidos con las secuencias del nucleótido de los ácidos nucleicos de los datos (i)(a)-(c) y (ii), citados anteriormente, en donde el porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo constituido por: al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%.

También se describe aquí un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por:

50 (a) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por una SEQ ID NO: 10 y los aminoácidos 19 a 33 de la SEQ ID NO: 10;

55 (b) SEQ ID NO: 8;

(c) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos 5 a 27 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 28 a 76 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 77 a 99 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 100 a 118 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 119 a 141 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 142 a 160 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 161 a 183 de la SEQ ID NO:8; y los aminoácidos 184 a 211 de la SEQ ID NO:8;

60 (d) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda al menos 20 aminoácidos contiguos;

65 (e) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda al menos 30 aminoácidos contiguos;

(f) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que tienen actividad del polipéptido de Claudina;

ES 2 284 678 T3

(g) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda las secuencias de aminoácido del dominio del bucle extracelular;

5 (h) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenda las secuencias de aminoácido del dominio de la cola citoplasmática;

(i) secuencias de aminoácido que comprende al menos 20 aminoácidos y compartiendo la identidad del aminoácido con las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(h), en donde el porcentaje de identidad del aminoácido se selecciona del grupo constituido por: al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%;

10 (j) una secuencia de aminoácido de (i), en donde un polipéptido que comprende dicha secuencia de aminoácido de (i) se une a un anticuerpo que también se une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de cualquiera de (a)-(h); y

15 (k) una secuencia de aminoácido de (i) o (j) que tiene la actividad del polipéptido de Claudina.

También se describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por:

20 (a) SEQ ID NO:11;

(b) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos 11 a 33 de la SEQ ID NO: 11; los aminoácidos 77 a 99 de la SEQ ID NO:11; los aminoácidos 119 a 141 de la SEQ ID NO:11; y los aminoácidos 167 a 189 de la SEQ ID NO:11;

25 (c) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos 34 a 76 de la SEQ m NO:11; aminoácidos 100 a 118 de la SEQ ID NO:11; aminoácidos 142 a 166 de la SEQ ID NO: 11; y aminoácidos 190 a 229 de la SEQ ID NO:11;

30 (d) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenden al menos 20 aminoácidos contiguos;

35 (e) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenden al menos 30 aminoácidos contiguos;

(f) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que tienen actividad del polipéptido de Claudina;

40 (g) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenden las secuencias de aminoácido del dominio del bucle extracelular;

(h) fragmentos de las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(c) que comprenden las secuencias de aminoácido del dominio de la cola citoplasmática;

45 (i) secuencias de aminoácido que comprenden al menos 20 aminoácidos y que comparten la identidad del aminoácido con las secuencias de aminoácido de cualquiera de (a)-(h), en donde el porcentaje de identidad del aminoácido se selecciona del grupo constituido por: al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%;

50 (j) una secuencia de aminoácido de (i), en donde un polipéptido que comprende dicha secuencia de aminoácido de (i) se une a un anticuerpo que también se une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de cualquiera de (a)-(h); y

55 (k) una secuencia de aminoácido de (i) o (j) que tiene la actividad del polipéptido de Claudina.

Otros aspectos de la invención son los ácidos nucleicos aislados que codifican los polipéptidos de la invención, y los ácidos nucleicos aislados, que tienen preferiblemente una longitud de al menos 15 nucleótidos, que hibridizan bajo condiciones de severidad moderada para los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención. En las modalidades preferidas de la invención, tales ácidos nucleicos codifican un polipéptido que tiene la actividad del polipéptido de Claudina, o comprende una secuencia de nucleótidos que comparte la identidad de la secuencias de nucleótidos con las secuencias del nucleótido de los ácidos nucleicos de la invención, en donde el porcentaje de identidad de la secuencias de nucleótidos se selecciona del grupo constituido por: al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%.

65 También se abarca por la presente invención los polipéptidos aislados y ácidos nucleicos constituidos por secuencias de aminoácido y secuencias del nucleótido, respectivamente, revelados aquí.

ES 2 284 678 T3

Además se proporcionan por la invención los vectores de expresión y las células huésped recombinante que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención, y las células huésped recombinante preferidas en donde dicho ácido nucleico se integra en el genoma de la célula huésped.

5 También se proporciona un proceso para la producción de un polipéptido codificado por los ácidos nucleicos de la invención, que comprende el cultivo de una célula huésped recombinante bajo condiciones que promueven la expresión de dicho polipéptido, en donde la célula huésped recombinante comprende al menos un ácido nucleico de la invención. Un proceso preferido proporcionado por la invención además comprende la purificación de dicho polipéptido. En otro aspecto de la invención, se proporciona, el polipéptido producido por el indicado proceso.

10 Otros aspectos de la invención son los anticuerpos aislados que unen a los polipéptidos de la invención, preferiblemente los anticuerpos monoclonales, también se prefiere los anticuerpos humanizados o anticuerpos humanizados, y preferiblemente en donde el anticuerpo inhibe la actividad de los indicados polipéptidos.

15 La invención adicionalmente proporciona un método para diseñar un inhibidor de los polipéptidos de la invención, el método que comprende las etapas para determinar la estructura tridimensional de cualquier polipéptido, analizando la estructura tridimensional para los probables sitios de enlace de substratos, sintetizando una molécula que incorpora un sitio reactivo predicho, y determinando la actividad que inhibe el polipéptido de la molécula.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar los compuestos que altera la actividad del polipéptido de Claudina, que comprende

(a) mezclar un compuesto de prueba con un polipéptido de la invención; y

25 (b) determinar si el compuesto de prueba altera la actividad del polipéptido de Claudina de dicho polipéptido.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar los compuestos que inhiben la actividad del enlace de los polipéptidos del polipéptido de Claudina que comprende

30 (a) mezclar un compuesto de prueba con un polipéptido de la invención y un enlace asociado de dicho polipéptido; y

(b) determinar si el compuesto de prueba inhibe la actividad del enlace de dicho polipéptido.

35 La invención también proporciona un método para incrementar la formación del empalme ajustado o promover las actividades de la función de la barrera epitelial o endotelial, que comprende el suministro de al menos un polipéptido de la invención; con una modalidad preferida del método que comprende además el incremento de dichas actividades en un paciente mediante la administración de al menos un polipéptido de la invención.

40 Se proporciona por la invención además un método para disminuir la actividad de la formación del empalme ajustado o la actividad de la función de la barrera epitelial o endotelial, que comprende el suministro de al menos un antagonista de los polipéptidos de la invención; con una modalidad preferida del método que comprende además la disminución de dichas actividades en un paciente mediante la administración de al menos un antagonista de los polipéptidos de la invención, y con otra modalidad preferida en donde el antagonista es un anticuerpo que inhibe la actividad de cualquiera de los indicados polipéptidos.

45 La invención adicionalmente proporciona el uso del polipéptido de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición de la función de la barrera epitelial o endotelial que comprende la administración del polipéptido de la invención; con una modalidad preferida en donde la condición de la función de la barrera epitelial o endotelial se selecciona del grupo que consiste de una enfermedad inflamatoria del intestino, asma, alergia, y defectos de transporte de iones.

50 También se describe un método para el tratamiento de una condición de desmielinización que comprende la administración del polipéptido de la invención; con una modalidad preferida en donde la condición de desmielinización se selecciona del grupo constituido por una esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune, neuritis óptica, y leucoencefalopatía multifocal progresiva.

55 En otros aspectos la invención se relaciona con el uso de un antagonista del polipéptido de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición viral o enterotóxica que comprende la administración de un antagonista del polipéptido de la invención; con una modalidad preferida en donde la condición viral o enterotóxica se expone a una enterotoxina del *Clostridium perfringens*, y con una modalidad preferida adicional en la cual el antagonista bloquea el enlace de la enterotoxina del *Clostridium perfringens* con los bucles extracelulares de un polipéptido de Claudina de la invención.

65

Descripción detallada de la invención*Estructura de los Polipéptidos de Claudina Humanos*

5 Hemos identificado los nuevos miembros de la familia del polipéptido de Claudina, Claudin-21 humano, Claudin-19 humano, y Claudin-22 humano. Los elementos estructurales típicos comunes a los miembros de la familia del polipéptido de Claudina incluyen una secuencia de péptido señal no-dividida, cuatro dominios de segmento transmembranal, dos bucles extracelulares formados por los dominios del segmento transmembranal, y una cola citoplasmática en el C-terminal del polipéptido. Ambos el N-terminal y el C-terminal del polipéptido son intracelulares. Los dos dominios del bucle extracelular de los polipéptidos de Claudina se localizan entre el primer y el segundo dominios transmembrana y entre el tercer y cuarto dominios transmembrana del polipéptido, respectivamente. La pequeña región entre el segundo y tercer dominios transmembrana del polipéptido es intracelular. El dominio de la cola citoplasmática de los polipéptidos de Claudina se prolonga a partir del cuarto dominio transmembrana al C-terminal del polipéptido.

15 Las secuencias de aminoácido del Claudin-21 humano (SEQ ID NO: 6), el Claudin-19 humano (SEQ ID NO: 8), y el Claudin-22 humano (SEQ ID NO: 11) contienen los rasgos estructurales de los polipéptidos de Claudina. El Claudin-21 humano contiene un dominio de la secuencia señal (aminoácidos 12 a 26 de la SEQ ID NO: 6) que dirigiría la división de la longitud total de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 6 entre los aminoácidos 24 y 25 de la SEQ ID NO: 6 una forma un polipéptido Claudin-21 maduro o procesado con el aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 6 como el aminoácido N-terminal. Sin embargo, este dominio de la secuencia señal también se predice que se localiza dentro del primer dominio transmembrana (TM), que comprende los aminoácidos 11 a 30 de la SEQ ID NO: 6, consistente con los otros miembros de la familia Claudina en los cuales la secuencia señal no se divide pero se inserta en la membrana celular con el mismo extremo N-terminal del polipéptido de Claudina (en este caso, los aminoácidos 1 a 10 de la SEQ ID NO: 6) localizados dentro de la célula. También se predice que el Claudin-21 humano tiene un segundo dominio TM que comprende los aminoácidos 82 a 101 de la SEQ ID NO: 6, un tercer dominio TM que comprende los aminoácidos 118 a 137 de la SEQ ID NO: 6, y un cuarto dominio TM que comprende los aminoácidos 162 a 181 de la SEQ ID NO: 6. El análisis Hidden Markov Model (HMM) predice la misma señal no-dividida y los dominios transmembrana similares: los aminoácidos 12 a 31 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 82 a 105 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 118 a 140 de la SEQ ID NO:6; y los aminoácidos 166 a 188 de la SEQ ID NO:6. Estas ubicaciones predichas para el dominio TMs del Claudin-21 humano también corresponden bien con aquellos identificados por Morita *et al.* (1999, Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands, Proc Natl Acad Sci USA. 96: 511-516) para otros miembros de la familia del polipéptido de Claudina. Basado en las alineaciones con otros miembros de la familia y por referencia a la Figura 1 de Morita *et al.*, los cuatro dominios transmembrana se predicen para extender a partir de los aminoácidos 1 a 33, 82 a 102, 117 a 145, y 162 a 191 de la SEQ ID NO:6, respectivamente. Estas ubicaciones predichas para los cuatro dominios TM del Claudin-21 humano coloca el primer bucle extracelular del Claudin-21 humano como el inicio de apenas alrededor del aminoácido 31 a aminoácido 34 de la SEQ ID NO:6 y extendiendo a aproximadamente el aminoácido 81 de la SEQ ID NO:6, y preferiblemente a partir del aminoácido 34 al aminoácido 81 de la SEQ ID NO:6, y el segundo bucle extracelular del Claudin-21 humano como inicio de aproximadamente alrededor del aminoácido 138 al aminoácido 146 de la SEQ ID NO:6 y extendiendo aproximadamente al aminoácido 161 de la SEQ ID NO:6, y preferiblemente del aminoácido 146 al aminoácido 161 de la SEQ ID NO:6. La secuencia intracelular entre el segundo y el tercer dominios TM se extiende de aproximadamente el aminoácido 102 o 103 de la SEQ ID NO: 6 para aproximadamente el aminoácido 116 al 117 de la SEQ ID NO: 6, y preferiblemente del aminoácido 103 al aminoácido 116 de la SEQ ID NO: 6. El dominio de la cola citoplasmática del Claudin-21 humano inicia aproximadamente alrededor del aminoácido 182 al aminoácido 192 de la SEQ ID NO:6 y se extiende al C-terminal predicho de la SEQ ID NO:6 en el aminoácido 220; preferiblemente, el dominio de la cola citoplasmática de la SEQ ID NO:6 se extiende del aminoácido 192 al aminoácido 220 de la SEQ ID NO:6. El Claudin-19 humano contiene un dominio no-dividido de la secuencia señal (aminoácidos 8 a 25 de la SEQ ID NO: 8) que dirigirían la división de la longitud total de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO:8 entre los aminoácidos 24 y 25 de la SEQ ID NO: 8. El análisis Hidden Markov Model (HMM) predice los siguientes dominios transmembrana para el Claudin-19 humano: los aminoácidos 5 a 27 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 77 a 99 de la SEQ ID NO:8; los aminoácidos 119 a 141 de la SEQ ID NO:8; y los aminoácidos 161 a 183 de la SEQ ID NO:8. El Claudin-22 humano contiene un dominio no-dividido de la secuencia señal (los aminoácidos 11 a 27 de la SEQ ID NO: 11) que dirigirían la división de la longitud total de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 11 entre los aminoácidos 24 y 25 de la SEQ ID NO: 11. El análisis Hidden Markov Model (HMM) predice los siguientes dominios transmembrana para el Claudin-22 Humano: los aminoácidos 11 a 33 de la SEQ ID NO: 11; los aminoácidos 77 a 99 de la SEQ ID NO: 11; los aminoácidos 119 a 141 de la SEQ ID NO: 11; y los aminoácidos 167 a 189 de la SEQ ID NO: 11. El experto artesano reconocerá que los límites de estas regiones de estos polipéptidos son aproximados y que los límites precisos de tales dominios, como por ejemplo los límites de los dominios transmembrana, pueden diferir de aquellos predichos aquí para Claudin-19, -21, y -22 humanos.

60 La mayoría de los residuos C-terminal de los dominios de la cola citoplasmática de los polipéptidos de Claudina se consideran que se involucran con la interacción con las proteínas que contienen el dominio PDZ, tal que las sustituciones de aquellos residuos probablemente son asociados con un patrón de reconocimiento del dominio PDZ alterado o una función de enlace, o con una ausencia de esta función, para el polipéptido. La mayoría de los miembros de la familia del polipéptido de Claudina, tal como Claudin-19 humano descrito aquí, tienen una secuencia de aminoácido -Tyr-Val-COOH en su C-terminal. El Claudin-21 humano se predice que tiene una secuencia de aminoácido -Asp-Pro-Gln-Val-COOH en su C-terminal. Aunque este no corresponde exactamente a las secuencias de aminoácido del C-terminal de otros polipéptidos de la familia Claudina, es consistente en la mayoría de los aspectos con los requisitos del

consenso para los polipéptidos “Grupo 1” que interactúan con los dominios PDZ (Cowburn D, 1997, *Curr Opin Struct Biol* 7: 835-838): VaMe/Leu/Met como el residuo C-terminal, con preferencia para Tbr/Ser/Tyr en la posición -2 y Glu en la posición -3. El Claudin-21 humano tiene Val como el residuo C-terminal y Asp, que tiene una cadena lateral ácida similar al Glu, en la posición -3. El Claudin-22 humano tiene Ile como el residuo C-terminal. Por consiguiente, Claudin-21 y -22 humanos se predicen para interactuar con los polipéptidos que contienen el dominio PDZ, aunque pueden interactuar con diferentes subconjuntos de dominios PDZ de otros miembros de la familia Claudina, o pueden mostrar diferente cinética o afinidad en sus interacciones con los polipéptidos que contienen el dominio PDZ.

Actividades Biológicas y Funciones de los Polipéptidos de Claudina de la Invención

Según lo utilizado aquí, “polipéptidos de Claudina de la invención” incluye Claudin-21 humano, y como apropiado, las especies homólogas tal como Claudin-21 murina (SEQ ID NO: 7), y las variantes y fragmentos de estos polipéptidos de Claudina humano y sus especies homólogas. Los polipéptidos de Claudina de la invención actividades y funciones biológicas que son consistentes con aquellos de los otros polipéptidos de la familia Claudina. Los polipéptidos de la familia Claudina se expresan en tipos de célula incluyendo células epiteliales y endoteliales durante todo el desarrollo. Las actividades o funciones biológicas típicas asociadas con esta familia de polipéptidos son la formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, transporte de iones, enlace de proteínas virales, enlace homotípico o heterotípico, y enlace del dominio PDZ. Los polipéptidos que tienen la actividad de la formación del empalme ajustado unido a otras moléculas asociadas al empalme ajustado para formar las estructuras del empalme ajustado que regula la función de la barrera epitelial o endotelial y transporte paracelular. La actividad de la formación del empalme ajustado se asocia con los bucles extracelulares y posiblemente con el dominio de la cola citoplasmática de los polipéptidos de Claudina. De esta manera, para usos que requieren la actividad de la formación del empalme ajustado, se prefieren los polipéptidos Claudin-19, -21, y -22 humanos incluyendo aquellos que tienen los dominios del bucle extracelular y exhibiendo las actividades de formación del empalme ajustado tal como función de la barrera epitelial o endotelial, transporte paracelular de iones, o enlace de proteínas virales. Los polipéptidos de Claudina de la invención preferidos además incluyen los oligómeros o polipéptidos de fusión que comprenden al menos un bucle extracelular o dominio de la cola citoplasmática de uno o más polipéptidos de Claudina de la invención, y los fragmentos de cualquiera de estos polipéptidos que tienen la actividad de la formación del empalme ajustado. La actividad de la formación del empalme ajustado de Claudin-19, -21, y -22 humano y otros polipéptidos de la familia Claudina se pueden determinar, por ejemplo, introduciendo los polipéptidos de Claudina en las células que no forman normalmente los empalmes ajustados, tal como L fibroblastos, junto con el ocludina o cualquier otro polipéptido diferente del polipéptido de Claudina necesita interactuar en la formación de los empalmes ajustados, luego visualizando las estructuras del empalme ajustado resultante por métodos de microscopía electrónica o inmunofluorescencia (ver por ejemplo Furuse M *et al.*, 1998, A single gene product, claudin-1 o -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts, *J Cell Biol.* 143: 391-401). Alternativamente, la actividad de transporte de iones paracelular de Claudin-19, -21, y -22 humano y otros polipéptidos de la familia Claudina pueden ser analizados por electrofisiología o con el uso de las moléculas indicadoras del ion luminescente tal como aequorin, preferiblemente en preparaciones micelular de las células que expresan los polipéptidos de Claudina.

Los polipéptidos de Claudina tal como Claudin-19, -21, y -22 humano tienen actividad de enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, y/o enlace de enterotoxinas; cada una de estas actividades de enlace se asocia con los dominios del bucle extracelular de los polipéptidos de Claudina. De esta manera, para usos que requieren la actividad de enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, y/o enlace de enterotoxinas, polipéptidos de Claudina de la invención preferidos incluyen aquellos que tienen al menos un dominio de bucle extracelular y que exhiben al menos tal actividad del enlace. Los polipéptidos de Claudina también tienen la actividad del enlace del dominio PDZ asociados con los dominios de la cola citoplasmática de los polipéptidos de Claudina. De esta manera, para usos que requieren la actividad del enlace del dominio PDZ, los polipéptidos de Claudina de la invención preferidos incluyen aquellos que tienen un dominio de la cola citoplasmática y que exhiben la actividad del enlace del dominio PDZ. Los polipéptidos de Claudina de la invención preferidos además incluyen oligómeros o polipéptidos de fusión que comprenden al menos un dominio del bucle extracelular y/o dominio de la cola citoplasmática de uno o más polipéptidos de Claudina de la invención, y fragmentos de cualquiera de estos polipéptidos que tienen enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteína virales, enlace de enterotoxinas, y/o actividad del enlace del dominio PDZ. La actividad del enlace o las actividades de Claudin-19, -21, y -22 humano y otros polipéptidos de la familia Claudina se pueden determinar, por ejemplo, en un ensayo dos-híbrido de levadura, o en un ensayo *in vitro* que mide el enlace entre un polipéptido de Claudina y uno de su homotípico, heterotípico, proteína viral, enterotoxina, y/o enlaces asociados que contienen el dominio PDZ, dónde tanto el polipéptido de Claudina como su enlace asociado se marca con una proteína radioactiva, fluorescente, o bioluminescente de tal manera que el enlace pueda ser detectado.

El término “actividad del polipéptido de Claudina, humano” según lo utilizado aquí, incluye cualquiera o más de los siguientes: formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, y actividad de transporte de iones; enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, enlace de enterotoxinas, y actividad del enlace del dominio PDZ; así como las actividades de los polipéptidos de Claudina de la invención *ex vivo* e *in vivo*. El grado al cual los polipéptidos de Claudina de la invención y fragmentos y otros derivados de estos polipéptidos muestran estas actividades se puede determinar mediante métodos de ensayo estándar. Ensayos ejemplares se revelan aquí; aquellos de habilidad en el arte apreciarán que otros, tipos de ensayos similares se pueden utilizar para medir las actividades biológicas de los polipéptidos de Claudina de la invención y otros miembros de la familia Claudina.

Un aspecto de la actividad biológica de los polipéptidos de Claudina incluyendo Claudin-19, -21, y -22 humano es la capacidad de los miembros de esta familia de polipéptido para unir los enlaces asociados particulares tales como polipéptidos homotípicos y heterotípicos, proteínas virales, enterotoxinas, y polipéptidos que contienen el dominio PDZ, con el enlace de los dominios del bucle extracelular, por ejemplo, para los polipéptidos homotípicos, y el enlace del dominio de la cola citoplasmática a los polipéptidos que contienen el dominio PDZ. El término “enlace asociado,” según lo utilizado aquí, incluyen los ligandos, receptores, sustratos, anticuerpos, otros polipéptidos de Claudina, el mismo polipéptido Claudin-19, -21, o -22 humano (en el caso de las interacciones homotípicas), y cualquier otra molécula que interactúa con un polipéptido de Claudin-19, -21, o -22 humano a través del contacto o proximidad entre las porciones particulares del enlace asociado y el polipéptido de Claudin-19, -21, o -22 humano. Los enlaces asociados para los polipéptidos de Claudina de la invención también se expresan por las células epiteliales y endoteliales, como polipéptidos de Claudina expresados en las células epiteliales unidas a las moléculas sobre las células epiteliales adjuntas para formar empalmes ajustados, y polipéptidos de Claudina expresados en las células endoteliales unidas a las moléculas sobre las células endoteliales adjuntas. Por consiguiente, las interacciones entre los polipéptidos de Claudina de la invención y sus enlaces asociados se involucran probablemente en las interacciones que median entre las células epiteliales adyacentes, y las interacciones entre células endoteliales adyacentes. Puesto que los dominios del bucle extracelular de los polipéptidos de Claudina de la invención unidos a los polipéptidos homotípicos o heterotípicos, un polipéptido derivado que comprende uno o más dominios del bucle extracelular cuando se expresan como un fragmento separado a partir del resto de un polipéptido de Claudin-19, -21, o -22 humano, o como un polipéptido soluble, fundido por ejemplo a un dominio Fc inmunoglobulina, se espera desestabilizar el enlace de los polipéptidos de Claudina de la invención con sus enlaces asociados. Mediante el enlace a uno o más enlaces asociados, el polipéptido del o los dominios del bucle extracelular separado probablemente previene el enlace mediante el o los polipéptidos de Claudin-19, -21, y -22 humanos nativos y así actúa en una forma negativa dominante para inhibir las actividades biológicas mediadas vía el enlace de los polipéptidos de Claudina de la invención a los polipéptidos homotípicos o heterotípicos. Las actividades biológicas y propiedades del enlace asociado de Claudin-19, -21, y -22 humano y otros polipéptidos de la familia Claudina se pueden analizar por métodos estándar y por aquellos ensayos descritos aquí.

Los polipéptidos de la familia Claudina tal como Claudin-19, -21, y -22 humano se involucran en enfermedades o condiciones de la función de la barrera epitelial o endotelial y de transporte, que comparten como una característica común la formación del empalme ajustado anormal o la función del empalme ajustado regulado inapropiadamente (i.e. función de la barrera epitelial o endotelial anormal) en su etiología. Más específicamente, las siguientes condiciones que involucran la función de la barrera epitelial o endotelial y/o enlace con los polipéptidos de Claudina son aquellos que se conocen o están probablemente para involucrar las actividades biológicas de los polipéptidos de Claudina: inflamación, asma, alergia, metástasis de células cancerosas, desórdenes de transportes de iones tal como defectos de transporte de magnesio en el riñón, enfermedad inflamatoria del intestino, y exposición a la enterotoxina del *Clostridium perfringens* (CPE). Además, porque un polipéptido de Claudina se expresa en células neurales se han mostrado para ser requerido para la formación de la capa de mielina en los oligodendrocitos, los polipéptidos de Claudina se asocian con las condiciones de desmielinización tal como esclerosis múltiple (MS), encefalomiелitis autoinmune, neuritis óptica, y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML). También, las enfermedades que se fomentan por una o más de las condiciones anteriores pueden involucrar los polipéptidos de Claudina, directa o indirectamente. Por ejemplo, la susceptibilidad al síndrome de muerte infantil súbita (SIDS) ha sido asociada con la exposición al CPE. El bloqueo o inhibición de las interacciones entre los polipéptidos de Claudina de la invención y sus sustratos, ligandos, receptores, enlaces asociados, y u otros polipéptidos que interactúan es un aspecto de la invención y proporciona los métodos para el tratamiento o la mejora de estas enfermedades y condiciones con el uso de inhibidores de la actividad de Claudin-21 humano. Ejemplos de tales inhibidores o antagonistas se describen con más detalle abajo. Para ciertas condiciones que involucran un defecto en la función de la barrera epitelial o endotelial o transporte de iones asociadas con muy poca actividad del Claudin-21 humano, los métodos de tratamiento o mejora de estas condiciones comprende incrementar la cantidad o actividad de los polipéptidos de Claudina de la invención proporcionando los polipéptidos aislados de Claudina de la invención o fragmentos activos o polipéptidos de fusión de estos, o proporcionando los compuestos (agonistas) que activan los polipéptidos de Claudina de la invención endógenos o exógenos. Las aplicaciones adicionales para los polipéptidos de Claudina de la invención y agonistas y antagonistas de estos incluyen reactivos de diagnóstico de enfermedades del transporte epitelial o endotelial; los reactivos de investigación para la investigación de los polipéptidos de ocludina o la familia ZO y la formación de los empalmes ajustados; purificación, tratamiento, y preservación de los polipéptidos de ocludina o ZO o de las células epiteliales o endoteliales; o como una molécula portador o diana para la entrega de los agentes terapéuticos, particularmente en vista del papel de Claudinas en los empalmes ajustados de la barrera hematoencefálica (Kniesel U y Wolburg H, 2000, Cell Mol Neurobiol. 20:57-76).

Los Polipéptidos de Claudina de la Invención

Un polipéptido de Claudin-19, -21, o -22 humano es un polipéptido que comparte un grado suficiente de la identidad del aminoácido o afinidad a la secuencia de aminoácido del polipéptido Claudin-19, -21, o -22 humano tal como aquellos mostrados en la Tabla 1 a (A) se identifican por aquellos de habilidad en el arte como un polipéptido probablemente para compartir los dominios estructurales particulares y/o (B) tienen las actividades biológicas en común con los polipéptidos de Claudina humano y/o (C) unen a los anticuerpos que también específicamente se unen a otros polipéptidos de Claudina humanos. Los polipéptidos de Claudina de la invención se pueden aislar a partir de las fuentes que ocurren naturalmente, o tienen la misma estructura como los polipéptidos de Claudina que ocurren naturalmente, o se pueden producir para tener estructuras que difieren de los polipéptidos de Claudina que ocurren naturalmente. Los polipéptidos derivados de cualquier polipéptido de claudin-21 humano por cualquier tipo de alteración (por ejemplo, pero no limitado a, inserciones, deleciones, o sustituciones de los aminoácidos; cambios en el estado de glicosilación

del polipéptido; plegamiento o isomerización para cambiar su estructura tridimensional o estado de auto-asociación; y cambios a su asociación con otros polipéptidos o moléculas) también son polipéptidos de Claudina de la invención. Por consiguiente, los polipéptidos proporcionado por la invención incluyen los polipéptidos caracterizados por las secuencias de aminoácido similares a aquellos de los polipéptidos de Claudina de la invención descritos aquí, pero en las que las modificaciones se proporcionan naturalmente o deliberadamente se diseñan. Un polipéptido que comparte las actividades biológicas en común con los polipéptidos de Claudina de la invención es un polipéptido que tiene la actividad de Claudin-21 humano. Ejemplos de las actividades biológicas mostrados por los miembros de la familia del polipéptido de Claudina incluyen, sin limitación, la formación del empalme ajustado, función de barrera epitelial o endotelial, transporte de iones, enlace homotípico o heterotípico, enlace de proteínas virales, y enlace de enterotoxinas.

La presente invención proporciona ambas formas de longitud total y madura de los polipéptidos de Claudina de la invención. Los polipéptidos de cuerpo entero son aquellos que tienen la secuencia de aminoácido del polipéptido completa primaria como inicialmente se traducen. Las secuencias de aminoácido de los polipéptidos de longitud total se pueden obtener, por ejemplo, por traducción del marco de lectura abierta completa ("ORF") de una molécula de ADNc. Varios polipéptidos de longitud total se pueden codificar mediante un emplazamiento genético sencillo si las formas múltiples del ARNm se producen de ese emplazamiento por empalme alternativo o por el uso de múltiples sitios de iniciación de traducción. La "forma madura" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que experimenta etapas del tratamiento de post-traducción tal como división de la secuencia señal o división proteolítica para eliminar un prodominio. Las formas múltiples maduras de un polipéptido particular de longitud total se puede producir, por ejemplo por división de la secuencia señal en múltiples sitios, o por regulación diferencial de las proteasas que dividen el polipéptido. Las forma(s) madura(s) de tal polipéptido se pueden obtener por expresión, en una apropiada célula de mamífero u otra célula huésped, de una molécula del ácido nucleico que codifica el polipéptido de cuerpo entero. La secuencia de la forma madura del polipéptido también se puede determinar de la secuencia de aminoácido de la forma de longitud total, una identificación de las secuencias señal o sitios de división de proteasa. Los polipéptidos de Claudina de la invención también incluyen aquellos que resultante los eventos del tratamiento post-transcripcional o post-traducción tal como el tratamiento de ARNm alterno que puede producir un polipéptido truncado pero biológicamente activo, por ejemplo, una forma soluble del polipéptido que ocurre naturalmente. También se abarcan dentro de la invención variaciones atribuibles a la proteólisis tal como diferencias en el N- o C-terminal bajo la expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la extracción proteolítica de uno o más aminoácidos terminales del polipéptido (generalmente de 1 a 5 aminoácidos terminales).

La invención además incluye los polipéptidos de Claudina de la invención con o sin glicosilación nativa-patrón asociada. Los polipéptidos expresados en sistemas de expresión de levadura o mamífero (por ejemplo, las células COS-1 o CHO) pueden ser similares a o significativamente diferentes de un polipéptido nativo en peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo de la opción del sistema de expresión. La expresión de los polipéptidos de la invención en sistema de expresión bacteriana, tal como *E. coli*, proporciona las moléculas no-glicosiladas. Adicionalmente, una preparación dada puede incluir múltiples especies del polipéptido diferencialmente glicosilada. Los grupos glicosil se pueden extraer con métodos convencionales, en particular aquellos que utilizan glicopeptidasa. En general, los polipéptidos glicosilados de la invención se pueden incubar con un exceso molar de glicopeptidasa (Boehringer Mannheim).

La especie homóloga de los polipéptidos de Claudina de la invención y de los ácidos nucleicos que los codifican también se proporciona por la presente invención. Según lo utilizado aquí, una "especie homóloga" es un polipéptido o ácido nucleico con una especie diferente de origen del de un polipéptido o ácido nucleico dado, pero con la afinidad de la secuencia significativa al polipéptido o ácido nucleico dado, como se determina por aquellos de habilidad en el arte. Las especies homólogas se pueden aislar e identificar haciendo cebadores o sondas apropiadas de los polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácido proporcionadas aquí y seleccionando una fuente apropiada de ácido nucleico de la especie deseada. La invención también abarca las variantes alélicas de los polipéptidos de Claudina de la invención y ácidos nucleicos que los codifica; que es, formas alternativas que ocurren naturalmente de tales polipéptidos y ácidos nucleicos en los cuales las diferencias en la secuencia de aminoácido o de nucleótidos son atribuibles al polimorfismo genético (variación alélica entre individuos dentro de una población).

Los fragmentos de los polipéptidos de Claudina de la invención de la presente invención se abarcan por la presente invención y pueden estar en forma lineal o ciclada utilizando métodos conocidos, por ejemplo, según lo descrito en H. U. Saragovi, *et al.*, *Bio/Technology* 10, 773-778 (1992) y in R. S. McDowell, *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114 9245-9253 (1992). Los polipéptidos y fragmentos de polipéptido de la presente invención, y los ácidos nucleicos que los codifican, incluyen los polipéptidos y ácidos nucleicos con longitudes de secuencias de aminoácido o de nucleótidos que son al menos 25% (más preferiblemente al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, y muy preferiblemente al menos 80%) de la longitud de un polipéptido Claudin-21 humano y tienen una identidad de la secuencia al menos del 60% (más preferiblemente al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, o al menos 99%, y muy preferiblemente al menos 99.5%) con ese polipéptido Claudin-21 humano o codificando un ácido nucleico, cuando la identidad de la secuencia se determina comparando las secuencias de aminoácido de los polipéptidos cuando se alinea a su máxima coincidencia e identidad mientras que minimiza las aberturas de la secuencia.

También se incluyen en la presente invención los polipéptidos y fragmentos de polipéptido, y los ácidos nucleicos que los codifican, que contienen o codifican un segmento preferiblemente que comprende al menos 8, o al menos 10, o preferiblemente al menos 15, o más preferiblemente al menos 20, o aún más preferiblemente al menos 30, o

ES 2 284 678 T3

muy preferiblemente al menos 40 aminoácidos contiguos. Tales polipéptidos y fragmentos de polipéptido también pueden contener un segmento que comparte al menos 70% de identidad de la secuencia (más preferiblemente al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, o al menos 99%, y muy preferiblemente al menos 99.5%) con cualquier segmento de cualquiera de los polipéptidos de Claudina de la invención, donde la identidad de la secuencia se determina comparando las secuencias de aminoácido de los polipéptidos cuando se alinea a su máxima coincidencia e identidad mientras que minimiza las aberturas de la secuencia.

El porcentaje de identidad se puede determinar por la inspección visual y el cálculo matemático. Como alternativa, el porcentaje de identidad las secuencias de dos aminoácidos o dos ácidos nucleicos se puede determinar comparando la información de la secuencia utilizando el programa de ordenador GAP, version 6.0 descrito por Devereux *et al.* (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) y disponible de la University of Wisconsin Genetics Computer Grupo (UWGCG).

Los parámetros de defecto preferidos para el program GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y 0 para no-identidades) para los nucleótidos, y la matriz cargada de comparación de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, según lo descrito por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Polypeptide Sequence y Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) una pena de 3.0 para cada abertura y una pena de 0.10 adicionales para cada símbolo en cada abertura; y (3) ninguna pena para las aberturas extremas.

Otros programas usados por aquellos de habilidad en el arte de comparación de la secuencia también pueden ser utilizados, tal como, por ejemplo, la version del programa BLASTN 2.0.9, disponible para el uso vía the National Library of Medicine website ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi, o the UW-BLAST 2.0 algorithm.

Las configuraciones de parámetro de defecto estándar para UW-BLAST 2.0 se describen en las siguientes webpage de Internet: blast.wustl.edu/blast/README.html#References. Además, el algoritmo BLAST usa la matriz que puntua el aminoácido BLOSUM64, y los parámetros opcionales que pueden ser utilizados como sigue: (A) inclusión de un filtro para cubrir los segmentos de la secuencia de búsqueda que tiene baja complejidad composicional (según se determina por el programa SEG de Wootton & Federhen (Computers and Chemistry, 1993); también ver Wootton JC y Federhen S, 1996, Análisis de regiones parciales compositiva en las bases de datos de secuencias, Methods Enzymol. 266: 554-71) o segmentos constituidos por repeticiones internas de periodicidad cortas (según se determina por el programa XNU de Claverie & States (Computers and Chemistry, 1993)), y (B) un umbral de significancia estadística para reportar coincidencias contra las secuencias de bases de datos, o E-score (la probabilidad esperada de coincidencias que se encuentran simplemente por casualidad, de acuerdo con el modelo hipotético de Karlin y Altschul (1990); si la significancia estadística atribuye a una equivalencia es mayor que este umbral E-puntuación, la equivalencia no será reportada.); los valores preferidos del umbral E-puntuación son 05, o con el fin de incrementar la preferencia, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001, 1e-5, 1e-10, 1e-15, 1e-20, 1e-25, 1e-30, 1e-40, 1e-50, 1e-75, o 1e-100.

La presente invención también proporciona a las formas solubles de los polipéptidos de Claudina de la invención que comprende ciertos fragmentos o dominios de estos polipéptidos, y particularmente aquellos que comprenden el dominio extracelular o uno o más fragmentos del dominio extracelular. Los polipéptidos solubles son polipéptidos que son capaces de ser secretados de las células en las cuales ellos se expresan. En tales formas parte o todos los dominios intracelulares y transmembrana del polipéptido se suprimen tal que el polipéptido completamente se secretan de la célula en la cual este se expresa. Los dominios intracelulares y transmembrana de los polipéptidos de la invención se pueden identificar de acuerdo con técnicas conocidas para la determinación de tales dominios de la información de la secuencia. Los polipéptidos solubles de Claudina de la invención también incluyen aquellos polipéptidos que incluyen parte de la región transmembrana, proveen que el polipéptido Claudin-21 humano soluble es capaz de ser secretada a partir de una célula, y preferiblemente retiene la actividad de Claudin-21 humano. Los polipéptidos solubles de Claudina de la invención además incluyen oligómeros o polipéptidos de fusión que contienen la porción extracelular de al menos un polipéptido Claudin-21 humano, y fragmentos de cualquiera de estos polipéptidos que tienen la actividad de Claudin-21 humano. Un polipéptido soluble secretado se puede identificar (y se distinguen de sus homólogos unidos a la membrana no-soluble) separando las células intactas que expresan el polipéptido deseado del medio de cultivo, por ejemplo, por centrifugación, y analizando el medio (sobrenadante) para la presencia del polipéptido deseado. La presencia del polipéptido deseado en el medio indica que el polipéptido fue secretado a partir de las células y de esta manera es una forma soluble del polipéptido. El uso de las formas solubles de los polipéptidos de Claudina de la invención es ventajoso para muchas aplicaciones. La purificación de los polipéptidos de las células huésped recombinantes se facilita, desde que los polipéptidos solubles se secretan a partir de las células. Además, los polipéptidos solubles generalmente son más apropiados que las formas adecuadas unidas a la membrana para la administración parenteral y para muchos procedimientos enzimáticos.

En otro aspecto de la invención, los polipéptidos preferidos comprenden varias combinaciones de los dominios del polipéptido Claudin-21 humano, tal como el dominio de la cola citoplasmática y el dominio del bucle extracelular. Por consiguiente, los polipéptidos de la presente invención y los ácidos nucleicos que los codifica incluyen aquellos que comprenden o que codifican dos o más copias de un dominio tal como el dominio de la cola citoplasmática, dos o más copias de un dominio tal como el dominio del bucle extracelular, o al menos una copia de cada dominio, y estos dominios se pueden presentar en cualquier orden dentro de tales polipéptidos.

Modificaciones adicionales en las secuencias del péptido o el ADN se pueden hacer por aquellos de habilidad en el arte utilizando técnicas conocidas. Las modificaciones de interés en la polisequencia de péptidos pueden incluir la alteración, sustitución, reposición, inserción o delección de un aminoácido seleccionado. Por ejemplo, uno o más de los residuos de cisteína pueden ser suprimidos o reemplazados con otro aminoácido para alterar la conformación de la molécula, una alteración que puede involucrar la prevención de la formación de enlaces disulfuro intramoleculares incorrectos bajo el plegado o renaturalización. Las técnicas para tal alteración, sustitución, reposición, inserción o delección son bien conocidos por aquellos de habilidad en el arte (ver, por ejemplo, U.S. Pat. No. 4,518,584). Como otro ejemplo, los sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular del polipéptido se pueden modificar para prevenir la glicosilación, permitiendo la expresión de un análogo carbohidrato reducido en sistemas de expresión de mamífero y levadura. Los sitios de N-glicosilación en polipéptidos eucarióticos se caracterizan por un aminoácido triplete Asn-X-Y, en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro y Y es Ser o Thr. Las sustituciones, adiciones, o delecciones apropiadas para la secuencias de nucleótidos que codifica estos tripletes resultará en prevención de la unión de los residuos de carbohidratos en la cadena lateral Asn. La alteración de un solo nucleótido, seleccionado de tal manera que Asn se reemplaza por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente inactivar un sitio de N-glicosilación. Como alternativa, la Ser o Thr pueden reemplazarse con otro aminoácido, tal como Ala. Procedimientos conocidos para inactivar los sitios de N-glicosilación en polipéptidos incluyen aquellos descritos en la Patente U.S. 5,071,972 y EP 276,846. Variantes adicionales dentro del alcance de la invención incluyen polipéptidos que se pueden modificar para crear sus derivados formando conjugados covalentes o acumulativos con otras fracciones químicas, tal como grupos glicosil, lípidos, fosfato, grupos acetil y similares. Los derivados covalentes se pueden preparar uniendo las fracciones químicas a los grupos funcionales sobre las cadenas laterales del aminoácido o en el N-terminal o C-terminal de un polipéptido. Los conjugados que comprenden agentes de diagnóstico (detectable) o terapéuticos unidos a estos se contemplan aquí. Preferiblemente, tal alteración, sustitución, reposición, inserción o delección retiene la actividad deseada del polipéptido o un equivalente sustancial de estos. Un ejemplo es una variante que se une con esencialmente la misma afinidad del enlace que lo hace la forma nativa. La afinidad de enlace se puede medir por procedimientos convencionales, por ejemplo, según lo descrito en Patente U.S. No. 5,512,457 y como se publica aquí.

Otros derivados incluyen conjugados de los polipéptidos covalentes o acumulativos con otros polipéptidos o polipéptidos, tal como por síntesis in vivo recombinante como fusiones N-terminal o C-terminal. Ejemplos de polipéptidos de fusión se discuten abajo en conexión con oligómeros. Además, los polipéptidos de fusión pueden contener péptidos adicionales para facilitar la purificación e identificación. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, poly-His o la identificación antigénica de péptidos descrita en la Patente U.S. No. 5,011,912 y en Hopp *et al.*, Bio/Technology 6:1204, 1988. Un péptido semejante es el péptido FLAG[®], que es altamente antigénica y proporciona un enlace reversible de epítopo por un anticuerpo monoclonal específico, permitiendo un ensayo rápido y fácil purificación del polipéptido recombinante expresado. Un hibridoma murina designado 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que une el péptido FLAG[®] en la presencia de ciertos cationes de metales divalentes, según lo descrito en la Patente U.S. 5,011,912. La línea celular hibridoma 4E11 ha sido depositada con la American Type Culture Collection bajo el No. de acceso HB 9259. Los anticuerpos monoclonales que unen el péptido FLAG[®] están disponibles de Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

Se abarcan por la invención, los oligómeros o polipéptidos de fusión que contienen un polipéptido Claudin-21 humano, uno o más fragmentos de los polipéptidos de Claudina de la invención, o cualquiera de las formas derivadas o variantes de los polipéptidos de Claudina de la invención según se revela aquí. En modalidades particulares, los oligómeros comprenden polipéptidos de Claudina solubles de la invención. Los oligómeros pueden estar en la forma de multímeros covalentemente ligados o no-covalentemente-ligados, incluyendo dímeros, trímeros, u oligómeros superiores. En un aspecto de la invención, los oligómeros mantienen la capacidad de enlace de los componentes del polipéptido y por esto proporciona, sitios de enlace, bivalentes, trivalentes, etc. En una modalidad alternativa la invención se dirige a los oligómeros que comprenden polipéptidos de Claudina de la invención múltiples unidos vía interacciones covalentes o no-covalentes entre fracciones del péptido fusionado a los polipéptidos, tales péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de los anticuerpos están entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de los polipéptidos unidos a eso, según lo descrito con más detalle abajo.

En modalidades donde las variantes de los polipéptidos de Claudina de la invención se construyen para incluir un dominio de segmento transmembranal, formarán un polipéptido de membrana Tipo I. Los polipéptidos de Claudina de segmento transmembranal de la invención se pueden fusionar con los dominios extracelulares de los polipéptidos receptor para los cuales el ligando se conoce. Tales polipéptidos de fusión entonces se pueden manipular para controlar las sendas de señalización intracelular accionados por el polipéptido Claudin-21 humano de segmento transmembranal. Los polipéptidos de Claudina de la invención que abarcan la membrana celular también se pueden fusionar con agonistas o antagonistas de los receptores superficiales de la célula, o moléculas de adhesión celular para adicionalmente modular los efectos intracelulares del Claudin-21 humano. En otro aspecto de la presente invención, las interleuquinas se pueden situar entre el fragmento del polipéptido Claudin-21 humano preferido y otros dominios del polipéptido de fusión.

Oligómeros basados en la inmunoglobulina. Los polipéptidos de la invención o los fragmentos de estos se pueden fundir a las moléculas tal como inmunoglobulinas para muchos propósitos, incluyendo incrementar la valencia de los sitios de enlace del polipéptido. Por ejemplo, los fragmentos de un polipéptido Claudin-21 humano se pueden fundir directamente o a través de las secuencias de enlace a la porción Fc de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente del polipéptido, tal fusión podía estar en la porción Fc de una molécula IgG. Otros isotipos de la inmunoglobulina

también se pueden utilizar para generar tales fusiones. Por ejemplo, un polipéptido-IgM de fusión generaría una forma decavalente del polipéptido de la invención. El término "polipéptido Fc" según lo utilizado aquí incluye las formas nativas y mutantes de los polipéptidos formada de la región Fc de un anticuerpo que comprende cualquiera o todos los dominios CH de la región Fc. Las formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización también se incluyen. Los polipéptidos Fc preferidos comprenden un polipéptido Fc derivado de un anticuerpo IgG1 humano. Como una alternativa, un oligómero se prepara utilizando los polipéptidos derivados de las inmunoglobulinas. La preparación de los polipéptidos de fusión que comprende ciertos polipéptidos heterólogos fundidos a varias porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc) ha sido descrito, por ejemplo, por Ashkenazi *et al.* (*PNAS USA* 88:10535,1991); Bym *et al.* (*Nature* 344:677,1990); y Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Polypeptides", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1 - 10.19.11,1992). Métodos para la preparación y uso de oligómeros basados en inmunoglobulina son bien conocidos en el arte. Una modalidad de la presente invención se dirige a un dímero que comprende dos polipéptidos de fusión creados por la fusión de un polipéptido de la invención a un polipéptido Fc derivado de un anticuerpo. Una fusión de gen que codifica el polipéptido/Fc polipéptido de fusión se inserta en un vector de expresión apropiado. Polipéptido/polipéptidos Fc de fusión se expresan en las células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante, y permiten configurar gran cantidad de moléculas de anticuerpo semejantes, con lo cual los enlaces disulfuro intercadena se forman entre las fracciones Fc para producir las moléculas divalentes. Un polipéptido Fc apropiado, descrito en la aplicación PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena sencilla que extiende de la bisagra de la región N-terminal a la C-terminal nativa de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es el mutante Fc descrito en la Patente U.S. 5,457,035 y en Baum *et al.*, (*EMBO J.* 13:3992-4001, 1994). La secuencia de aminoácido de este mutante es idéntica a esa de la secuencia Fc nativa presentada en WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. El mutante exhibe afinidad reducida para los receptores Fc. Los polipéptidos de fusión arriba descritos que comprenden las fracciones Fc (y oligómeros formados de estos) ofrecen la ventaja de una purificación fácil por cromatografía de afinidad sobre columnas de Polipéptido A o Polipéptido G. En otras modalidades, los polipéptidos de la invención se pueden sustituir por la porción variable de un anticuerpo de cadena ligera o pesada. Si los polipéptidos de fusión se hacen con ambas cadenas ligeras o pesadas de un anticuerpo, es posible formar un oligómero con tanto como las cuatro regiones Claudin-21 humana extracelulares.

Oligómeros Basados en el ligador del Péptido. Como alternativa, el oligómero es un polipéptido de fusión que comprende múltiples polipéptidos de Claudina de la invención, con o sin ligadores de péptidos (péptidos separados). Entre los ligadores de péptidos apropiados están aquellos descritos en las Patentes U.S. 4,751,180 y 4,935,233. Una secuencia de ADN que codifica un ligador de péptido deseado se puede insertar entre, y en el mismo marco de lectura como, las secuencias de ADN de la invención, utilizando cualquier técnica convencional apropiada. Por ejemplo, un oligonucleótido sintetizado químicamente que codifica el ligador puede ser ligado entre las secuencias. En modalidades particulares, un polipéptido de fusión comprende de dos a cuatro polipéptidos solubles de Claudina de la invención, separadas por ligadores de péptidos. Ligadores de péptidos apropiados, su combinación con otros polipéptidos, y sus usos son bien conocidos por aquellos de habilidad en el arte.

Cremalleras de Leucina. Otro método para la preparación de los oligómeros de la invención involucra el uso de una cremallera de Leucina. Los dominios de cremallera de Leucina son péptidos que promueven la oligomerización de los polipéptidos en los cuales ellos se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varios polipéptidos de enlace ADN (Landschulz *et al.*, *Science* 240:1759, 1988), y desde entonces se han encontrado en una variedad de diferentes polipéptidos. Entre las cremalleras de Leucina conocidas están los péptidos que ocurren naturalmente y derivados de estos que dimerizan o trimerizan. El dominio de cremallera (también se refiere aquí como un dominio, oligomerizado, o que forma un oligómero) comprende un repetición septeto repetitivo, con frecuencia con cuatro o cinco residuos de leucina intercalados con otros aminoácidos. El uso de cremalleras de Leucina y la preparación de oligómeros utilizando cremalleras de Leucina son bien conocidos en el arte.

Otros fragmentos y derivados de las secuencias de polipéptidos que se esperaban para retener la actividad del polipéptido entera o parcialmente y de esta manera ser útiles para la selección u otras metodologías inmunológicas, también se pueden hacer por aquellos de habilidad en el arte dadas las revelaciones aquí. Tales modificaciones se consideran para ser abarcadas por la presente invención.

55 *Ácidos Nucleicos Codificantes de los Polipéptidos de Claudina de la Invención*

Abarcados dentro la invención están los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención. Estos ácidos nucleicos se pueden identificar de varias maneras, incluyendo el aislamiento de moléculas genómicas o de ADNc de una fuente apropiada. Las secuencias de nucleótido correspondientes a las secuencias de aminoácido descritas aquí, para ser utilizados como sondas o cebadores para el aislamiento de los ácidos nucleicos o como secuencias de búsqueda por investigaciones de bases de datos, se pueden obtener por "traducción inversa" a partir de las secuencias de aminoácido, o por identificación de las regiones de identidad del aminoácido con los polipéptidos para los cuales la codificación de las secuencias de ADN han sido identificadas. El procedimiento bien conocido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede emplear para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica un polipéptido Claudin-21 humano o una combinación deseada de los fragmentos del polipéptido Claudin-21 humano. Los oligonucleótidos que definen el terminal deseado de la combinación de los fragmentos de ADN se emplean como los cebadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos adicionalmente pueden contener los sitios de reconocimiento para

las endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción de la combinación amplificada de los fragmentos de ADN en un vector de expresión. Las técnicas PCR se describen en Saiki *et al.*, *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu *et al.*, eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; y *Protocolos PCR: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.*, eds., Academic Press, Inc. (1990).

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ADN y ARN en ambas formas monocatenaria y bicatenaria, así como las secuencias complementarias correspondientes. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN químicamente sintetizado, ADN amplificado por PCR, y combinaciones de estos. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen genes de longitud total o moléculas de ADNc así como una combinación de fragmentos de estos. Los ácidos nucleicos de la invención se derivan preferencialmente de fuentes humanas, pero la invención incluye aquellos derivados de especie no-humana, igualmente.

“Un ácido nucleico aislado que consiste esencialmente de una secuencia de nucleótido” significa que el ácido nucleico puede tener, además de dichas secuencias de nucleótidos, material adicional covalentemente ligado a cualquier o ambos extremos de la molécula del ácido nucleico, dicho material adicional preferiblemente entre 1 y 100,000 nucleótidos adicionales covalentemente ligados a cualquier extremo, cada extremo, o a ambos extremos de la molécula del ácido nucleico, y más preferiblemente entre 1 y 10,000 nucleótidos adicionales covalentemente ligados a cualquier extremo, cada extremo, o a ambos extremos de la molécula del ácido nucleico, y muy preferiblemente entre 10 y 1,000 nucleótidos adicionales covalentemente ligados a cualquier extremo, cada extremo, o a ambos extremos de la molécula del ácido nucleico. Un ácido nucleico aislado que consiste esencialmente de una secuencia de nucleótidos puede ser un vector de expresión u otra construcción que comprende dicha secuencia de nucleótidos.

Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico que se ha separado a partir de las secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del cual el ácido nucleico se aisló, en el caso de los ácidos nucleicos aislados de fuentes que ocurren naturalmente. En el caso de los ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente de una plantilla o químicamente, tal como productos PCR, moléculas de ADNc, u oligonucleótidos por ejemplo, se entiende que los ácidos nucleicos resultantes de tales procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislado se refiere a una molécula del ácido nucleico en la forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ácido nucleico grande. En una modalidad preferida, la invención se relaciona con ciertos ácidos nucleicos aislados que están sustancialmente libres del material contaminante endógeno. La molécula del ácido nucleico preferiblemente ha sido derivada a partir del ADN o ARN aislado al menos una vez en una forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración permitiendo la identificación, manipulación, y recuperación de su componente de secuencias de nucleótido por métodos bioquímicos estándar (tal como aquellos bosquejados en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Tales secuencias preferiblemente se proporcionan y/o construyen en la forma de un marco de lectura abierto continuo por secuencias no-traducidas internas, o intrones, que están típicamente presentes en los genes eucarióticos. Las secuencias de ADN no-traducidas pueden estar presentes 5' o 3' de un marco de lectura abierto, donde el mismo no interfiere con la manipulación o expresión de la región codificante.

La presente invención también incluye los ácidos nucleicos que hibridizan bajo condiciones moderadamente rigurosas, y más preferiblemente condiciones altamente rigurosas, para los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención descritos aquí. Los parámetros básicos que afectan la opción de las condiciones de hibridación y dirección para las condiciones apropiadas de diseño se publican por Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 y 11; and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4), y se pueden determinar fácilmente por aquellos de ordinaria habilidad en el arte basados en, por ejemplo, la longitud y/o composición del ADN base. Una manera de lograr las condiciones moderadamente rigurosas involucra el uso de una solución de prelavado que contiene 5 x SSC, 0.5% de SDS, 1.0 mM de EDTA (pH 8.0), solución reguladora de hibridación de aproximadamente 50% de formamida, 6 x SSC, y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55 grados C (u otras soluciones de hibridación similares, tal como una que contiene aproximadamente 50% de formamida, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42 grados C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60 grados C, en 0.5 x SSC, 0.1% de SDS. Generalmente, las condiciones altamente rigurosas se definen como condiciones de hibridación como arriba, pero con un lavado de aproximadamente 68 grados C, 0.2 x SSC, 0.1% de SDS. SSPE (1xSSPE es 0.15M de NaCl, 10 mM de NaH₂PO₄, y 1.25 mM de EDTA, pH 7.4) se puede sustituir por SSC (1xSSC es 0.15M de NaCl y 15 mM de citrato de sodio) en los soluciones reguladoras de hibridación y de lavado; los lavados se realizan por 15 minutos después la hibridación se completa. Debe ser entendido que la temperatura de lavado y concentración de sal de lavado se pueden ajustar según se necesite para lograr un grado deseado de severidad aplicando los principios básicos que gobiernan las reacciones de hibridación y la doble estabilidad, como se conoce por aquellos de habilidad en el arte y descritos además abajo (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989). Cuando la hibridación de un ácido nucleico para un ácido nucleico diana de una secuencia desconocida, la longitud del híbrido se asume para ser esa de la hibridación del ácido nucleico. Cuando los ácidos nucleicos de la secuencia conocida se hibridizan, la longitud del híbrido se puede determinar alineando las secuencias de los ácidos nucleicos e identificando la región o regiones de la complementariedad de la secuencia óptima. La temperatura de hibridación para los híbridos anticipados para ser menor de 50 pares de base en longitud sería de 5 a 10 grados C menos de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores de 18 pares de base en longitud, T_m (grados C) = 2(# de A + T bases) + 4(# de # G + C bases). Para los híbridos arriba de 18 pares de base en longitud, T_m (grados C) = 81.5 + 16.6 (log₁₀ [Na⁺]) + 0.41 (% G + C) - (600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en la

solución reguladora de hibridación ([Na⁺] por 1xSSC = 0.165M). Preferiblemente, cada ácido nucleico de hibridación tiene una longitud que es al menos 15, 18, 20, 25, 30, 40, o más preferiblemente 50 nucleótidos, o al menos 25% (más preferiblemente al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, y muy preferiblemente al menos 80%) de longitud del ácido nucleico de la presente invención a la cual esta hibridiza, y tiene al menos 60% de identidad de la secuencia (más preferiblemente al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, o al menos 99%, y muy preferiblemente al menos 99.5%) con el ácido nucleico de la presente invención a la cual esta se hibridiza, donde la identidad de la secuencia se determina comparando las secuencias de los ácidos nucleicos hibridizados cuando se alinea a su máxima coincidencia e identidad mientras que minimiza las aberturas de la secuencia según lo descrito con más detalle above.

La presente invención también proporciona los genes correspondientes a la secuencia de ácido nucleico según se revela aquí. "Genes correspondientes" son las regiones del genoma que se transcriben para producir los mARNs de los cuales las secuencias de ácido nucleico ADNc se derivan y pueden incluir las regiones continuas del genoma necesarias para la expresión regulada de tales genes. Los genes correspondientes por consecuencia pueden incluir pero no ser limitadas a la codificación de las secuencias, regiones no traducidas 5' y 3', alternativamente exones ligados, intrones, promotores, mejoradores, y silenciadores o elementos supresores. Los genes correspondientes se pueden aislar de acuerdo con los métodos conocidos utilizando la información de la secuencia revelada aquí. Tales métodos incluyen la preparación de sondas o cebadores a partir de la información de la secuencia revelado por la identificación y/o amplificación de genes en librerías genómicas apropiadas u otra fuente de materiales genómicas. Un "gen aislado" es un gen que se ha separado de las secuencias codificantes adyacentes, si las hay, presente en el genoma del organismo del cual el gen se aisló.

Métodos para Fabricar y Purificar los Polipéptidos de Claudina de la Invención

Los métodos para fabricar los polipéptidos de Claudina de la invención se describen abajo. Expresión, aislamiento, y purificación de los polipéptidos y fragmentos de la invención se pueden lograr por cualquier técnica apropiada, incluyendo pero no limitando a los siguientes métodos.

El ácido nucleico aislado de la invención puede ser de manera unidos operablemente a una secuencia control de la expresión tal como los vectores de expresión pMT2 o pED revelados en Kaufman *et al.*, Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991); y Pouwels *et al.* *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985), con el fin de producir el polipéptido recombinantemente. Varias apropiadas secuencias control de la expresión se conocen en el arte. Los métodos generales de expresión de los polipéptidos recombinantes también son conocidos y se ejemplifican en R. Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990). Como se utiliza aquí "unidos operablemente" significa que el ácido nucleico de la invención y una secuencia control de la expresión se sitúan dentro de una construcción, vector, o célula de tal manera que el polipéptido codificado por el ácido nucleico se expresa cuando las moléculas apropiadas (tal como polimerasas) están presentes. Como una modalidad de la invención, al menos una secuencia control de la expresión se une operablemente al ácido nucleico de la invención en una célula huésped recombinante o progenie de estos, el ácido nucleico y/o secuencia control de la expresión que han sido introducidas en la célula huésped por transformación o transfección, por ejemplo, o por cualquier otro método apropiado. Como otra modalidad de la invención, al menos una secuencia control de la expresión se integra en el genoma de una célula huésped recombinante tal que se une operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. En otra modalidad de la invención, al menos una secuencia control de la expresión se une operablemente a un ácido nucleico de la invención a través de la acción de un factor que actúa-trans tal como un factor de transcripción, ya sea *in vitro* o en una célula huésped recombinante.

Además, una secuencia que codifica un péptido señal apropiado (nativo o heterólogo) se puede incorporar en los vectores de expresión. La opción del péptido señal o líder puede depender de los factores tal como el tipo de células huésped en las cuales el polipéptido recombinante es para ser producido. Para ilustrar, los ejemplos de péptidos señal heterólogos que son funcionales en las células huésped mamífero incluyen la secuencia señal para interleuquina-7 (IL-7) descrito en la Patente de Estados Unidos 4,965,195; la secuencia señal para el receptor para interleuquina-2 descrito en Cosman *et al.*, Nature 312:768 (1984); el péptido señal receptor para interleuquina-4 descrito en EP 367,566; el péptido señal receptor para interleuquina-1 tipo I descrito en la Patente U.S. 4,968,607; y el péptido señal receptor para interleuquina-1 tipo II descrito en EP 460,846. Una secuencia de ADN para un péptido señal (líder secretor) se puede fusionar en el marco a la secuencia de ácido nucleico de la invención de tal manera que el ADN inicialmente se transcribe, y el ARNm se traduce, en un polipéptido de fusión que comprende el péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las pretendidas células huésped promueve la secreción extracelular del polipéptido. El péptido señal se divide del polipéptido sobre la secreción del polipéptido a partir de la célula. Los artesanos de habilidad también reconocerán que la(s) posición(s) a la cual el péptido señal se divide puede diferir de aquella predicha por el programa de ordenador, y puede variar de acuerdo con tales factores como el tipo de células huésped empleados en la expresión de un polipéptido recombinante. Una preparación de polipéptido puede incluir una mezcla de moléculas de polipéptido que tienen diferentes N-aminoácidos terminales, resultando de la división del péptido señal en más de un sitio.

Los métodos establecidos para la introducción del ADN en las células de mamífero han sido descritos (Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69). Los protocolos adicionales utilizando reactivos disponibles comercialmente, tal como reactivo Lipofectamine lipid (GibcoBRL) o reactivo Lipofectamine-Plus lipid, se pueden utilizar para transfectar las células (Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417, 1987). Además, la electroporación se pueden utilizar para transfectar las células de mamífero utilizando procedimientos convencio-

nales, tal como aquellos en Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La selección de transformantes estables se pueden realizar utilizando métodos conocidos en el arte, tal como, por ejemplo, resistencia a los fármacos citotóxicos. Kaufman *et al.*, *Meth. in Enzymology* 185:487-511, 1990, describe varias esquemas de selección, tal como resistencia a la dihidrofolato reductasa (DHFR).
 5 Una cepa apropiada para la selección de DHFR puede ser la cepa DX-B11 de la CHO, la cual es deficiente en DHFR (Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980). Un plásmido que expresa el ADNc del DHFR se puede introducir en la cepa DX-B 11, y únicamente las células que contienen el plásmido pueden crecer en el medio selectivo apropiado. Otros ejemplos de marcadores selectivos que se puede incorporar en un vector de expresión incluyen cADNs que confieren resistencia a los antibióticos, tal como G418 y higromicina B. las células que hospedan
 10 el vector se pueden seleccionar basándose en la resistencia a estos compuestos.

Como alternativa, los productos de genes se pueden obtener vía técnicas de recombinación homóloga, o de “gen diana”. Tales técnicas emplean la introducción de elementos de control de la transcripción exógenos (tal como el promotor CMV o similares) en un sitio predeterminado particular sobre el genoma, para inducir la expresión de
 15 la secuencia de ácido nucleico endógena de interés. La localización de la integración en un cromosoma o genoma huésped se puede determinar fácilmente por alguien de habilidad en el arte, dando la localización conocida y la secuencia del gen. En una modalidad preferida, la presente invención también contempla la introducción de elementos de control transcripcionales exógenos en conjunción con un gen amplificable, para producir cantidades incrementadas del producto del gen, de nuevo, sin la necesidad de un aislamiento de la secuencia del gen por si mismo de la célula huésped. La práctica de la recombinación homóloga o gen diana se explica por Schimke, *et al.* “*Amplification of Genes in Somatic Mammalian cells*”, *Methods in Enzymology* 151:85-104 (1987), así como por Capecchi, *et al.*, “*The New Mouse Genetics: Altering the Genome by Gene Targeting*”, *TIG* 5:70-76 (1989).

Un número de tipos de células puede actuar como células huésped apropiadas para la expresión del polipéptido.
 25 Las células huésped de mamífero incluyen, por ejemplo, la línea COS-7 de las células de riñón del mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, *Cell* 23:175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster Chino (CHO), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), el derivado de la línea celular CV1/EBNA a partir de la línea del riñón de mono verde Africano CV1 (ATCC CCL 70) según lo descrito por McMahan *et al.* (*EMBO J.* 10: 2821, 1991), células de riñón humano 293, células epidérmicas humanas A431,
 30 células humanas Colo205, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, derivado de cepas de células a partir de un cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat. Como alternativa, puede ser posible producir el polipéptido en eucariotas inferiores tal como levadura o en procariontas tal como bacteria. Las cepas de levadura potencialmente apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* cepas, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar los polipéptidos heterólogos. Las cepas bacterianas potencialmente apropiadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar los polipéptidos heterólogos. Si el polipéptido se hace en levadura o bacteria, Puede ser necesario modificar el polipéptido producido en esto, por ejemplo por fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, con el fin de obtener el polipéptido funcional. Tale uniones covalentes se pueden lograr utilizando métodos químicos o enzimáticos conocidos. El polipéptido también se puede
 40 producir ligando operablemente el ácido nucleico aislado de la invención para las apropiadas secuencias control en uno o más vectores de expresión de insectos, y empleando un sistema de expresión de insecto. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de célula baculovirus/insectos comercialmente están disponibles en forma de kit a partir, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (el kit MaxBac®), y tales métodos son bien conocidos en el arte, según lo descrito en Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* No. 1555 (1987), y Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Como se utiliza aquí, una célula de insecto capaz de expresar un ácido nucleico de la presente invención es “transformada”. Sistemas de traducción de célula-libre también se podría emplear para producir los polipéptidos utilizando los derivados de ARNs a partir de las construcciones de ácido nucleico revelados aquí. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado de la invención, preferiblemente unida operablemente a al menos una secuencia control de la expresión, es una “célula huésped
 50 recombinante”.

El polipéptido de la invención se puede preparar cultivando las células huésped transformadas bajo las condiciones de cultivo apropiadas para expresar el polipéptido recombinante. El polipéptido expresado resultante luego puede ser purificado a partir de tal cultivo (i.e., a partir del medio de cultivo o extractos celulares) utilizando procesos de
 55 purificación conocido, tal como cromatografía de filtración por gel e intercambio iónico. La purificación del polipéptido también puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que unen al polipéptido; uno o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad como concanavalin A-agarose, heparintoyopearl® o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; uno o más etapas que involucran la cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando semejantes resinas como fenil éter, butil éter, o propil éter, o cromatografía de inmunoafinidad. Como alternativa, el polipéptido de la invención también se puede expresar en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, se puede expresar como un polipéptido de fusión, tal como aquellos de maltosa enlace polipéptido (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o tiorredoxin (TRX). Kits para la expresión y purificación de tales polipéptidos de fusión son comercialmente disponibles de New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, NJ.) e In Vitrogen, respectivamente. El polipéptido también se puede etiquetar con un epítopo y posteriormente purificado utilizando un anticuerpo específico dirigido a
 65 tal epítopo. Tal epítopo (“Etiqueta”) es comercialmente disponible de Kodak (New Haven, Conn.). Finalmente, uno o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) empleando RP-HPLC medio hidrofóbico, por ejemplo, sílica gel que tiene metil pendiente u otros grupos alifáticos, pueden ser empleados para una purificación adicional del polipéptido. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones,

también se pueden emplear para proporcionar un polipéptido recombinante aislado sustancialmente homogéneo. El polipéptido purificado de esta manera está libre sustancialmente de otros polipéptidos de mamífero y se define de acuerdo con la presente invención como un “polipéptido aislado”; tales polipéptidos aislados de la invención incluyen anticuerpos aislados que unen a los polipéptidos de Claudina de la invención, fragmentos, variantes, enlaces asociados etc. El polipéptido de la invención también se puede expresar como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas, cabras, cerdos, u ovejas transgénicas que se caracterizan por células somáticas o de gérmenes que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

También es posible utilizar una columna de afinidad que comprende un enlace-polipéptido del polipéptido de la invención, tal como un anticuerpo monoclonal generado contra los polipéptidos de la invención, afinidad-para purificar los polipéptidos expresados.

Estos polipéptidos se pueden retirar de una columna de afinidad utilizando las técnicas convencionales, por ejemplo, en una solución reguladora de elución de sal alta y luego se dializa en una solución reguladora de sal baja para el uso o cambiando el pH u otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada, o se retira competitivamente utilizando el sustrato que ocurre naturalmente de la fracción de afinidad, tal como un polipéptido derivado de la invención. En este aspecto de la invención, los polipéptidos de enlace-polipéptido, tal como los anticuerpos anti-polipéptido de la invención u otros polipéptidos que puede interactuar con el polipéptido de la invención, se puede unir a un soporte de fase sólida tal como una matriz de cromatografía de columna o un sustrato similar apropiado para identificar, que separa, o purifica las células que expresan los polipéptidos de la invención sobre su superficie. La adherencia de los polipéptidos de la invención enlace-polipéptido a una fase sólida que contacta la superficie se puede lograr por cualquier medio, por ejemplo, las microesferas magnéticas se pueden cubrir con estos polipéptidos enlace-polipéptido y mantener en el recipiente de incubación a través de un campo magnético. Las suspensiones de las mezclas de células se ponen en contacto con la fase sólida que tiene tales polipéptidos de enlace-polipéptido por consiguiente. Las células que tienen polipéptidos de la invención sobre su superficie unidas al polipéptido enlace-polipéptido fijo y las células no ligadas entonces se lavan fuera. Este método de afinidad-enlace es útil para purificar, seleccionar, o separar tales células que expresan un polipéptido a partir de la solución. Los métodos de liberación de las células seleccionadas positivamente de la fase sólida se conocen en el arte y se abarcan, por ejemplo, el uso de las enzimas. Tales enzimas preferiblemente son no-tóxicas y no-dañinas a las células y preferiblemente se dirigen a la división de la célula superficial de enlace asociado. Como alternativa, las mezclas de células sospecha a partir de las células que contienen polipéptido-expresión de la invención primero se puede incuban con un polipéptido enlace-polipéptido biotinilado de la invención. Los periodos de incubación típicamente son al menos de una hora en duración para asegurar el enlace suficiente a los polipéptidos de la invención. La mezcla resultante luego se pasa a través de una columna empacada con perlas cubiertas de avidina, por lo cual la alta afinidad de la biotina por la avidina proporciona el enlace de las células con enlace-polipéptido a las perlas. El uso de las perlas cubiertas de avidina se conoce en el arte. See Berenson, *et al. J. Cell. Biochem.*, 10D:239 (1986). Lavar el material no ligador y la liberación de las células ligadas se realiza utilizando métodos convencionales.

El polipéptido también se puede producir por síntesis química convencional conocida. Los métodos de construcción de los polipéptidos de la presente invención por medios sintéticos se conocen por aquellos de habilidad en el arte. Las secuencias de polipéptidos construidos sintéticamente, en virtud de compartir las características estructurales primarias, secundarias o terciarias y/o conformacionales con los polipéptidos pueden poseer propiedades biológicas en común con esto, incluyendo la actividad del polipéptido. De esta manera, pueden se empleados como sustitutos biológicamente activos o inmunológicos para los polipéptidos naturales, purificados en la selección de los compuestos terapéuticos y en procesos inmunológicos para el desarrollo de anticuerpos.

El grado deseado de pureza depende del uso previsto del polipéptido. Un grado de pureza relativamente alto se desea cuando el polipéptido debe ser administrado *in vivo*, por ejemplo. En tal caso, los polipéptidos se purifican hasta que no haya bandas de polipéptido que correspondan a otros polipéptidos detectables bajo un análisis por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Será reconocido por alguien de habilidad en el pertinente campo de las bandas múltiples que corresponden al polipéptido pueden ser visualizados por SDS-PAGE, debido a la glicosilación diferencial, tratamiento post-traducción diferencial, y similares. Más preferiblemente, el polipéptido de la invención se purifica a la homogeneidad sustancial, según lo indicado por una sola banda del polipéptido en un análisis por SDS-PAGE. La banda del polipéptido se puede visualizar por tinción de plata, tinción de azul de Coomassie, o (si el polipéptido es radiomarcado) por autoradiografía.

Antagonistas y Agonistas de los Polipéptidos de Claudina de la Invención

Cualquier método que neutraliza los polipéptidos de Claudina de la invención o inhibe la expresión del gen Claudin-21 humano (tanto transcripción como traducción) se puede utilizar para reducir las actividades biológicas de los polipéptidos de Claudina de la invención. En modalidades particulares, los antagonistas inhiben el enlace de al menos un polipéptido Claudin-21 humano a los enlaces asociados expresados en las células, por consiguiente la inhibición de las actividades biológicas inducidas por el enlace de aquellos polipéptidos de Claudina de la invención a las células. En ciertas otras modalidades de la invención, los antagonistas se pueden diseñar para reducir el nivel del gen de expresión Claudin-21 humano endógeno, por ejemplo, usando la metodología del ribozima o antisentido bien conocido para inhibir o prevenir la traducción de la transcripción del ARNm Claudin-21 humano; metodologías de triple hélice para inhibir la transcripción del gen Claudin-21 humano; o recombinación homóloga blanco para inactivar o “noqueado” el gen Claudin-21 humano o sus elementos potenciadores o promotores endógenos. Tal ribozima, antisentido, y antago-

nistas de triple hélice se pueden diseñar para reducir o inhibir la actividad del gen Claudin-21 humano mutante ya sea intacto, o si es apropiado. Las técnicas para la producción y uso de tales moléculas son bien conocidas por aquellos de habilidad en el arte.

5 Las moléculas de ADN y ARN antisentido actúan para bloquear directamente la traducción del ARNm por hibridación al ARNm blanco y previniendo la traducción del polipéptido. Las metodologías antisentido involucra el diseño de los oligonucleótidos (ya sea ADN o ARN) que son complementarias a un ARNm Claudin-21 humano. Los oligonucleótidos antisentido se unirán al gen ARNm blanco complementario transcriben y previenen la traducción. La absoluta complementariedad, aunque se prefiere, no se requiere. Una secuencia “complementaria” a una porción de un ácido nucleico, según lo referido aquí, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para ser capaz de hibridar con el ácido nucleico, formando un dúplex estable (o triple, como apropiado). En el caso de los ácidos nucleicos antisentido bicatenarios, un monocatenario del ADN dúplex puede de esta manera ser probada, o la formación del triplex se puede ensayar. La capacidad de hibridación dependerá del grado de complementariedad y la longitud del ácido nucleico antisentido. Los oligonucleótidos que se complementan al extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, trabajaría más eficientemente en la inhibición de traducción. Sin embargo, los oligonucleótidos complementarios para ya sea las regiones 5' - o 3' - no-traducidas, no-codificadas del gen Claudin-21 humano transcrito podría ser utilizado en una metodología antisentido para inhibir la traducción del ARNm Claudin-21 humano endógeno. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm incluirían el complemento del codón inicial AUG. Los ácidos nucleicos antisentido serían al menos seis nucleótidos en longitud, y preferiblemente son oligonucleótidos fluctuando de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos en longitud. En aspectos específicos el oligonucleótido es al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de estos, monocatenario o bicatenario. El oligonucleótido se puede modificar en la fracción base, fracción azúcar, o esqueleto fosfato, por ejemplo, mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos anexos tal como péptidos (por ejemplo, para los receptores de célula huésped blanco *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a lo largo de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. WO88/09810, published Dec. 15, 1988), o agentes de división hibridación-provocada o agentes intercalantes. (Ver, por ejemplo, Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549). Las moléculas antisentido serían entregadas a las células que expresan la transcripción Claudin-21 humano *in vivo*. Un número de métodos han sido desarrollados para enviar el ADN antisentido o ARN a las células; por ejemplo, las moléculas antisentido se pueden inyectar directamente en el tejido o sitio de derivación de la célula, o moléculas antisentido modificadas, diseñadas para dirigir las células deseadas (por ejemplo, antisentido ligados a péptidos o anticuerpos que específicamente unen los receptores o antígenos se expresan sobre la superficie de la célula blanco) se pueden administrar sistemáticamente. Sin embargo, es con frecuencia difícil lograr concentraciones intracelulares del antisentido suficiente para suprimir la traducción de los mARNs endógenos. Por consiguiente una metodología preferida utiliza una construcción de ADN recombinante en la cual el oligonucleótido antisentido se coloca bajo el control de un promotor pol III o pol II fuerte. El uso de tal construcción para transfectar células diana en el paciente resultará en la transcripción de cantidades suficientes de ARNs monocatenarios que formaran pares de base complementarios con el gen Claudin-21 humano endógeno transcribe y por consiguiente previene la traducción del ARNm Claudin-21 humano. Por ejemplo, un vector puede ser introducido *in vivo* tal que se toma por una célula y dirige la transcripción de un ARN antisentido. Tal como un vector puede permanecer episomal o llegar a ser cromosómicamente integrado, mientras que se pueda transcribir para producir el antisentido ARN deseado. Tales vectores se pueden construir por métodos estándar en el arte de tecnología de ADN recombinante. Los vectores pueden ser plásmido, viral, u otros conocidos en el arte, usados para la replicación y expresión en las células de mamífero.

Las moléculas de ribozima diseñadas para dividir catalíticamente el ARNm Claudin-21 humano transcritas también se pueden utilizadas para prevenir la traducción del ARNm humano Claudin-21 y la expresión de los polipéptidos de Claudina de la invención. (Ver, por ejemplo, PCT International Publication W090J11364, published Oct. 4, 1990; Patente U.S. No. 5,824,519). Los ribozimas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen ribozimas de cabezas de martillo (Haseloff y Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591), ARN endoribonucleasas (desde este punto “ribozimas tipo-Cech”) tal como la cual ocurre naturalmente en Tetrahymena Thermophila (conocido como el ARN IVS, o L-19 IVS) y que ha sido extensivamente descrito por Thomas Cech y colaboradores (Aplicación de la Patente Internacional No. WO 88/04300; Been y Cech, 1986, Cell, 47:207-216). Como en la metodología antisentido, los ribozimas se pueden componer de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para mejorar la estabilidad, blanco, etc.) y sería entregada a las células que expresan el polipéptido Claudin-21 humano *in vivo*. Un método preferido de entrega involucra el uso de una construcción de ADN “que codifica” el ribozima bajo el control de un promotor pol III o pol II constitutivo fuerte, así que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes del ribozima para destruir los mensajes Claudin-21 humanos endógenos e inhibir la traducción. Puesto que los ribozimas, las moléculas antisentido diferentes, son catalíticas, una concentración intracelular inferior se necesita para la eficiencia.

Como alternativa, la expresión gen Claudin-21 humano endógeno se puede reducir dirigiendo las secuencias del deoxiribonucleótido complementario a la región reguladora del gen diana (i.e., el promotor y/o mejoradores del gen diana) para formar las estructuras helicoidales triples que previenen la transcripción del gen Claudin-21 humano blanco. (Ver generalmente, Helene, 1991, Anticancer Drug Des., 6(6), 569-584; Helene, *et al.*, 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660, 27-36; y Maher, 1992, Bioassays 14(12), 807-815).

El ARN anti-sentido y ADN, ribozima, y las moléculas de triple hélice de la invención se puede preparar por cualquier método conocido en el arte para la síntesis de las moléculas de ADN y ARN. Estas técnicas incluyen para oligodeoxiribonucleótidos y oligoribonucleótidos sintetizando químicamente bien conocidos en el arte tal como por ejemplo síntesis química fosforamídita en fase sólida. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar por métodos estándar conocidos en el arte, por ejemplo por el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como están disponibles comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, los oligonucleótidos fosforotioato se pueden sintetizar por el método de Stein *et al.*, 1988, Nucl. Acids Res. 16:3209. Los oligonucleótidos metilfosfonato se pueden preparar por el uso de soportes de polímero de vidrio de poro controlado (Sarin *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451). Como alternativa, las moléculas de ARN se pueden generar por transcripción *in vitro* e *in vivo* transcripción de las secuencias de ADNs que codifican la molécula de ARN antisentido. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan los promotores de polimeras de ARN apropiados tal como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Como alternativa, las construcciones de ADNc anti-sentido que sintetizan el ARN antisentido esencial o induciblemente, dependiendo del promotor utilizado, se puede introducir establemente en las líneas celulares.

La expresión del gen diana endógeno también se puede reducir por la inactivación o “anulación” del gen diana o su promotor utilizando la recombinación dirigida homóloga (por ejemplo, ver Smithies, *et al.*, 1985, Nature 317, 230-234; Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51, 503-512; Thompson, *et al.*, 1989, Cell 5, 313-321). Por ejemplo, un mutante, gen diana no-funcional (o una secuencia de ADN no relacionada completamente) flanqueado por un ADN homólogo al gen diana endógeno (tanto las regiones codificantes o regiones reguladoras del gen diana) se pueden utilizar, con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar las células que expresan el gen diana *in vivo*. La inserción de la construcción de ADN, vía una recombinación dirigida homóloga, resulta en la inactivación del gen diana. Tales metodologías particularmente son convenientes en el campo de la agricultura donde la modificaciones a las células ES (tallo embrionario) se pueden utilizar para generar la descendencia del animal con un gen diana inactivo (por ejemplo, ver Thomas y Capecchi, 1987 y Thompson, 1989, *supra*), o en los organismos del modelo tal como *Caenorhabditis elegans* donde la técnica “interferencia de ARN” (“ARNi”) (Grishok A, Tabara H, y Mello CC, 2000, Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*, Science 287 (5462): 2494-2497), o la introducción de los transgenes (Dernburg AF, Zalevsky J, Colaiacovo MP, y Villeneuve AM, 2000, Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line, Genes Dev. 14 (13): 1578-1583) se utilizan para inhibir la expresión de los genes diana específicos. Sin embargo esta metodología se puede adaptar para el uso en humanos a condición de que las construcciones de ADN recombinantes se administren o dirijan directamente al sitio requerido *in vivo* utilizando vectores virales apropiados.

Se proporcionan, los organismos que han mejorado, reducido, o modificado la expresión del gen(s) que corresponde a las secuencias de ácido nucleico reveladas aquí. El cambio deseado en la expresión del gen se puede lograr a través del uso de ácidos nucleicos o ribozimas antisentido que unen y/o dividen el ARNm transcrito a partir del (Albert y Morris, 1994, Trends Pharmacol. Sci. 15(7): 250-254; Lavarosky *et al.*, 1997, Biochem. Mol. Med. 62(1): 11-22; y Hampel, 1998, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol 58: 1-39). Los animales transgénicos que tienen múltiples copias del o los genes que corresponde a las secuencias del ácido nucleico reveladas aquí, preferiblemente se producen por transformación de las células con construcciones genéticas que se mantienen establemente dentro de las células transformadas y su progenie, se proporcionan. Los animales transgénicos que han modificado las regiones control genéticas que incrementan o reducen los niveles de expresión del gen, o que cambian los patrones de expresión del gen temporal o espacial, también se proporcionan (ver Patente Europea No. 0 649 464 B1). Además, los organismos se proporcionan en la cual el o los genes que corresponden a las secuencias del ácido nucleico se revela aquí han sido inactivados parcialmente o completamente, una inserción de secuencias extrañas en el correspondiente gen(s) o una delección de todo o parte del gen(s) correspondiente(s). La inactivación del gen parcial o completa se puede lograr una inserción, preferiblemente seguido por la exisión imprecisa, de elementos transponibles (Plasterk, 1992, Bioessays 14(9): 629-633; Zwaal *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(16): 7431-7435; Clark *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(2): 719-722), o una recombinación homóloga, preferiblemente detectada por estrategias de selección genética positiva/negativa (Mansour *et al.*, 1988, Nature 336: 348-352; U.S. Pat Nos. 5,464,764; 5,487,992; 5,627,059; 5,631,153; 5,614,396; 5,616,491; y 5,679,523). Estos organismos con la expresión del gen alterada son preferiblemente eucariotas y más preferiblemente son mamíferos. Tales organismos son útiles para el desarrollo de modelos no-humanos para el estudio de desórdenes que involucran el gen(s) correspondiente, y para el desarrollo de Sistemas de ensayo para la identificación de las moléculas que interactúan con el o los productos del polipéptido del o los genes correspondientes.

Los polipéptidos de Claudina de la invención ellos mismos también se pueden emplear en la inhibición de una actividad biológica de Claudin-21 humano en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Dentro de la invención se abarcan los dominios del bucle extracelular de los polipéptidos de Claudina de la invención que actúan como inhibidores “dominante negativo” de la función del polipéptido Claudin-21 humano nativo cuando se expresan como fragmentos o como componentes de los polipéptidos de fusión. Por ejemplo, un dominio del polipéptido purificado de la presente invención se puede utilizar para inhibir el enlace de los polipéptidos de Claudina de la invención con los enlaces asociados endógenos. Tal uso efectivamente bloquearía las interacciones del polipéptido Claudin-21 humano e inhibiría las actividades del polipéptido Claudin-21 humano. En aún otro aspecto de la invención, una forma soluble del enlace asociado Claudin-21 humano, el cual se expresa en las células epiteliales y/o endoteliales, se utiliza para unir a e inhibir competitivamente la activación del polipéptido Claudin-21 humano endógeno. Adicionalmente, los anticuerpos que unen a los polipéptidos de Claudina de la invención con frecuencia inhiben la actividad de Claudin-21 humano y actúan como antagonistas. Por ejemplo, los anticuerpos que específicamente reconocen uno o más epitopes de los

polipéptidos de Claudina de la invención, o epitopes de variantes conservados de los polipéptidos de Claudina de la invención, o fragmentos del péptido del polipéptido Claudin-21 humano se pueden utilizar en la invención para inhibir la actividad de Claudin-21 humano. Tales anticuerpos incluyen pero no se limitan a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por un banco de expresión Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos epitope-enlace de cualquiera de los anteriores. Como alternativa, los polipéptidos de Claudina de la invención purificados y modificados de la presente invención se pueden administrar para modular las interacciones entre los polipéptidos de Claudina de la invención y los enlaces asociados Claudin-21 humano que no están unidos a la membrana. Tal metodología permitirá un método alternativo para la modificación de la bioactividad influenciada del Claudin-21 humano.

En un aspecto alternativo, la invención además abarca el uso de los agonistas de la actividad de Claudin-21 humano para tratar o mejorar los síntomas de una enfermedad para la cual el incremento de la actividad de Claudin-21 humano es benéfico. Tales enfermedades incluyen pero no se limitan a inflamación, asma, alergia, metástasis de células cancerosas, desórdenes de transportes de iones tal como defectos de transporte de magnesio en el riñón, enfermedad inflamatoria del intestino, exposición a la enterotoxina del *Clostridium perfringens* (CPE), síndrome de muerte infantil súbita (SIDS), esclerosis múltiple (MS), encefalomiелitis autoinmune, neuritis óptica, y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML). En un aspecto preferido, la invención implica la administración de la composiciones que contienen un ácido nucleico Claudin-21 humano o un polipéptido Claudin-21 humano en células *in vitro*, en células *ex vivo*, en células *in vivo*, y/o en un organismo multicelular. Las formas terapéuticas preferidas del Claudin-21 humano son formas solubles, según lo descrito arriba. En todavía otro aspecto de la invención, las composiciones comprenden la administración de un ácido nucleico que codifica el Claudin-21 humano para la expresión de un polipéptido Claudin-21 humano en un organismo huésped para el tratamiento de una enfermedad. Particularmente preferidos en este respeto se expresa en un paciente humano para el tratamiento de una disfunción asociada con aberrante (por ejemplo, disminuir) la actividad endógena de un polipéptido Claudin-21 humano. Adicionalmente, la invención abarca la administración de las células y/o organismos de los compuestos encontrados para incrementar la actividad endógena de los polipéptidos de Claudina de la invención. Un ejemplo de los compuestos que incrementan la actividad del polipéptido Claudin-21 humano son anticuerpos agonistas, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que unen a los polipéptidos de Claudina de la invención o enlaces asociados, que pueden incrementar la actividad del polipéptido Claudin-21 humano causando el señalamiento intracelular constitutivo (o "imitación del ligando"), o previniendo el enlace de un inhibidor nativo de la actividad del polipéptido Claudin-21 humano.

Anticuerpos para los Polipéptidos de Claudina de la Invención

Los anticuerpos que son inmunoreactivos con los polipéptidos de la invención se proporcionan aquí. Tales anticuerpos específicamente unen a los polipéptidos vía los sitios de enlace-antígeno del anticuerpo (contrariamente al enlace no-específico). En la presente invención, específicamente los anticuerpos de enlace son aquellos que reconocerán específicamente y se uniran con los polipéptidos Claudina de la invención, homólogos, y variantes, pero no con otras moléculas. En una modalidad preferida, los anticuerpos son específicos para los polipéptidos de la presente invención y no reaccionan en cruz con otros polipéptidos. De esta manera, los polipéptidos de Claudina de la invención, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, etc., como se publica anteriormente se pueden emplear como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunoreactivos con estos.

Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, etc. Contienen determinantes o epitopes antigénicos que elicitan la formación de anticuerpos. Estos determinantes o epitopes antigénicos pueden ser tanto lineales como conformacionales (discontinuo). Los epitopes lineales se componen de una sección sencilla de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epitopes conformacionales o discontinuos se componen de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena del polipéptido que se reúnen en una proximidad cercana en un polipéptido plegado (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Puesto que los polipéptidos plegados tienen complejos superficiales, el número de epitopes disponibles es muy numeroso; sin embargo, debido a la conformación del polipéptido e impedimentos estéricos, el número de anticuerpos que actualmente une a los epitopes es menor del número de epitopes disponibles (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Los epitopes se pueden identificar mediante cualquiera de los métodos conocidos en el arte. De esta manera, un aspecto de la presente invención se relaciona con los epitopes antigénicos de los polipéptidos de la invención. Tales epitopes son útiles para levantar los anticuerpos, en particular los anticuerpos monoclonales, según lo descrito con más detalle abajo. Adicionalmente, los epitopes de los polipéptidos de la invención se pueden utilizar como reactivos de investigación, en ensayos, y purificar anticuerpos de enlace específico de sustancias tal como suero policlonal o sobrenadantes de hibridomas cultivados. Tales epitopes o variantes de estos se pueden producir usando técnicas bien conocidas en el arte tales como síntesis de fase-sólida, división química o enzimática de un polipéptido, o utilizando tecnología de ADN recombinante.

Como a los anticuerpos que se pueden elicitar por los epitopes de los polipéptidos de la invención, si los epitopes han sido aislados o permanecen parte de los polipéptidos, ambos anticuerpos policlonales y monoclonales se pueden preparar por técnicas convencionales. Ver, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, New York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Kohler y Milstein, (U.S. Pat No. 4,376,110); the human B-célula hibridoma técnica (Kosbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole *et al.*, 1983, *Proa Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030); y the EBV-hibridoma technique (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal*

Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Las líneas celulares de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos de la invención también se contemplan aquí. Tales hibridomas se pueden producir e identificar por técnicas convencionales. La producción del hibridoma el mAb de esta invención se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. La producción de altos títulos de mAbs *in vivo* hace que este sea actualmente el método de producción preferido. Un método de producción de tal hibridoma de línea celular comprende la inmunización de un animal con un polipéptido; recolectando las células de bazo del animal inmunizado; dicha fusión de las células de bazo con una línea celular de mieloma, por consiguiente generando las células de hibridoma; e identificando una línea celular hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que une el polipéptido. Para la producción de anticuerpos, varias animales huésped puede ser inmunizado por inyección con uno o más de los siguientes: un polipéptido Claudin-21 humano, un fragmento de un polipéptido Claudin-21 humano, un equivalente funcional de un polipéptido Claudin-21 humano, o una forma mutante de un polipéptido Claudin-21 humano. Tales animales huésped pueden incluir pero no se limitan a conejos, ratones, y ratas. Varios ayudantes se pueden usar para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huésped, incluyendo pero no limitado a Freund's (completo e incompleto), geles de mineral tal como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tal como lisolecitina, polioles pluriónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y potencialmente útiles los ayudantes humanos tales como BCG (bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los anticuerpos monoclonales se pueden recuperar por técnicas convencionales. Tales anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgB, IgA, IgD y cualquier subclase de estos.

Además, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Takeda *et al.*, 1985, Nature, 314: 452-454) por el empalme de los genes de una molécula del anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula del anticuerpo humano de apropiada actividad biológica se pueden utilizar. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porciones se derivan de diferentes especies de animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un porcino mAb y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también incluyen versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales de murina. Tales anticuerpos humanizados se pueden preparar por técnicas conocidas y ofrecer la ventaja de reducir la inmunogenicidad cuando los anticuerpos se administran a los humanos. En una modalidad, un anticuerpo humanizado monoclonal comprende la región variable de un anticuerpo murina (o justo el sitio del enlace de antígeno de estos) y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de enlace de antígeno de un anticuerpo monoclonal murina y un fragmento de la región variable (carente del sitio de enlace-antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y adicionalmente el diseño incluyen aquellos descritos en Riechmann *et al.* (Nature 332:323, 1988), Liu *et al.* (PNAS 84:3439, 1987), Larrick *et al.* (Bio/Technology 7:934, 1989), y Winter y Harris (TIPS 14:139, Can, 1993). Los procedimientos para generar los anticuerpos transgénicamente se pueden encontrar en GB 2,272,440, Patente U.S. Nos. 5,569,825 y 5,545,806 y la patentes relacionadas reivindicadas con prelación de esta. Preferiblemente, para el uso en humanos, los anticuerpos son humanos o humanizados; las técnicas para la creación de tales anticuerpos humanos o humanizados también son bien conocidas y están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Medarex Inc. (Princeton, NJ) y Abgenix Inc. (Fremont, CA).

Los fragmentos del anticuerpo enlace-antígeno que reconocen los epitopes específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen pero no se limitan a: los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir por digestión de pepsina de la molécula del anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los enlaces disulfuro de los fragmentos (ab')₂. Como alternativa, se pueden construir, bibliotecas de expresión Fab (Huse *et al.*, 1989, Science, 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada. Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward *et al.*, 1989, Nature 334:544-546) también se pueden adaptar para producir los anticuerpos de cadena sencilla contra productos de genes Claudin-21 humano. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada o liviana de la región Fv vía un enlace de aminoácido, resultando en un polipéptido de cadena sencilla. Además, los anticuerpos al polipéptido Claudin-21 humano pueden, a su vez, ser utilizados para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" el polipéptido Claudin-21 humano y que pueden unirse al polipéptido Claudin-21 humano utilizando técnicas bien conocidas por aquellos de habilidad en el arte. (Ver, por ejemplo, Greenspan & Bona, 1993, FASEB J 7(5):437-444; y Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8):2429-2438).

Los procedimientos de selección por los cuales tales anticuerpos puedan ser identificados son bien conocidos, y pueden involucrar la cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo. Los anticuerpos pueden ser seleccionados por las propiedades agonistas (La, ligando-imitación). Tales anticuerpos, bajo enlace a la superficie celular de Claudin-21 humano, inducen los efectos biológicos (por ejemplo, transducción de señales biológicas) similares a los efectos biológicos inducidos cuando el enlace asociado Claudin-21 humano se une a la superficie celular Claudin-21 humano. Los anticuerpos agonistas se pueden utilizar para inducir las sendas estimulantes mediadas por Claudin-21 humano o la comunicación intercelular.

Aquellos anticuerpos que pueden bloquear el enlace de los polipéptidos de Claudina de la invención con los enlaces asociados para Claudin-21 humano se pueden utilizar para inhibir la comunicación intercelular mediada del Claudin-21 humano o la co-estimulación que resulta de tal enlace. Tal bloqueo de anticuerpos se puede identificar utilizando cualquier procedimiento de ensayo apropiado, tal como experimentando los anticuerpos para la capacidad para inhibir el enlace del enlace de Claudin-21 humano a ciertas células que expresan un enlace asociado Claudin-21 humano. Como alternativa, el bloqueo de los anticuerpos se puede identificar en ensayos para la capacidad para inhibir un efecto

biológico que resulta del enlace de Claudin-21 humano con las células diana. Los anticuerpos se pueden ensayar para la capacidad de inhibir las sendas estimulantes mediadas por el enlace asociado de Claudin-21 humano, por ejemplo. Tal anticuerpo se puede emplear en un procedimiento *in vitro*, o administrado *in vivo* para inhibir una actividad biológica mediada por la entidad que genera el anticuerpo. Los desórdenes causados o exacerbados (directa o indirectamente) por la interacción del Claudin-21 humano con el receptor del enlace asociado de la superficie celular de esta manera pueden ser tratados. Un método terapéutico involucra la administración *in vivo* de un bloqueo del anticuerpo a un mamífero en una cantidad efectiva en la inhibición de la actividad biológica mediada del enlace asociado Claudin-21 humano. Los anticuerpos monoclonales generalmente son preferidos para el uso en tales métodos terapéuticos. En una modalidad, se emplea, un fragmento del anticuerpo enlace-antígeno. Las composiciones que comprenden un anticuerpo que se dirige contra el Claudin-21 humano y se proporcionan aquí, un diluyente, excipiente, o portador aceptable fisiológicamente. Los componentes apropiados de tales composiciones son como se describen abajo para las composiciones que contienen los polipéptidos de Claudina de la invención.

También se proporcionan aquí los conjugados que comprenden un detectable (por ejemplo, diagnóstico) o agente terapéutico, unidos al anticuerpo. Ejemplos de tales agentes están presentes arriba. Los conjugados encuentran uso en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos de la invención, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los anticuerpos también se pueden emplear en la purificación de los polipéptidos o fragmentos de la invención por cromatografía de inmunoafinidad.

20 *Diseño Racional de los Compuestos que Interactúan con los Polipéptidos de Claudina de la Invención*

El objetivo del diseño del fármaco racional es producir análogos estructurales biológicamente activos de los polipéptidos de interés o de pequeñas moléculas con las cuales interactúan, por ejemplo, inhibidores, agonistas, antagonistas, etc. Cualquiera de los ejemplos se puede utilizar para formar fármacos que sean formas del polipéptido más activas o estables o que mejoren o interfieran con la función de un polipéptido *in vivo* (Hodgson J (1991) *Biotechnology* 9:19-21). En una metodología, la estructura tridimensional de un polipéptido de interés, o de un complejo polipéptido-inhibidor, se determina por cristalografía de rayos x, por resonancia magnética nuclear, o por moldeado de homología por ordenador o, más típicamente, por una combinación de estas metodologías. Ambas la forma y cargas del polipéptido deben ser verificadas para elucidar la estructura y para determinar el o los sitios activos de la molécula. Menos frecuente, la información útil respecto a la estructura de un polipéptido se puede ganar por moldeado basado en la estructura de los polipéptidos homólogos. En ambos casos, la información estructural relevante se utiliza para diseñar las moléculas análogas como-serpin, para identificar los inhibidores eficientes, o para identificar pequeñas moléculas que pueden unir las serpinas. Ejemplos útiles del fármaco de diseño racional pueden incluir moléculas que tienen mejorada la actividad o estabilidad según se muestra por Braxton S y Wells JA (1992 *Biochemistry* 31:7796-7801) o que actúa como inhibidores, agonistas, o antagonistas de los péptidos nativos según se muestra por Athauda SB *et al* (1993 *J Biochem* 113:742-746). El uso de la información estructural del polipéptido Claudin-21 humano en Sistemas de software de moldeado molecular para ayudar en el diseño del inhibidor y la interacción del inhibidor-polipéptido Claudin-21 humano también se abarca por la invención. Un método particular de la invención comprende el análisis de la estructura tridimensional de los polipéptidos de Claudina de la invención para los probables sitios de enlace de los substratos, sintetizando una nueva molécula que incorpora un sitio reactivo predecible, y analizando la nueva molécula según lo descrito adicionalmente aquí.

También es posible aislar un anticuerpo diana-específico, seleccionado por un ensayo funcional, según lo descrito adicionalmente aquí, y luego solucionar su estructura de cristal. Esta metodología, en-principio, produce un farmanúcleo sobre el cual el subsiguiente diseño del fármaco se puede basar. Es posible desviar la cristalografía del polipéptido en conjunto generando los anticuerpos anti-idiotípicos (anti-ids) para un anticuerpo, funcional activo farmacológicamente. Como un reflejo exacto de un reflejo exacto, se esperaría que el sitio de enlace del anti-ids sea un análogo del receptor original. El anti-id luego se podría utilizar para identificar y aislar los péptidos de los bancos de los péptidos producidos química o biológicamente. Entonces los péptidos aislados actuarían como el farmanúcleo.

50 *Ensayos de Actividades de los Polipéptidos de Claudina de la Invención*

Los polipéptidos de Claudina de la invención purificados (incluyendo polipéptidos, polipéptidos, fragmentos, variantes, oligómeros, y otras formas) son útiles en una variedad de ensayos. Por ejemplo, las moléculas Claudin-21 humano de la presente invención se pueden utilizar para identificar los enlaces asociados de los polipéptidos de Claudina de la invención, que también se pueden utilizar para modular la comunicación intercelular o actividad celular. Como alternativa, se pueden utilizar para identificar las moléculas asociadas-no-enlace o sustancias que modulan la comunicación intercelular o actividad celular.

60 *Ensayos para Identificar los Enlaces Asociados.* Los polipéptidos de Claudin-21 humano y los fragmentos de estos se pueden utilizar para identificar los enlaces asociados. Por ejemplo, se pueden examinar para la capacidad de unión de un enlace asociado candidato en cualquier ensayo apropiado, tal como un ensayo de enlace convencional. Para ilustrar, el polipéptido Claudin-21 humano se puede etiquetar con un reactivo detectable (por ejemplo, un radionúclido, cromóforo, enzima que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica, y similares). El polipéptido marcado se contacta con las células que expresan el enlace asociado candidato. Las células luego se lavan para eliminar polipéptido no unido marcado, y la presencia del enlace de la célula marcado se determina por una técnica apropiada, escogida de acuerdo con la naturaleza del marcador.

Un ejemplo de un procedimiento de ensayo de enlace es como sigue. Un vector de expresión recombinante que contiene el ADNc del enlace asociado candidato se construye. Las células CV1-EBNA-1 en platos de 10 cm² se transfectan con este vector de expresión recombinante. Las células CV-1/BBNA-1 (ATCC CRL 10478) constitutivamente expresan EBV nuclear antígeno-I conducido de los potenciadores/promotor CMV Inmediato-próximo. La CV1-EBNA-1 se derivó de la línea celular del riñón del Mono Verde Africano CV-1 (ATCC CCL 70), según lo descrito por McMahan *et al.*, (*EMBO J.* 10:2821,1991). Las células transfectadas se cultivaron por 24 horas, y las células en cada plato luego se dividen en una placa de 24-pozos. Después de 48 horas adicionales de cultivo, las células transfectadas (aproximadamente 4 x 10⁴ células/pozo) se lavan con BM-NFDM, que es el medio de enlace (RPMI 1640 que contiene 25 mg/ml albúmina de suero bovino, 2 mg/ml azida de sodio, 20 mM Hepes pH 7.2) al cual se le han adicionado 50 mg/ml de leche seca sin grasa. Las células luego se incubaron por 1 hora a 37°C con varias concentraciones de, por ejemplo, un polipéptido/Fc polipéptido de fusión soluble elaborado como se publica arriba. Las células luego se lavan e incuban con una concentración saturada constante de un IgG anti-humano de 125I-de ratón en medio de enlace, con agitación suave por 1 hora a 37°C. Después de un extenso lavado, las células se liberaron vía tripsinización. El IgG anti-humano de ratón empleado arriba se dirige contra la región Fc del IgG humano y se puede obtener de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. El anticuerpo es radioiodinado utilizando el método estándar cloramina-T. El anticuerpo se unirá a la porción Fc de cualquier polipéptido/polipéptido Fc que tenga un enlace a las células. En todos los ensayos, enlace no-específico del ¹²⁵I-anticuerpo se analiza en la ausencia del polipéptido de fusión Fc /Fc, así como en la presencia del polipéptido de fusión Fc y un exceso molar de 200-veces del anticuerpo humano anti-IgG de ratón sin marcar. El enlace de la célula ¹²⁵I-anticuerpo se cuantifica en un contador Packard Autogamma. Los cálculos de afinidad (Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660, 1949) se generaron en RS/1 (BBN Software, Boston, MA) corridos en un ordenador Microvax. El enlace también se puede detectar utilizando métodos que son bien apropiados para procedimientos de selección de alto- rendimiento, tal como ensayos de proximidad de centelleo (Udenfriend S, Gerber LD, Brink L, Spector S, 1985, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8672-8676), métodos de fluorescencia tiempo-resuelto homogéneo (Park YW, Cummings RT, Wu L, Zheng S, Cameron PM, Woods A, Zaller DM, Marcy AI, Hermes JD, 1999, *Anal Biochem* 269: 94-104), métodos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (ERET) (Clegg RM, 1995, *Curr Opin Biotechnol* 6:103-110), o métodos que miden cualquier cambio en la resonancia del plasmón superficial cuando un enlace polipéptido se expone a un enlace asociado potencial, tales métodos utilizan por ejemplo un biosensor tal como el suministrado por Biacore AB (Uppsala, Sweden).

Ensayos de Dos-Híbrido de la Levadura o "Interacción Trap" Cuando el polipéptido Claudin-21 humano se une o se une potencialmente a otro polipéptido (tal como, por ejemplo, en una interacción receptor-ligando), el ácido nucleico que codifica el polipéptido Claudin-21 humano también se puede utilizar en los ensayos interacción trap (tal como, por ejemplo, ese descrito en Gyuris *et al.*, *Cell* 75:791-803 (1993)) para identificar los ácidos nucleicos que codifican el otro polipéptido con el cual el enlace ocurre o para identificar los inhibidores de la interacción del enlace. Los polipéptidos involucrados en estas interacciones del enlace también se pueden utilizar para seleccionar para el péptido o los agonistas o inhibidores de moléculas pequeñas de la interacción del enlace.

Ensayos de Enlace competitivo. Otro tipo de ensayo de enlace apropiado es un ensayo de enlace competitivo. Para ilustrar, la actividad biológica de una variante se puede determinar analizando la capacidad de la variante para competir con el polipéptido nativo para el enlace del enlace asociado candidato. El ensayo de enlaces competitivo se puede realizar por una metodología convencional. Los reactivos que se pueden emplear en el ensayo de enlaces competitivo incluyen Claudin-21 humano radiomarcado y las células intactas que expresan el Claudin-21 humano (endógeno o recombinante) en la superficie celular. Por ejemplo, un fragmento Claudin-21 humano radiomarcado soluble se pueden utilizar para competir con una variante de Claudin-21 humano soluble para unir a los receptores de la superficie celular. En lugar de las células intactas, se podría sustituir un enlace asociado soluble/polipéptido de fusión Fc unido a una fase sólida a través de la interacción del Polipéptido A o Polipéptido G (en la fase sólida) con la fracción Fc. Las columnas de cromatografía que contienen Polipéptido A y Polipéptido G incluyen aquellas disponibles de Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ.

Ensayos para Identificar los Moduladores de la Comunicación Intercelular o la Actividad Celular. La influencia de los polipéptidos de Claudina de la invención en la comunicación intercelular o actividad celular se puede manipular para controlar estas actividades en las células diana. Por ejemplo, Los polipéptidos de Claudina de la invención revelados, ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención revelados, o agonistas o antagonistas de tales polipéptidos se pueden administrar a una célula o grupo de células para inducir, mejorar, suprimir, o detener la comunicación celular o la actividad en las células diana. La identificación de los polipéptidos de Claudina de la invención, agonistas o antagonistas que se pueden utilizar de esta manera se puede llevar a cabo vía una variedad de ensayos conocidos por aquellos de habilidad en el arte. Incluidos en tales análisis están aquellos que evalúan la capacidad de un polipéptido Claudin-21 humano para influenciar la comunicación intercelular o actividad celular. Tal análisis involucraría, por ejemplo, el análisis de interacción celular en la presencia de un polipéptido Claudin-21 humano. En dicho ensayo, se podría determinar una velocidad de comunicación o estimulación celular en la presencia del polipéptido Claudin-21 humano y entonces determinar si dicha comunicación o estimulación celular se altera en la presencia de un agonista o antagonista candidato u otro polipéptido Claudin-21 humano. Ensayos ejemplares para este aspecto de la invención incluyen ensayos de secreción de la citoquina, ensayos de co-estimulación célula-T, y reacciones de linfocito mezclado que involucra el antígeno que presentan las células y las células T. Estos ensayos son bien conocidos por aquellos de habilidad en el arte.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de detección de la capacidad de un compuesto de prueba para afectar la comunicación intercelular o la actividad co-estimuladora de una célula. En este aspecto,

el método comprende: (1) contactar un primer grupo de células diana con un compuesto de prueba incluyendo un polipéptido receptor Claudin-21 humano o fragmento de estos, bajo condiciones apropiadas al ensayo particular que se utiliza; (2) medir la velocidad neta de la comunicación intercelular o la co-estimulación entre las células diana; y (3) observar la velocidad neta de comunicación intercelular o co-estimulación entre las células control que contienen los polipéptidos receptor Claudin-21 humano o los fragmentos de estos, en la ausencia de un compuesto de prueba, bajo condiciones idénticas por otra parte como el primer grupo de células. En esta modalidad, la velocidad neta de comunicación intercelular o co-estimulación en las células control se comparan con aquellas de las células tratadas con ambas moléculas del Claudin-21 humano así como un compuesto de prueba. La comparación proporcionará una diferencia en la velocidad neta de la comunicación intercelular o co-estimulación tal que un realizador de la comunicación intercelular o co-estimulación se puede identificar. El compuesto de prueba puede funcionar como un realizador activando o favoreciendo la expresión, o inhibiendo o reduciendo la expresión de la comunicación intercelular o co-estimulación, y se puede detectar a través de este método.

Análisis de Proliferación celular, Muerte Celular, Diferenciación Celular, y Adhesión Celular. Un polipéptido de la presente invención puede mostrar la actividad de citoquina, de la proliferación celular (tanto induciendo como inhibiendo) o la diferenciación celular (tanto induciendo como inhibiendo) o puede inducir la producción de otras citoquinas en ciertas poblaciones de células. Varios factores del polipéptido descubiertos a la fecha, incluyendo todas las citoquinas conocidas, han exhibido actividad en uno o más ensayos de proliferación celular factor dependiente, y por consiguiente los ensayos sirven como una confirmación conveniente de la actividad de citoquina. La actividad de un polipéptido de la presente invención se muestra por cualquiera de un número de ensayos rutinarios de proliferación celular factor dependiente para las líneas celulares incluyendo, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G. M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK. La actividad de un polipéptido Claudin-21 humano de la invención puede, entre otras formas; ser medido por los siguientes métodos:

Análisis para el movimiento celular y la adhesión incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (Chapter 6.12, Measurement of alpha y beta Chemokines 6.12.1-6.12.28; Taub *et al.* J. Clin. Invest. 95:1370-1376, 1995; Lind *et al.* APMIS 103:140-146, 1995; Muller *et al.* Eur. J. Immunol. 25: 1744-1748; Gruber *et al.* J. of Immunol. 152:5860-5867, 1994; Johnston *et al.* J. of Immunol. 153: 1762-1768, 1994

Análisis para la actividad supresora adhesiva e invasiva de la caderina incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Hortsch *et al.* J Biol Chem 270 (32): 18809-18817, 1995; Miyaki *et al.* Oncogene 11: 2547-2552, 1995; Ozawa *et al.* Cell 63:1033-1038, 1990.

Diagnóstico y Otros Usos de los Polipéptidos de Claudina de la Invención y los Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención proporcionados por la presente invención se pueden utilizar para numerosos útiles propósitos de diagnóstico u otros. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden utilizar para expresar el polipéptido recombinante para análisis, caracterización o uso terapéutico; como marcadores para tejidos en los cuales el polipéptido correspondiente se expresa preferencialmente (tanto constitutivamente como en una etapa particular de la diferenciación del tejido o desarrollo o en las etapas de la enfermedad); como marcadores de peso molecular en geles Southern; como marcadores de cromosomas o tags (cuando se marcan) para identificar los cromosomas o para hacer un mapa de las posiciones de genes relacionados; para comparar con secuencias de ADN endógeno en pacientes para identificar desórdenes genéticos potenciales; como sondas para hibridar y de esta manera descubrir secuencias de ADN relacionadas, novedosas; como una fuente de información para derivar los cebadores PCR para la toma de impresiones digitales genéticas; como una sonda para "sustraer" las secuencias conocidas en el proceso de descubrimiento de otros ácidos nucleicos novedosos; para seleccionar y construir los oligómeros para unir a un "gen chip" u otro soporte, incluyendo para el análisis de los patrones de expresión; para construir los anticuerpos anti-polipéptido utilizando técnicas de inmunización del ADN; como un antígeno para construir anti anticuerpos -ADN o producir otra respuesta inmune, y para terapia génica. Usos de los polipéptidos de Claudina de la invención y polipéptidos fragmentados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: purificación de los polipéptidos y medición de la actividad de estos; agentes de entrega; reactivos terapéuticos y de investigación; marcadores enfocados isoeléctricos y peso molecular; controles para la fragmentación del péptido; identificación de los polipéptidos desconocidos; y preparación de anticuerpos. Cualquiera o todos los ácidos nucleicos apropiados para estos usos son capaces de ser desarrollados en grado reactivo o forma de kit para la comercialización como productos. Los métodos para realizar los usos listados arriba son bien conocidos por aquellos de habilidad en el arte. Las referencias reveladas en tales métodos incluyen sin limitación "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis eds., 1989, y "Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press, Berger, S. L. y A. R. Kimmel eds., 1987.

Sondas y Cebadores. Entre los usos de los ácidos nucleicos Claudin-21 humano revelados, y las combinaciones de fragmentos de estos, esta el uso de los fragmentos como sondas o cebadores. Tales fragmentos generalmente comprenden al menos aproximadamente 17 nucleótidos continuos de una secuencia de ADN. En otras modalidades, un fragmento de ADN comprende al menos 30, o al menos 60, nucleótidos continuos de una secuencia de ADN. Los parámetros básicos que afectan la opción de las condiciones de hibridación y dirección para idear las condiciones apropiadas se publican por Sambrook *et al.*, 1989 y se describen en detalle arriba. Utilizando el conocimiento del

código genético en combinación con las secuencias de aminoácido publicadas arriba, conjuntos de los oligonucleótidos degenerados se pueden preparar. Tales oligonucleótidos son útiles como cebadores, por ejemplo, en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), por lo cual fragmentos de ADN se aíslan y amplifican. En ciertas modalidades, los cebadores degenerados se pueden utilizar como sondas para bancos genéticos no-humanos. Tales bancos incluirían pero no se limitan a bancos ADNc, bancos genómicos, e incluso EST electrónica (tag de secuencia expresada) o bancos de ADN. Las secuencias homólogas identificadas por este método luego serían utilizadas como sondas para identificar homólogos no-humanos del Claudin-21 humano.

Mapeo Cromosómico. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención, y los fragmentos revelados y las combinaciones de estos ácidos nucleicos, se pueden utilizar por aquellos de habilidad en el arte utilizando técnicas bien conocidas para identificar el cromosoma humano para al cual estos ácidos nucleicos map. Técnicas útiles incluyen, pero no se limitan a, utilizar la secuencia o porciones, incluir los oligonucleótidos, como una sonda en varias técnicas bien conocidas tal como mapeo híbrido por radiación (resolución alta), hibridación *in situ* para diferenciar el cromosoma (resolución moderada), e hibridación Southern blot a las líneas celulares híbridas que contienen cromosomas humanos individuales (resolución baja). Por ejemplo, los cromosomas se pueden hacer mapas por hibridación por radiación. Primero, el PCR se realiza utilizando el Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research Genebridge4 panel of 93 radiation hybrids: www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/humanSTSreleasesruly97/rhmap/genebridge4.html. Los cebadores se utilizan, como falso dentro de un exón putativo del gen de interés y que amplifica un producto del ADN genómico humano, pero no amplifican el ADN genómico del hámster. Los resultados de los PCRs se convierten en un vector de datos que se someten al sitio Whitehead/MIT Radiation Mapping en el internet (wwwseq.wi.mitedu). El dato se puntúa y la asignación cromosómica y la colocación relativa para los marcadores conocidos del Sitio de la Secuencia Tag (STS) en el mapa híbrido por radiación se proporciona. El siguiente sitio web proporciona información adicional respecto al mapeo híbrido por radiación: www-genoma.wi.mit.edu/ftp/distribution/humanSTSreleases/july97/07-97.INTRO.html.

Diagnósticos y Terapia Génica. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención, y los fragmentos revelados y combinaciones de estos ácidos nucleicos se pueden utilizar por alguien de habilidad en el arte utilizando técnicas bien conocidas para analizar anomalías asociadas con los genes que corresponden a estos polipéptidos. Esto permite a alguien distinguir las condiciones en las cuales este marcador se reconfigura o suprime. Además, los ácidos nucleicos de la invención o un fragmento de estos se pueden utilizar como un marcador posicional para hacer mapas de otros genes de localización desconocida. El ADN se puede utilizar en el desarrollo de tratamientos para cualquier desorden mediado (directa o indirectamente) por cantidades defectuosos, o insuficientes de, los genes que corresponden a los ácidos nucleicos de la invención. Revelados aquí de las secuencias del nucleótido nativas permite la detección de genes defectuosos, y la reposición de estos con genes normales. Los genes defectuosos se pueden detectar en ensayos de diagnóstico *in vitro*, y por la comparación de una secuencia de nucleótido nativa revelada aquí con la de un gen derivado de una persona sospechada de hospedar un defecto en este gen.

Métodos de Selección para los Enlaces Asociados. Los polipéptidos de Claudina de la invención cada uno se pueden utilizar como reactivos en métodos para seleccionar o identificar los enlaces asociados. Por ejemplo, los polipéptidos de Claudina de la invención pueden estar unidos a un material soporte sólido y puede unirse a sus enlaces asociados de una manera similar a la cromatografía de afinidad. En modalidades particulares, un polipéptido se une a un soporte sólido por procedimientos convencionales. Como un ejemplo, columnas de cromatografía que contienen grupos funcionales que reaccionaran con los grupos funcionales sobre las cadenas laterales del aminoácido de los polipéptidos están disponibles (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). En una alternativa, un polipéptido/polipéptido Fc (como se discute arriba) se une a un Polipéptido A o Polipéptido G-que contiene las columnas de cromatografía a través de la interacción con la fracción Fc. Los polipéptidos de Claudina de la invención también encuentran uso en la identificación de células que expresan un enlace asociado sobre la superficie celular. Los polipéptidos se unen a una fase sólida tal como una matriz de columna cromatografía o un sustrato similar apropiado. Por ejemplo, las microesferas magnéticas se pueden cubrir con los polipéptidos y mantener en un recipiente de incubación a través de un campo magnético. Las suspensiones de mezclas de células que contienen células potenciales que expresan el enlace asociado, se ponen en contacto con la fase sólida que tiene los polipéptidos por consiguiente. Las células que expresan el enlace asociado sobre la superficie celular se unen a los polipéptidos fijos, y lavando se retiran las células no unidas. Como alternativa, los polipéptidos de Claudina de la invención se pueden conjugar a una fracción detectable, luego se incuban con células para ser analizadas para la expresión del enlace asociado. Después de la incubación, la materia marcada sin unir se elimina y la presencia o ausencia de la fracción detectable en las células se determina. En una alternativa adicional, las mezclas de células sospechadas de expresar el enlace asociado se incubaron con polipéptidos biotinilados. Los periodos de incubación son típicamente al menos una hora se duración para asegurar el enlace suficiente. La mezcla resultante luego se pasa a través de una columna empacada con perlas cubiertas de avidina, por lo cual la alta afinidad de biotina para avidina proporciona el enlace de las células deseadas a las perlas. Los procedimientos para utilizar las perlas cubiertas de avidina se conocen (ver Berenson, *et al.* J. Cell. Biochem., 10D:239, 1986). Lavando para eliminar el material no unido, y la liberación de las células unidas, se realizan utilizando los métodos convencionales. En algunos ejemplos, los métodos anteriores para seleccionar o identificar los enlaces asociados también se pueden utilizar o modificar para aislar o purificar dichas moléculas de enlace asociado o las células que los expresan.

Medición de la Actividad Biológica. Los polipéptidos también encuentran uso en la medición de la actividad biológica de los polipéptidos enlace- Claudin-21 humano en términos de su afinidad del enlace. Los polipéptidos de esta manera se pueden emplear por aquellos que conducen los estudios "control de calidad", por ejemplo, para

monitorear la vida en almacenamiento y la estabilidad del polipéptido bajo diferentes condiciones. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden emplear en un estudio de afinidad del enlace para medir la actividad biológica de un polipéptido enlace asociado que ha sido almacenado a diferentes temperaturas, o producido en diferentes tipos de célula. Los polipéptidos también se pueden utilizar para determinar si la actividad biológica se retiene después de la modificación de un polipéptido enlace asociado (por ejemplo, modificación química, truncamiento, mutación, etc.). La afinidad del enlace del polipéptido modificado se compara con el de un polipéptido enlace no-modificado para detectar cualquier impacto adverso de las modificaciones sobre la actividad biológica del enlace polipéptido. La actividad biológica de un polipéptido enlace de esta manera se puede verificar, antes de que se utilice en un estudio de investigación, por ejemplo.

10 *Agentes portadores y de entrega.* Los polipéptidos también encuentran uso como portadores para enviar agentes unidos a estos a las células que llevan enlaces asociados identificados. Los polipéptidos de esta manera se pueden utilizar para dar agentes terapéuticos o de diagnóstico a tales células (o a otros tipos de células encontrados para expresar los enlaces asociados en la superficie celular) en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Los agentes detectables (diagnóstico) y terapéuticos que se pueden unir a un polipéptido incluyen, pero no se limitan a, toxinas, otros agentes citotóxicos, fármacos, radionuclidos, cromóforos, enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica, y similares, con el agente particular que se selecciona de acuerdo con la proyección de la aplicación. Entre las toxinas están la ricina, abrina, toxina difteria, *Pseudomonas aeruginosa exotoxin A*, polipéptidos que inactivan el ribosoma, micotoxinas tales como tricotecenos, y derivados y fragmentos (por ejemplo, cadenas sencillas) de estos. Los radionuclidos apropiados para uso diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, ¹²³I, ¹³¹I, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, y ⁷⁶Br. Ejemplos de los radionuclidos apropiados para uso terapéutico son ¹³¹I, ²¹¹At, ⁷⁷Br, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ¹⁰⁹Pd, ⁶⁴Cu, y ⁶⁷Cu. Tales agentes se pueden pegar al polipéptido por cualquier procedimiento convencional apropiado. El polipéptido comprende los grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácido que se pueden hacer reaccionar con los grupos funcionales en un agente deseado para formar enlaces covalentes, por ejemplo. Como alternativa, el polipéptido o agente se puede derivatizar para generar o adherir un grupo funcional reactivo deseado. La derivatización puede involucrar la adherencia de uno de los reactivos acoplados bifuncionales disponibles para pegar las diversas moléculas a los polipéptidos (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Se conocen un número de técnicas para los polipéptidos radiomarcados. Los metales radionúclido se pueden pegar a los polipéptidos utilizando un agente quelante bifuncional apropiado, por ejemplo. Los polipéptidos que comprenden conjugados y un apropiado agente de diagnóstico o terapéutico (preferiblemente ligados covalentemente) se preparan de esta manera. Los conjugados se administran o por otra parte se emplean en una cantidad apropiada para la aplicación particular.

Tratamiento de Enfermedades con Polipéptidos de Claudina de la Invención y Sus Antagonistas

35 Se anticipa que los polipéptidos de Claudin de la invención, fragmentos, variantes, antagonistas, agonistas, anticuerpos, y enlaces asociados de la invención serán útiles para el tratamiento de condiciones médicas y enfermedades que incluyen, pero no limitan a, condiciones que involucran función de la barrera epitelial o endotelial o transporte de iones según lo descrito aquí adicionalmente. La molécula o moléculas terapéuticas que se usan dependerán de la etiología de la condición a ser tratada y las sendas biológicas involucradas, y las variantes, fragmentos, y enlaces asociados de los polipéptidos de Claudin de la invención pueden tener efectos similares a o diferentes de los polipéptidos de Claudin de la invención. Por ejemplo, un antagonista de la actividad de formación del empalme ajustado de los polipéptidos de Claudin de la invención se puede seleccionar para el tratamiento de condiciones que involucran la formación del empalme ajustado, pero un fragmento particular de un polipéptido Claudin-21 humano dado también puede actuar como un antagonista negativo del dominante efectivo de esa actividad. Por consiguiente, en el siguiente párrafo “polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas” se refiere a todos los polipéptidos de Claudin de la invención, los fragmentos, variantes, antagonistas, agonistas, anticuerpos, y enlaces asociados etc. de la invención, y se entiende que una molécula específica o las moléculas se pueden seleccionar de aquellos proporcionados como modalidades de la invención por individuos de habilidad en el arte, de acuerdo con las consideraciones biológicas y terapéuticas descritas aquí.

50 Los revelados polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas, composiciones y terapias de combinación descritas aquí son útiles en medicinas para el tratamiento bacterial, viral o infecciones protozoáricas, y las complicaciones que resultan de estos. Tal enfermedad es la *Mycoplasma pneumoniae*. Adicionalmente, se proporciona aquí el uso de polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas para tratar el SIDA y las condiciones relacionadas, tales como complejo demencial del SIDA, degeneración asociada con el SIDA, lipidistrofia debido a la terapia antiretroviral; y sarcoma de Kaposi. Proporcionado aquí es el uso de los polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas para el tratamiento de enfermedades protozoáricas, que incluyen malaria y esquistosomiasis. Adicionalmente se proporciona el uso de polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas para tratar erythema nodosum leprosum; meningitis bacterial o viral; tuberculosis, que incluyen tuberculosis pulmonar; y neumonitis secundaria por una infección bacterial o viral. También se proporciona aquí el uso de los polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas para preparar los medicamentos para el tratamiento de fiebres recurrentes llevando-piojos, tal como ese causado por *Borrelia recurrentis*. Los polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas de la invención también se pueden usar para preparar un medicamento para el tratamiento de condiciones causadas por virus del *Herpes*, tales como queratitis estromal herpético, lesiones de la córnea, y desórdenes de la córnea virus-inducido. Adicionalmente, los polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas se pueden utilizar en el tratamiento de infecciones de virus de papiloma humano. Los polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas de la invención se utilizan también para preparar medicamentos para tratar la influenza.

Los desórdenes cardiovasculares son medicables con los revelados polipéptidos de Claudin de la invención o antagonistas, las composiciones farmacéuticas o terapias de combinación, que incluyen aneurismas de aortas; arteritis; oclusión vascular, que incluyen oclusión de la arteria cerebral; complicaciones de cirugía de by-pass coronario; lesión de isquemia/reperfusión; enfermedad del corazón, que incluyen enfermedad del corazón aterosclerótica, miocarditis, que incluyen miocarditis autoinmune crónica y miocarditis viral; insuficiencia cardíaca, que incluyen insuficiencia cardíaca crónica (CHF), caquexia de insuficiencia cardíaca; infarto del miocardio; restenosis después de la cirugía cardíaca; isquemia miocárdica silenciosa; complicaciones post-implantación del dispositivo de asistencia ventricular izquierda; fenómeno de Raynaud; tromboflebitis; vasculitis, que incluyen vasculitis de Kawasaki; arteritis de célula gigante, granulomatosis de Wegener; y purpura de Schoenlein-Henoch.

Una combinación de al menos un polipéptido Claudin-21 humano o antagonista y uno o más otros factores de anti-angiogenesis se pueden utilizar para tratar tumores sólidos, por consiguiente reduciendo la vascularización que alimenta el tejido del tumor. Factores anti-angiogénicos apropiados para tales terapias de combinación incluyen los inhibidores IL-8, angiostatina, endostatina, kringle 5, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (tal como los anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular), angiopoietin-2 u otros antagonistas del angiopoietin-1, antagonistas del factor que activan la plaqueta y los antagonistas del factor de crecimiento fibroblastos básicos.

Además, los polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas, composiciones y terapias de combinación propuestos, se utilizan para tratar condiciones de dolor crónicas, tal como dolor pélvico crónico, incluyendo síndrome de dolor por prostatitis/pélvico crónico. Como un ejemplo adicional, los polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas y las composiciones y terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar el dolor post-herpético.

También se proporcionan los métodos para utilizar los polipéptidos de Claudina de la invención o los antagonistas, las composiciones o terapias de combinación para tratar varios desórdenes del sistema endocrino. Por ejemplo, los polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas se utilizan para tratar diabetes juvenil (incluye tipos de diabetes autoinmune y insulina-dependiente) y también para tratar diabetes de la madurez (incluye diabetes obesidad-mediada y no-insulina dependiente). Además, los compuestos sometidos, las composiciones y terapias de combinación se utilizan para tratar condiciones asociadas secundarias con diabetes, tal como retinopatía diabética, rechazo al trasplante de riñón en pacientes diabéticos, resistencia de la insulina de obesidad-mediada, y falla renal, que por si misma puede ser asociada con proteinuria e hipertensión. Otros desórdenes endocrinos también son medicables con estos compuestos, composiciones o terapias de combinación, incluyendo enfermedad de ovarios policísticos, X-ligados adrenoleucodistrofia, hipotiroidismo y tiroiditis, incluyendo tiroiditis de Hashimoto (i.e., tiroiditis autoinmune).

Las condiciones del sistema gastrointestinal también son medicables con polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas, composiciones o terapias de combinación, incluyendo enfermedad del celiaco. Además, los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar la enfermedad de Crohn; colitis ulcerativa; gastroparesis idiopática; pancreatitis, incluyendo pancreatitis crónica y lesión de pulmón asociadas con pancreatitis aguda; y úlceras, incluyendo úlceras gástrica y duodenal.

También se incluyen los métodos para utilizar los polipéptidos de Claudina de la invención o los antagonistas, las composiciones o terapias de combinación propuestos, para el tratamiento de desórdenes del sistema genitourinario, tal como glomerulonefritis, incluyendo glomerulonefritis autoinmune, glomerulonefritis debida a la exposición a toxinas o glomerulonefritis secundaria para infecciones con estreptococo hemolítico u otros agentes infecciosos. También son tratables con los compuestos, las composiciones y terapias de combinación de la invención, el síndrome urémico y sus complicaciones clínicas (por ejemplo, falla renal, anemia, y cardiomiopatía hipertrófica), incluyendo síndrome urémico asociado con exposición a las toxinas ambientales, fármacos u otras causas. Otras condiciones tratables con los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención son las complicaciones de hemodiálisis; condiciones de próstata, incluyendo hipertrofia prostática benigna, prostatitis no-bacteriana y prostatitis crónica; y complicaciones de hemodiálisis.

También se proporcionan aquí los métodos para utilizar los polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas, composiciones o terapias de combinación, para tratar varios desórdenes hematológicos y oncológicos. Por ejemplo, los polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas se utilizan para tratar varias formas de cáncer, incluyendo leucemia mielógena aguda, carcinoma nasofaríngeo Epstein-Barr virus-positivo, glioma, colon, estómago, próstata, célula renal, cánceres cervical y de ovarios, cáncer de pulmón (SCLC y NSCLC), incluyendo cáncer-asociado con caquexia, fatiga, astenia, síndrome paraneoplástico de caquexia e hipercalcemia. Las enfermedades adicionales tratables, con los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones o terapias de combinación propuestos, son los tumores sólidos, incluyendo sarcoma, osteosarcoma, y carcinoma, tal como adenocarcinoma (por ejemplo, cáncer de mama) y carcinoma de célula escamosa. Además, los compuestos, las composiciones o terapias de combinación propuestos, son útiles para el tratamiento de leucemia, incluyendo leucemia mielógena aguda, crónica o leucemia linfoblástica aguda y leucemia de células pilosas. Otras malignidades con potencial metastático invasivo se pueden tratar con los propuestos compuestos, composiciones y terapias de combinación, incluyendo múltiple mieloma. Además, los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones y terapias de combinación se pueden utilizar para tratar anemias y desórdenes hematológicos, incluyendo anemia de enfermedad crónica, anemia aplástica, incluyendo anemia aplástica de Fanconi; púrpura trombocitopénico idiopático (ITP); síndromes mielodisplásicos (incluyendo anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados,

anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación); metaplasia de mielofibrosis/mieloide; y crisis vasooclusiva de anemia falciforme.

5 Otras condiciones tratables por los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, composiciones y terapias de combinación incluyen aquellos que resultan de las heridas para la cabeza o médula espinal, e incluyendo hematoma subdural debido al trauma de la cabeza.

10 Los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, composiciones y terapias de combinación son además utilizados para tratar las condiciones del hígado tal como hepatitis, incluyendo hepatitis alcohólica aguda, hepatitis aguda viral o fármaco-inducida, hepatitis A, B y C, colangitis esclerosantes e inflamación del hígado debido a causas desconocidas.

15 Un número de desórdenes pulmonares también se pueden tratar con los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas, composiciones y terapias de combinación. Tal condición es Síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), que se puede provocar por una variedad de causas, incluyendo la exposición a químicos tóxicos, pancreatitis, trauma u otras causas. Los revelados compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención también son útiles para el tratamiento de displasia broncopulmonar (BPD); linfangioleiomiomatosis; y enfermedad de pulmón fibrótica crónica de bebés prematuros. Además, los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar enfermedades de pulmón ocupacional, incluyendo asbestosis, neumoconiosis del trabajador del carbón, silicosis o condiciones asociadas similares con exposición a largo plazo a partículas finas. En otros aspectos de la invención, los revelados compuestos, las composiciones y terapias de combinación se utilizan para tratar desórdenes pulmonares, incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) asociadas con bronquitis crónica o enfisema; enfermedades de pulmón fibrótico, tal como fibrosis cística, fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis pulmonar inducida por radiación; sarcoidosis pulmonar; y alergias, incluyendo rinitis alérgica, dermatitis por contacto, dermatitis atópica y asma.

20 Los polipéptidos de Claudina de la invención o los antagonistas de la invención, opcionalmente combinados con la citoquina IFN γ -1b (tal como ACTIMMUNE[®]; InterMune Pharmaceuticals) se pueden usar para el tratamiento de fibrosis cística o enfermedades de pulmón fibrótico, tal como fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por radiación y fibrosis pulmonar bleomicina-inducida. Además, esta combinación es útil para el tratamiento de otras enfermedades caracterizadas por la fibrosis de órganos, incluyendo esclerosis sistémica (también llamada "escleroderma"), la cual con frecuencia involucra la fibrosis del hígado. Para el tratamiento de fibrosis cística, polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas y IFN γ -1b pueden ser combinadas con PULMOZYME[®] o TOBI[®] u otros tratamientos para la fibrosis cística.

30 Los polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas de la invención solos o en combinación con IFN γ -1b pueden ser administrados junto con otros tratamientos actualmente utilizados para el tratamiento de enfermedad pulmonar fibrótica. Tales tratamientos adicionales incluyen glucocorticoides, azatioprina, ciclofosfamida, penicillamina, colchisicina, oxígeno adicional y así en adelante. Los pacientes con enfermedad pulmonar fibrótica, tal como IPF, con frecuencia presente con tos no-productiva, disnea progresiva, y muestra un patrón restrictivo ventilatorio en pruebas de función pulmonar. Las radiografías de pecho revelan acumulaciones fibróticas en los pulmones del paciente. Cuando se trata una enfermedad pulmonar fibrótica de acuerdo con los métodos revelados, la suficiencia del tratamiento se puede detectar observando una disminución en el ataque de tos del paciente (cuando la tos se presenta), o utilizando pruebas estándar de la función pulmonar para detectar mejoras en la capacidad pulmonar total, capacidad vital, volumen pulmonar residual o por la administración de una desaturación que mide la determinación del gas de la sangre arterial bajo las condiciones de ensayo, y mostrando que la función pulmonar del paciente ha mejorado de acuerdo con una o más de estas medidas. Además, la mejora del paciente se puede determinar con los resultados de una radiografía de pecho que muestra que la progresión de la fibrosis en los pulmones del paciente se ha suspendido o reducido.

45 Además, los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas (incluyendo polipéptidos solubles de Claudina de la invención o anticuerpos contra los polipéptidos de Claudina de la invención) son útiles para el tratamiento de fibrosis de órganos cuando se administran en combinación con relaxina, una hormona que inhibe la expresión de la producción del colágeno de tal manera que, inhibe la fibrosis, o cuando da en combinación con agentes que bloquean la actividad fibrogénica del TGF- β . Las terapias de combinación utilizando polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas y el recombinante humano relaxin son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de esclerosis sistémica o enfermedades de pulmón fibrótico, incluyendo fibrosis cística, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por radiación y fibrosis pulmonar bleomicina-inducida.

50 Otras modalidades proporcionan los métodos para utilizar los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones o terapias de combinación para tratar una variedad de desórdenes reumáticos. Estos incluyen: artritis reumatoide juvenil y adulto; lupus eritematoso sistémico; gota; osteoartritis; polimialgia reumática; espondiloartropatía seronegativa, incluyendo espondilitis anquilosante; y enfermedad de Reiter. Los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones y terapias de combinación propuestos, se utilizan también para tratar artritis sorriática y artritis Lyme crónica. También son tratables con estos compuestos, composiciones y terapias de combinación, la enfermedad de Still y la uveítis asociada con artritis reumatoide. Además, los compuestos, las composiciones y terapias de combinación de la invención se utilizan en el tratamiento de desórdenes resultando en la inflamación del músculo voluntario, incluyendo la dermatomiositis y polimiositis. Además, los compuestos, las composiciones y combinaciones revelados aquí se utilizan para tratar reticulohistiocitosis multicéntrica,

una enfermedad en la cual la destrucción de la coyuntura y de los nódulos populeares de la cara y las manos se asocia con el exceso de producción de citoquinas proinflamatorias cerca de las células gigantes multinucleadas.

5 Los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones y terapias de combinación de la invención son útiles para el tratamiento primario de amiloidosis. Además, la amiloidosis secundaria que es característica de varias condiciones también es medicable con polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas tal como polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, y las composiciones y terapias de combinación descritas aquí. Tales condiciones incluyen: enfermedad de Alzheimer, amiloidosis reactiva secundaria; síndrome de Down; y amiloidosis asociadas a la diálisis. También son tratables, con los compuestos, las composiciones y terapias de combinación de la invención, los síndromes de fiebre periódica hereditaria, incluyendo fiebre Mediterránea familiar, hiperinmunoglobulina D y síndrome de fiebre periódica y TNF síndromes periódicos asociados con el receptor (TRAPS).

15 Los desórdenes asociados con el trasplante también son medicables con los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones o terapias de combinación, tal como enfermedad huésped-versus-injerto, y complicaciones que resultan del trasplante de órgano sólido, incluyendo el trasplante del corazón, hígado, pulmón, piel, riñón u otros órganos. Los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas se pueden administrar, por ejemplo, para prevenir o inhibir el desarrollo de bronquiolitis obliterante después del trasplante del pulmón.

20 Desórdenes oculares también son medicables con los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones o terapias de combinación, incluyendo el desprendimiento retinal rregmatogeno, y la enfermedad inflamatoria del ojo, y enfermedad inflamatoria del ojo asociada con fumar y degeneración macular.

25 Los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas de la invención y las reveladas composiciones y terapias de combinación también son útiles para el tratamiento de desórdenes que afectan el sistema reproductivo femenino. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la falla de implante múltiple/infertilidad; el síndrome de pérdida fetal o pérdida de embrión IV (aborto espontáneo); los embarazos pre-eclámticos o eclampsia; y la endometriosis.

30 Los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, las composiciones y terapias de combinación adicionalmente son útiles para el tratamiento polineuropatía aguda; nerviosa anorexia; parálisis de Bell; síndrome de fatiga crónica; demencia transmisible, incluyendo la enfermedad Creutzfeld-Jacob; neuropatía desmielinizante; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad del disco vertebral; síndrome de la guerra Gulf; miastenia grave; isquemia cerebral silenciosa; desórdenes del sueño, incluyendo narcolepsia y apnea del sueño; degeneración neuronal crónica; y accidente cerebrovascular, incluyendo enfermedades isquémica cerebral.

35 Los desórdenes que involucran la piel o membranas mucosas también son medicables utilizando los revelados polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas, composiciones o terapias de combinación. Tales desórdenes incluyen enfermedades acantolítico, incluyendo la enfermedad de Darier, queratosis folicular y pemphigus vulgaris. También son tratables, con los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas, composiciones y terapias de combinación propuestos, el acné; acné rosacea; alopecia areata; estomatitis aftosa; bulo penfigoide; hinchazones; eczema; eritema, incluyendo eritema multiforme y eritema multiforme buloso (síndrome de Stevens-Johnson); enfermedad inflamatoria de la piel; liquen plano; enfermedad bullous IgA lineal (dermatosis bullous crónica de la infancia); pérdida de elasticidad de la piel; úlceras superficiales de la mucosa; dermatitis neutrofílica (síndrome de Sweet); pitiriasis rubra pilaris; psoriasis; pioderma gangrenoso; y necrólisis epidérmica tóxica.

Administración de Polipéptidos de Claudina de la Invención y sus Antagonistas

50 Esta invención proporciona los compuestos, composiciones, y métodos para el tratamiento de un paciente, preferiblemente un paciente mamífero, y muy preferiblemente un paciente humano, quien está sufriendo de un desorden médico, y en particular un desorden mediado por Claudin-21 humano. Tales desórdenes mediados por Claudin-21 humano incluyen condiciones causadas (directa o indirectamente) o exacerbadas por el enlace entre Claudin-21 humano y un enlace asociado. Para propósitos de este descubrimiento, los términos “dolencia,” “enfermedad,” “condición médica,” “condición anormal” y similares se utilizan de forma intercambiable con el término “desorden médico”. Los términos “tratar”, “que trata”, y “tratamiento” utilizados aquí incluyen tratamiento curativo, preventivo (por ejemplo, profiláctico) y paliativo o de mejora. Para tales usos terapéuticos, los polipéptidos de Claudina de la invención y fragmentos, ácidos nucleicos de Claudin-21 humano que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención, y/o agonistas o antagonistas del polipéptido Claudin-21 humano tal como anticuerpos se pueden administrar al paciente con necesidad a través de medios bien conocidos. Las composiciones de la presente invención pueden contener 60 un polipéptido en cualquier forma descrita aquí, tal como polipéptidos nativos, variantes, derivados, oligómeros, y fragmentos biológicamente activos. En modalidades particulares, la composición comprende un polipéptido soluble o un oligómero que comprende los polipéptidos solubles de Claudina de la invención.

65 *Cantidad Efectiva Terapéuticamente.* En la práctica el método del tratamiento o uso de la presente invención, una cantidad efectiva terapéuticamente de un agente terapéutico de la presente invención se administra a un paciente que tiene una condición a ser tratada, preferiblemente para tratar o mejorar las enfermedades asociadas con la actividad de un polipéptido Claudin-21 humano. “Agente terapéutico” incluye sin limitación cualquiera de los polipéptidos de Claudina de la invención, fragmentos, y variantes; ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la

invención, fragmentos, y variantes; agonistas o antagonistas de los polipéptidos de Claudina de la invención tal como anticuerpos; enlaces asociados del polipéptido Claudin-21 humano; los complejos formados a partir de los polipéptidos de Claudina de la invención, fragmentos, variantes, y enlaces asociados, etc. Como se utiliza aquí, el término “cantidad efectiva terapéuticamente” significa que la cantidad total de cada agente terapéutico u otro componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar un beneficio del paciente significativo, i.e., tratamiento, cicatrización, prevención o mejora de la condición médica relevante, o un incremento en la velocidad del tratamiento, cicatrización, prevención o mejora de tales condiciones. Cuando se aplica un agente terapéutico individual o un ingrediente activo, se administra solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes que resultan en el efecto terapéutico, si se administra en combinación, en serie o simultáneamente. Como se utiliza aquí, la frase “administración de una cantidad efectiva terapéuticamente” de un agente terapéutico significa que el paciente se trata con el dicho agente terapéutico en una cantidad y por un tiempo suficiente para inducir una mejora, y preferiblemente una mejora sostenida, en al menos un indicador que refleja la severidad del desorden. Una mejora se considera “sostenida” si el paciente exhibe la mejora en al menos dos ocasiones separadas por una o más semanas. El grado de mejora se determina basándose en los signos o síntomas, y las determinaciones también pueden emplear cuestionarios que se administran al paciente, tal como cuestionarios de calidad de vida. Varios indicadores que reflejan el grado de la dolencia del paciente se pueden evaluar para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. El valor de base para la selección del indicador o indicadores se establecen examinando el paciente antes de la administración de la primera dosis del agente terapéutico. Preferiblemente, el examen de la base se hace dentro de aproximadamente 60 días de la administración de la primera dosis. Si el agente terapéutico que se administra para tratar los síntomas agudos, la primera dosis se administra tan pronto como sea posible prácticamente después de que la lesión ha ocurrido. La mejora se induce por la administración de los agentes terapéuticos tal como polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas hasta que el paciente manifiesta una mejora sobre la base para la selección del indicador o los indicadores. En tratar las condiciones crónicas, este grado de mejora se obtiene por la administración con regularidad de este medicamento durante un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo, por uno, dos, o tres meses o más largo, o indefinidamente. Un periodo de una a seis semanas, o aún una sola dosis, con frecuencia es suficiente para tratar las condiciones agudas. Para las lesiones o condiciones agudas, una sola dosis puede ser suficiente. Aunque el grado de la dolencia del paciente después del tratamiento puede aparecer mejorada de acuerdo con uno o más indicadores, el tratamiento se puede continuar por tiempo indefinido al mismo nivel o a una dosis o frecuencia reducidas. Una vez el tratamiento ha sido reducido o suspendido, se puede reiniciar más adelante en el nivel original si reaparecen los síntomas.

Dosificación. Alguien de habilidad en el pertinente arte reconocerá que las dosificaciones apropiadas variarán, dependiendo de tales factores como la naturaleza y severidad del desorden a ser tratado, el peso corporal del paciente, la edad, la condición general, y lesiones y/o tratamientos anteriores, y la ruta de administración. Las dosis preliminares se pueden determinar de acuerdo con pruebas en animales, y el ascenso de las dosificaciones para la administración en humanos se realiza de acuerdo con prácticas aceptadas en el arte, tal como pruebas de dosificación estándar. Por ejemplo, la dosis efectiva terapéuticamente se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. La dosificación dependerá de la actividad específica del compuesto y se puede determinar fácilmente por experimentación rutinaria. Una dosis se puede formular en modelos de animales para lograr un rango de concentración del plasma circulante que incluye la IC50 (i.e., la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición máxima-media de los síntomas) como se determina en el cultivo celular, mientras minimiza la toxicidad. Tal información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos. Finalmente, el médico que atiende decidirá la cantidad del polipéptido de la presente invención con la cual tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico que atiende administrará las dosis bajas del polipéptido de la presente invención y observará la respuesta del paciente. Dosis más grandes del polipéptido de la presente invención se pueden administrar hasta que el efecto terapéutico óptimo se obtiene para el paciente, y en ese punto la dosificación no se incrementó más allá. Se contempla que las varias composiciones farmacéuticas utilizadas para practicar el método de la presente invención contendría aproximadamente 0.01 ng a aproximadamente 100 mg (preferiblemente aproximadamente 0.1 ng a aproximadamente 10 mg, más preferiblemente aproximadamente 0.1 microgramo a aproximadamente 1 mg) del polipéptido de la presente invención por kg de peso corporal. En una modalidad de la invención, los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas se administran un tiempo por semana para tratar los varios desórdenes médicos revelados aquí, en otra modalidad se administra al menos dos tiempos por semana, y en otra modalidad se administra al menos tres veces por semana. Si se inyecta, la cantidad efectiva de los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas por dosis del adulto oscila de 1-20 mg/m², y preferiblemente es aproximadamente 5-12 mg/m². Como alternativa, una dosis plana se pueden administrar, cuya cantidad puede oscilar de 5-100 mg/dosis. La dosis ejemplar oscila para una dosis plana a ser administrada por inyección subcutánea son 5-25 mg/dosis, 25-50 mg/dosis y 50-100 mg/dosis. En una modalidad de la invención, las varias indicaciones descritas abajo se tratan por la administración de una preparación aceptable por inyección que contienen los polipéptidos de Claudina de la invención o antagonistas a 25 mg/dosis, o alternativamente, que contiene 50 mg por dosis. Las dosis de 25 mg o 50 mg se pueden administrar con regularidad, particularmente para condiciones crónicas. Si una ruta de administración con excepción de la inyección se utiliza, la dosis se ajusta apropiadamente de acuerdo con prácticas médicas estándar. En muchos casos, una mejora en la condición de un paciente será obtenida por inyección de una dosis de aproximadamente 25 mg de los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas una a tres veces por semana durante un periodo de al menos tres semanas, o una dosis de 50 mg de los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas una o dos veces por semana por al menos tres semanas, aunque el tratamiento por largos periodos puede ser necesario para inducir el grado deseado de mejora. Para condiciones crónicas incurables, el régimen se puede continuar por tiempo indefinido, con los ajustes que se hace para las dosis y frecuencia si tales se estiman necesarias por el médico del paciente. Las dosis anteriores son ejemplos para un paciente adulto quien es una persona que tiene 18 años de edad o más. Para pacientes pediátricas (edad 4-

17), un régimen apropiado involucra la inyección subcutánea de 0.4 mg/kg, hasta una dosis máxima de 25 mg de los polipéptidos de Claudina de la invención o los antagonistas, administrados por inyección subcutánea una o más veces por semana. Si un anticuerpo contra un polipéptido Claudin-21 humano se utiliza como el polipéptido Claudin-21 humano antagonista, un rango preferido de dosis es 0.1 a 20 mg/kg, y más preferiblemente es 1-10 mg/kg. Otro rango preferido de dosis para un anti-polipéptido Claudin-21 anticuerpo humano es 0.75 a 7.5 mg/kg de peso corporal. Se prefieren los anticuerpos humanizados, es decir, los anticuerpos en los cuales solamente la porción del enlace-antígeno de la molécula del anticuerpo se deriva de una fuente no-humana. Tales anticuerpos se pueden inyectar o administrar vía intravenosa.

10 *Formulaciones.* Las composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un polipéptido Claudin-21 humano de la presente invención (a partir de cualquier fuente derivada, incluyendo sin limitación de las fuentes recombinante y no-recombinante), en combinación con otros componentes tal como un diluyente, portador, o excipiente fisiológicamente aceptable, se proporcionan aquí. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no-tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del o los ingredientes activos. Las formulaciones apropiadas para la administración incluyen soluciones de inyección estériles no acuosas y acuosas que pueden contener anti-oxidantes, soluciones reguladoras, bacteriostáticos y solutos que suministran la formulación isotónica con la sangre del recipiente; y suspensiones estériles acuosas y no-acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes de engrosamiento. Los polipéptidos se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos utilizados para preparar las composiciones útiles farmacéuticamente. Se pueden combinar en mezclas, ya sea como el material activo solo o con otros materiales activos conocidos apropiados para una indicación dada, con diluentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, soluciones salinas, Tris-HCl, acetato, y reguladora de fosfato), preservativos (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), emulsionantes, solubilizantes, adyuvantes y/o excipientes. Las formulaciones apropiadas para las composiciones farmacéuticas incluyen aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA. Además, tales composiciones se pueden acomplejar con polietilenglicol (PEG), iones metálicos, o incorporados en los compuestos poliméricos tal como ácido poliácético, ácido poliglicólico, hidrogeles, dextran, etc., o incorporados en los liposomas, microemulsiones, micelos, vesículas unilamelar o multilamelar, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Los lípidos apropiados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos de la bilis, y similares. La preparación de tales formulaciones liposomales esta en el nivel de habilidad en el arte, según se revela, por ejemplo, en la Pat. U.S. No. 4,235,871; U.S. Pat. No. 4,501,728; U.S. Pat. No. 4,837,028; y Pat. U.S. No. 4,737,323. Tales composiciones influenciarán el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de eliminación *in vivo*, y se seleccionan de esta manera de acuerdo con la intención de la aplicación, así que las características del portador dependerán de la ruta de administración seleccionada. En una modalidad preferida de la invención, las formas de liberación sostenida de los polipéptidos de Claudina de la invención se utilizan. Las formas de liberación sostenida apropiadas para el uso en los métodos revelados incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de Claudina de la invención que se encapsulan en un polímero biocompatible que se disuelve lentamente (tal como las micropartículas de alginato descritas en U.S. No. 6,036,978), mezcladas con tal polímero (incluyendo hidrogeles aplicados vía tópica), y o encajonadas en un implante semi-permeable biocompatible.

40 *Combinaciones de los Compuestos Terapéuticos.* Un polipéptido Claudin-21 humano de la presente invención puede ser activo en multímeros (por ejemplo, heterodímeros o homodímeros) o complejos con si mismo u otros polipéptidos. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un polipéptido de la invención en dicha forma multimérica o compleja. La composición farmacéutica de la invención puede estar en la forma de un complejo del o los polipéptidos de la presente invención junto con los polipéptidos o péptidos antígenos. La invención además incluye la administración de los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas al mismo tiempo con uno u otros fármacos que se administran al mismo paciente en combinación con los polipéptidos de Claudina de la invención o los antagonistas, cada fármaco que se administra de acuerdo con un régimen apropiado para ese medicamento. La "Administración concurrente" abarca un tratamiento simultáneo o secuencial con los componentes de la combinación, así como los regímenes en los cuales los fármacos se alteran, o en donde un componente se administra a largo plazo y el o los otros se administran intermitentemente. Los componentes se pueden administrar en la misma o en composiciones separadas, y por la misma o diferentes rutas de administración. Ejemplos de componentes que se pueden incluir en la composición farmacéutica de la invención son: citoquinas, linfoquinas, u otros factores hematopoyéticos tal como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, trombopoyetina, factor de la célula madre, y eritropoyetina. La composición farmacéutica puede además contener otros agentes que mejoren la actividad del polipéptido o complementan su actividad o uso en el tratamiento. Tales factores adicionales y/o agentes se pueden incluir en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con el polipéptido de la invención, o para minimizar los efectos secundarios. Inversamente, un polipéptido Claudin-21 humano o su antagonista de la presente invención se puede incluir en las formulaciones de la citoquina particular, linfoquina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o anti-trombótico, o agente anti-inflamatorio para minimizar los efectos secundarios de la citoquina, linfoquina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o anti-trombótico, o agente anti-inflamatorio. Ejemplos adicionales de los fármacos para ser administrados al mismo tiempo incluyen pero no se limitan a antivirales, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, antagonistas de citoquinas inflamatorias, anti-inflamatorios no-esteroidales, pentoxifilina, talidomida, y fármacos antireumáticos que modifican la enfermedad (DMARDs) tal como azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, hidroxicloquina sulfato, leflunomide, minociclina, penicilamina, sulfasalazina y compuestos de oro tal como oro oral, tiomalato de sodio y oro, y aurotioglucosa. Adicionalmente, los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas se pueden combinar con un segundo

polipéptido Claudin-19, -21, y -22 humano/antagonista, incluyendo un anticuerpo contra un polipéptido Claudin-19, -21, y -22 humano, o un péptido derivado del polipéptido Claudin-19, -21, y -22 humano que actúa como un inhibidor competitivo de un polipéptido Claudin-19, -21, y -22 humano nativo.

5 *Rutas de Administración.* Cualquier ruta de administración eficaz se puede utilizar para administrar terapéu-
 10 camente los polipéptidos de Claudina de la invención o los antagonistas de estos, incluyendo aquellas composiciones
 que comprenden ácidos nucleicos. La administración parenteral incluye inyección, por ejemplo, vía intra-articular,
 intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, rutas por inyección en bolo o por infusión con-
 15 tinua, y también incluye administración localizada, por ejemplo, en un sitio de enfermedad o lesión. Otros medios
 de administración apropiados incluyen liberación controlada a partir de implantes; inhalación con aerosol y/o insufla-
 ción.; gotas de ojos; supositorios vaginal o rectal; preparaciones bucales; preparaciones orales, incluyendo píldoras,
 jarabes, grageas o goma de mascar; y, preparaciones tópicas tal como lociones, geles, aerosoles, ungüento u otras
 20 técnicas apropiadas. Como alternativa, polipéptidos polipeptídicos de Claudina de la invención o sus antagonistas
 se pueden administrar implantando las células cultivadas que expresan el polipéptido, por ejemplo, implantando las
 células que expresan los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas. Las células también se pueden
 cultivar *ex vivo* en la presencia de los polipéptidos de la presente invención con el fin de proliferar o producir un efecto
 deseado sobre o actividad en tales células. Las células tratadas luego pueden ser introducidas *in vivo* para propósitos
 25 terapéuticos. En otra modalidad, las células propias del paciente se inducen para producir los polipéptidos de Clau-
 dina de la invención o los antagonistas por transfección *in vivo* o *ex vivo* con un ADN que codifica los polipéptidos de
 Claudina de la invención o los antagonistas. Este ADN se puede introducir en las células del paciente, por ejemplo,
 inyectando ADN desnudo o ADN liposoma-encapsulado que codifica los polipéptidos de Claudina de la invención o
 sus antagonistas, o por medio de la transfección. Los ácidos nucleicos de la invención también se pueden administrar
 a los pacientes por otros métodos conocidos para la introducción del ácido nucleico en una célula u organismo (in-
 30 cluyendo, sin limitación, en la forma de vectores virales o ADN desnudo). Cuando los polipéptidos de Claudina de
 la invención o sus antagonistas se administran en combinación con uno u otros compuestos activos biológicamente,
 estos se pueden administrar por la misma o por diferentes rutas, y se pueden administrar simultáneamente, individual
 o secuencialmente.

30 *Administración Oral.* Cuando una cantidad efectiva terapéuticamente del polipéptido de la presente invención se
 administra vía oral, el polipéptido de la presente invención estará en la forma de una tableta, cápsula, polvo, solución
 o elixir. Cuando se administra en forma de tableta, la composición farmacéutica de la invención puede adicionalmente
 35 contener un portador sólido tal como una gelatina o un adyuvante. La tableta, cápsula, y polvo contienen cerca del
 5 al 95% del polipéptido de la presente invención, y preferiblemente cerca del 25 a 90% polipéptido de la presente
 invención. Cuando se administra en forma líquida, se puede adicionar, un portador líquido tal como agua, petróleo,
 aceites de origen animal o plantas tal como aceite de maní, aceite mineral, aceite de soja, o aceite de ajonjolí, o aceites
 40 sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica además puede contener una solución salina fisiológica,
 dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se
 administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene cerca de 0.5 a 90% en peso del polipéptido de la
 presente invención, y preferiblemente cerca de 1 a 50% polipéptido de la presente invención.

40 *Administración Intravenosa.* Cuando una cantidad efectiva terapéuticamente del polipéptido de la presente inven-
 ción se administra por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el polipéptido de la presente invención estará en la
 forma de un pirógeno-libre, solución acuosa aceptable vía parenteral. La preparación de tales soluciones del polipép-
 45 tido aceptables vía parenteral, teniendo una justa estimación del pH, isotonicidad, estabilidad, y similares, esta dentro
 de la habilidad en el arte. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea, o subcutánea
 contendría, además del polipéptido de la presente invención, un vehículo isotónico tal como Inyección de Cloruro
 de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y de Cloruro de Sodio, Inyección de
 50 Ringer Lactato, u otro vehículo según se conoce en el arte. La composición farmacéutica de la presente invención
 también puede contener estabilizantes, preservativos, soluciones reguladoras, antioxidantes, u otros aditivos conoci-
 dos por aquellos de habilidad en el arte. La duración de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica
 de la presente invención variará, dependiendo de la severidad de la enfermedad que se trata y la condición y respuesta
 idiosincrásica potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación del polipéptido
 55 de la presente invención estará en el rango de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. Finalmente el mé-
 dico que atiende decidirá sobre la apropiada duración de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica
 de la presente invención.

60 *Administración de Tejido y Hueso.* Para las composiciones de la presente invención que son útiles para regenera-
 ción de hueso, cartílago, tendón o ligamento, el método terapéutico incluye la administración de la composición vía
 tópica, sistemática, o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica
 para el uso en esta invención es, por su puesto, en una forma fisiológicamente aceptable, pirógeno-libre. Adicional-
 65 mente, la composición puede ser deseablemente encapsulada o inyectada en una forma viscosa para la entrega al sitio
 dañado del hueso, cartílago o tejido. La administración tópica puede ser apropiada para la cicatrización de una herida
 y la reparación del tejido. Los agentes terapéuticamente útiles diferentes de un polipéptido de la invención que tam-
 bién se puede incluir opcionalmente en la composición según lo descrito arriba, puede alternativa o adicionalmente,
 ser administrados simultánea o secuencialmente con la composición en los métodos de la invención. Preferiblemente
 para la formación del hueso y/o cartílago, la composición incluiría una matriz capaz de liberar la composición que
 contiene el polipéptido al sitio de hueso y/o cartílago dañado, proporcionando una estructura para el desarrollo del
 hueso y cartílago y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el cuerpo. Tales matrices se pueden formar de materiales

actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas. La opción de material matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades interfase. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y definidas químicamente, sulfato de calcio, tricalciofosfato, hidroxiapatita, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y polianhidridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tal como hueso o colágeno dérmico. Matrices adicionales se comprenden de polipéptidos puros o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no-biodegradables y químicamente definidas, tal como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos, u otras Matrices de cerámicas se puede comprender de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados arriba, tal como ácido poliláctico y hidroxiapatita o colágeno y tricalciofosfato. Las biocerámicas se pueden alterar en la composición, tal como en fosfato aluminato de calcio y el proceso para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula, y biodegradabilidad. Actualmente se prefiere un copolímero 50:50 (peso molar) de ácido láctico y ácido glicólico en la forma de partículas de poros que tienen diámetros fluctuando de 150 a 800 micrones. En algunas aplicaciones, será útil utilizar un agente secuestrante, tal como carboximetil celulosa o coágulos de sangre autólogos, para prevenir las composiciones del polipéptido a partir de la desasociación de la matriz. Una familia preferida de agentes secuestrantes es la de materiales celulósicos tales como alquilcelulosas (incluyendo hidroxialquilcelulosas), incluyendo metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y carboximetilcelulosa, la mayoría preferida son las sales catiónicas de carboximetilcelulosa (CMC). Otros agentes secuestrantes preferidos incluyen ácido hialurónico, alginato de sodio, poli (etilenglicol), óxido polioxietileno, polímero carboxivinilo y poli (vinil alcohol). La cantidad del agente secuestrante útil aquí es 0.5-20 % en peso, preferiblemente 1-10 % en peso basado en el peso total de la formulación, que representa la cantidad necesaria para prevenir la desorción del polipéptido de la matriz del polímero y para suministrar la manipulación apropiada de la composición, con todo no es así más que para prevenir que las células progenitor infiltran la matriz, de tal modo proporcionando al polipéptido la oportunidad de asistir la actividad osteogénica de las células progenitor. En otras composiciones, los polipéptidos de la invención se pueden combinar con otros agentes benéficos para el tratamiento del defecto del hueso y/o cartilago, herida, o tejido en cuestión. Estos agentes incluyen varios factores de crecimiento tal como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF-.alfa. y TGF-.beta.), y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Las composiciones terapéuticas actualmente también son valiosas para las aplicaciones veterinarias. Particularmente los animales domésticos y los caballos de pura sangre, además de los humanos, son pacientes deseados para tal tratamiento con los polipéptidos de la presente invención. El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene el polipéptido para ser utilizado en la regeneración del tejido será determinada por el médico que atiende la consideración de varios factores que modifican la acción de los polipéptidos, por ejemplo, la cantidad de peso del tejido deseado para ser formado, el sitio del daño, la condición del tejido dañado, el tamaño de una herida, tipo de tejido dañado (por ejemplo, hueso), la edad del paciente, sexo, y dieta, la severidad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. La dosificación puede variar con el tipo de matriz utilizado en la reconstitución y con inclusión de otros polipéptidos en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tal como IGF I (factor de crecimiento similar a la insulina I), a la composición final, también puede efectuar la dosificación. El progreso se puede monitorear por valoración periódica del crecimiento y/o reparación del tejido/hueso, por ejemplo, rayos-X, determinaciones histomorfométricas y etiquetado de tetraciclina.

Usos Veterinarios. Además de pacientes humanos, los polipéptidos de Claudina de la invención y sus antagonistas son útiles en el tratamiento de las condiciones de la enfermedad en animales pacientes no-humanos, tal como mascotas (perros, gatos, pájaros, primates, etc.), animales domésticos de granjas (ganado equino, ovejas, cerdos, pájaros, etc.), o cualquier animal que sufre de una condición inflamatoria $TNF\alpha$ -mediada o artrítica. En tales casos, una dosis apropiada se puede determinar de acuerdo con el peso corporal del animal. Por ejemplo, se puede usar una dosis de 0.2-1 mg/kg. Como alternativa, la dosis se determina de acuerdo con el área superficial del animal, una dosis ejemplar fluctuando de 0.1-20 mg/m², o más preferiblemente, de 5-12 mg/m². Para los animales pequeños, tal como perros o gatos, una dosis apropiada es 0.4 mg/kg. En una modalidad preferida, los polipéptidos de Claudina de la invención o sus antagonistas (preferiblemente construidos de genes derivados de las mismas especies como el paciente), se administran por inyección u otra ruta apropiada una o más veces por semana hasta que la condición del animal se mejora, o se puede administrar por tiempo indefinido.

Fabricación de los Medicamentos. La presente invención también se relaciona con el uso de polipéptidos de Claudina de la invención, los fragmentos, y las variantes; los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de Claudina de la invención, los fragmentos, y las variantes; los agonistas o antagonistas de los polipéptidos de Claudina de la invención tal como anticuerpos; enlaces asociados del polipéptido Claudin-21 humano; los complejos formados de los polipéptidos de Claudina de la invención, los fragmentos, variantes, y enlaces asociados, etc, en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento terapéutico de cada desorden médico revelado aquí.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos tienen la intención de ilustrar las modalidades particulares y no limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Identificación de los Polipéptidos de Claudina Humanos

5 Un conjunto de datos se recibió de Celera Genomics (Rockville, Maryland) conteniendo una lista de secuencias de aminoácidos predichos para ser codificados por el genoma humano. Este conjunto de datos se investigó con un algoritmo BLAST para identificar Los polipéptidos de la familia Claudina. Dos secuencias de aminoácido solapantes (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2) se identificaron como secuencias de aminoácido parciales de un polipéptido de Claudina humano nuevo, Claudin-21. SEQ ID NO:1 se utilizó en una investigación TBLASTN de secuencias de ADN genómicas humanas para identificar dos fragmentos de ADN genómicos solapantes; una secuencia contigua formada de estos dos fragmentos se muestra como la SEQ ID NO:3. Los nucleótidos 2 a 592 de la SEQ ID NO:3 codifican una secuencia de aminoácido, SEQ ID NO:4, que traslapa con la SEQ ID NO:1 y se extiende en ambos extremos. Sin embargo, la comparación de la secuencia de aminoácido N-terminal de la SEQ ID NO:4 con aquella de la SEQ ID NO:2 y otros polipéptidos de la familia Claudina sugirieron que hubo un marco de lectura en las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO:3. Cuando una de los residuos “a” en los nucleótidos 40-42 de la SEQ ID NO:3 se suprime, el resultado es la SEQ ID NO:5; los nucleótidos 1 a 405 de la SEQ ID NO:5 codifican a los aminoácidos 24 a 158 de la SEQ ID NO:2. Extendiendo la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2 utilizando los aminoácidos codificados por nucleótidos 406 a 591 de la SEQ ID NO:5 produce la SEQ ID NO:6, la cual es la secuencia de aminoácido predicha del polipéptido Claudin-21 de longitud total. (Nucleótidos 1 a 591 de la SEQ m NO:5 codifican los aminoácidos 24 a 220 de la SEQ ID NO:6). La diferencia entre las regiones N-terminal de la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:6 puede representar una variación alélica entre los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias de aminoácido. Una secuencia de aminoácido de ratón (SEQ ID NO:7) ha sido identificada mostrando un alto grado de afinidad de la secuencia a los polipéptidos Claudin-21 humano (SEQ ID NO:6) y Claudin-22 (SEQ ID NO:11) humano; este polipéptido de ratón se refiere aquí como “Claudin-21 murina” porque es un tanto más similar al Claudin-21 humano que al humano Claudin-22.

Se identifica el Claudin-19 humano (SEQ ID NO:8) dentro de los datos generados automáticamente por the Sanger Centre's Ensembl Project (ensembl.org) como el gen ENSG00000066018, y parece que es el primero en identificar este polipéptido como un polipéptido de Claudina humano, que tiene la actividad del polipéptido de Claudina, y que es el homólogo humano de la secuencia Claudin-19 murina parcial (SEQ ID NO:9). Además, una variante de la secuencia del polipéptido Claudin-19 humano se identificó (SEQ ID NO: 10); esta variante tiene una secuencia de los aminoácidos 19 a 33 de la SEQ ID NO: 10 en lugar de los aminoácidos 19 a 38 de la SEQ ID NO:8, posiblemente como un resultado de la variación alélica o empalme. Se identificaron las secuencias de aminoácido comprendidas por el Claudin-22 humano (SEQ ID NO: 11) entre los datos generados automáticamente por Celera, y Aparecemos por ser los primeros en identificar estas secuencias de polipéptidos como polipéptidos de Claudina humano, que tienen actividad del polipéptido de Claudina.

Las secuencias de aminoácido del Claudin-19 humano (SEQ ID NO:8), Claudin-19 murina (SEQ ID NO:9), la variante del Claudin-19 humano (SEQ ID NO:10), Claudin-21 humano (SEQ ID NO:6), la variante del Claudin-21 humano (SEQ ID NO:4), “Claudin-21” murina (SEQ ID NO:7), y Claudin-22 humano (SEQ ID NO:11) se comparó con las secuencias de aminoácido de otros miembros de la familia Claudina tal como Claudin-1 (SEQ ID NO:12) y Claudin-7 (SEQ ID NO:13), como se muestra en la Tabla 1 abajo. Esta comparación utilizó el programa de alineación de secuencia múltiple GCG “pretty”, con una matriz de puntuación de afinidad del aminoácido = blosum62, penalización de creación de abertura = 8, y penalización extensión de abertura = 2. La alineación de estas secuencias mostradas en la Tabla 1 muestra los residuos de consenso capitalizado que son idénticos entre al menos cinco de las secuencias de aminoácido en la alineación. El Claudin-21 humano muestra aproximadamente 36-40% de identidad del aminoácido con otros miembros de la familia del polipéptido de Claudina, y aproximadamente 54-57% de afinidad del aminoácido (basado en la matriz de comparación blosum62).

Las sustituciones del aminoácido y otras alteraciones (deleciones, inserciones, etc.) para los polipéptidos de Claudina de la invención se predicen por ser más probables para alterar o desestabilizar las actividades del polipéptido de Claudina si resultan en cambios para los residuos puestos en mayúsculas mostrados en la Tabla 1, y particularmente si aquellos cambios no reemplazan un residuo presente en otros polipéptidos de Claudina en esa posición conservada. Inversamente, si un cambio se hace a una secuencia de aminoácido Claudin resultando en la sustitución de uno o más residuos de la secuencia consenso de la Tabla 1 para el residuo polipéptido de Claudina en esa posición conservada, es menos probable que tal alteración afecte la función del polipéptido de Claudina. Por ejemplo, el residuo consenso en la posición 50 en la Tabla 1 es tirosina, y algunos polipéptidos de Claudina tienen una treonina o una isoleucina en esa posición. La sustitución de la treonina o una isoleucina o de los residuos similares químicamente tal como serina o uno de los aminoácidos alifáticos en esa posición se considera menos probable para alterar la función del polipéptido que la sustitución de los residuos cargados tal como lisina o arginina etc.

Las modalidades de la invención incluyen los polipéptidos de Claudina y los fragmentos de los polipéptidos de Claudina que comprenden las secuencias de aminoácido alteradas. La secuencia de polipéptidos Claudin-19, -21, o -22 alteradas comparten al menos 30%, o más preferiblemente al menos 40%, o más preferiblemente al menos 50%, o más preferiblemente al menos 55%, o más preferiblemente al menos 60%, o más preferiblemente al menos 65%, o más preferiblemente al menos 70%, o más preferiblemente al menos 75%, o más preferiblemente al menos 80%, o más preferiblemente al menos 85%, o más preferiblemente al menos 90%, o más preferiblemente al menos 95%, o más preferiblemente al menos 97.5%, o más preferiblemente al menos 99%, o muy preferiblemente al menos 99.5% de identidad del aminoácido con una secuencia de aminoácido Claudin mostrada en la Tabla 1.

ES 2 284 678 T3

	SEQ ID	1	50
	Hs cldn-1	NO:12	~~~managlQ LIGfiLALfLG WigaivsTAL PqWriysyag dnIvTAqamY
	Hs cldn-7	NO:13	~~~mansglQ LIGfsmALLG WVglvacTAi PQWqmssyag dnliTAqamY
5	Hs cldn-19	NO:8	~~~mansglQ LIGyflALgG WVgiiasTAL PQWKqssyag daliTAvgly
	Mm cldn-19	NO:9	~~~~~ yflALgG WVgiiasTAL PQWKqssyag daliTAvgly
	Hs cldn19v	NO:10	~~~mansglQ LIGyflALgG WhspatveAv flrrlt... .aliTAvgly
10	Hs cldn-21	NO:6	malifrtamQ svGllLsflG WilsitTyL PhWKnInldl nem...enwt
	Hs cldn21v	NO:4	~~~~~ plqlie htgrtsnldl nem...enwt
	Mm cldn-21	NO:7	mglvfrtatQ aaallLsLLG WVlscltnyL PhWKnInlel nem...enwt
	Hs cldn-22	NO:11	mawsfrakvQ LgGllLsLLG WVcscvtTiL PQWKtInlel nem...etwi
15	consenso		----Q L-G--LALLG WV----TAL PQWK----- --I-TA---Y
		51	100
20	Hs cldn-1	NO:12	eGLWMSCVsQ STGqiQCKvF DSILnLsstL QatRaLMVvg ilLGviaifv
	Hs cldn-7	NO:13	kGLWMdCVtQ STGmmsCKmy DSvLALsaaL QatRaLMVvs lvLGFAMfv
	Hs cldn-19	NO:8	eGLWMSCasQ STGqvQCKly DSILALdghi QsaRaLMVva vLGFvamvl
25	Mm cldn-19	NO:9	eGLWMSCasQ STGqvQCKly DSILALdghi QsaRaLMVva vLGFvamvl
	Hs cldn19v	NO:10	eGLWMSCasQ STGqvQCKly DSILALd~~~ ~~~~~ ~~~~~
	Hs cldn-21	NO:6	mGLWqtCViQ eevgmQCKdF DSfLALpaeL rvsRiLMfls ngLGFLgllv
	Hs cldn21v	NO:4	mGLWqtCViQ eevgmQCKdF DSfLALpaeL rvsRiLMfls ngLGFLgllv
30	Mm cldn-21	NO:7	mGLWkSCViQ eevgrQCKdF DSfLALpaeL QvsRvLMslc ngLGILglla
	Hs cldn-22	NO:11	mGiWevCVdr eevatvCKaF eSfLsLpqeL QvaRiLMVas hgLGILglll
	consenso		-GLWMSCV-Q STG--QCK-F DS-LAL---L Q--R-LMV-- --LGFL----
35			
		101	150
	Hs cldn-1	NO:12	atvGmkCmke leddevqKmR maviGGaifl IAGlaiLVat aWynriVQE
40	Hs cldn-7	NO:13	atmGmkCtRc GgddkvkKaR iamgGGiifi vAGlaaLVac SWyHqiVtd
	Hs cldn-19	NO:8	SvvGmkCtRv GdsnpiaKgR vaiaGGAIfi IAGlct.taV SWyAtlvrQE
	Mm cldn-19	NO:9	SvvGmkCtRv GdsnptaKsR vaisGGAIfi IAGlctLtaV SWyAtlvrQE
	Hs cldn-21	NO:6	SgfGldCIRi GesqrldIKrR IliGGiLsw asGitaLVpV SWvAHktVQE
45	Hs cldn21v	NO:4	SgfGldCIRi GesqrldIKrR IliGGiLsw asGitaLVpV SWvAHktVQE
	Mm cldn-21	NO:7	SgcGldCIRI GetqeglKkR IliGGtLlw tsGvmvLVpV SWvAHktVrE
	Hs cldn-22	NO:11	esfGseCiqf hrirwvfkRr IglIGrtLea sAsattLlpV SWvAHatiQd
50	consenso		S--G--C'-R- G-----K-R ----GG-I-- -AG---LV-V SW-AH--VQE
		151	200
55	Hs cldn-1	NO:12	FyDpmtP.vn aRyEFGqALF tGWAAaslcl IGGaLLcCsc p..rkttssyp
	Hs cldn-7	NO:13	FynpliP.tn ikyEFGpAiF iGWAgSalvi IGGaLLsCsc pgneskagyr
	Hs cldn-19	NO:8	FfnpstP.vn aRyEFGpALF vGWAsaglav IGGsfl.cCtc peperpns..
	Mm cldn-19	NO:9	FfnpstP.vn aRyEFGpALF vGWAsaglam IGGsfl.cCtc peperans..
60	Hs cldn-21	NO:6	FwDenvPdv prWefFGeALF IGWfAglsll IGGeLLnCaa csshaplalg
	Hs cldn21v	NO:4	FwDenvPdv prWefFGeALF IGWfAglsll IGGeLLnCaa csshaplalg
	Mm cldn-21	NO:7	FwDetmPeiv prWefFGeALF IGWfAgfclv IGGevLhCaa cwspapaass
65	Hs cldn-22	NO:11	FwDdsiPdii prWefFGgALy IGWAAgilla IGGILLifsa clgkedvfpf

ES 2 284 678 T3

Secuencias Presentadas en la Lista de las Secuencias

SEQ ID NO	Tipo de Secuencia	Descripción
5 SEQ ID NO:1	Aminoácido	Fragmento del Claudin-21 Humano
SEQ ID NO:2	Aminoácido	Fragmento del Claudin-21 Humano
SEQ ID NO:3	Nucleótido	ADN genómico humano
10 SEQ ID NO:4	Aminoácido	Variante del Claudin-21 Humano codificado por la SEQ ID NO:3
15 SEQ ID NO:5	Nucleótido	Humano ADN genómico, SEQ ID NO:3 con un residuo suprimido
SEQ ID NO:6	Aminoácido	Claudin-21 Humano
SEQ ID NO:7	Aminoácido	Murina 'Claudin-21' (GenBank AK008821)
20 SEQ ID NO: 8	Aminoácido	Claudin-19 Humano
SEQ ID NO:9	Aminoácido	Claudin-19 Murina (secuencia parcial, GenBank AAF98323)
25 SEQ ID NO: 10	Aminoácido	Variante del Claudin-19 Humano (secuencia parcial)
SEQ ID NO:11	Aminoácido	Claudin-22 Humano
SEQ ID NO: 12	Aminoácido	Claudin-1 Homo sapiens
30 SEQ ID NO: 13	Aminoácido	Claudin-7 Homo sapiens

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo constituido por:

(a) una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO: 4 y los aminoácidos 1 a 13 de la SEQ ID NO: 4;

(b) SEQ ID NO: 6;

(c) una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo constituido por los aminoácidos 1 a 10 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 1 a 33 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 11 a 30 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 12 a 26 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 25 a 220 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 34 a 81 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 82 a 101 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 82 a 102 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 103 a 116 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 117 a 145 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 118 a 137 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 146 a 161 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 162 a 181 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 162 a 191 de la SEQ ID NO:6, y los aminoácidos 192 a 220 de la SEQ ID NO:6;

(d) fragmentos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de (a)-(c) que comprenden al menos 20 aminoácidos contiguos y que tienen la actividad del polipéptido de Claudina seleccionada del grupo constituido por una actividad de la formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, actividad de transporte iónico, enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, enlace de enterotoxinas, y actividad del enlace del dominio PDZ;

(e) fragmentos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de (a)-(c) que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio de bucle extracelular;

(f) fragmentos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de (a)-(c) que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio de la cola citoplasmática;

(g) secuencias de aminoácidos que tienen la actividad del polipéptido de Claudina seleccionado del grupo constituido por la actividad de la formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, actividad de transporte de iones, enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, enlace de enterotoxinas, y actividad del enlace del dominio PDZ, y que comprende al menos 30 aminoácidos y comparte la identidad del aminoácido con la secuencia de los aminoácidos de cualquiera de (a)-(f), en donde el porcentaje de identidad del aminoácido se selecciona del grupo que consiste de: más del 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%; y

(h) una secuencia de aminoácido de (g), en donde un polipéptido que comprende dicha secuencia de aminoácido de (g) unida a un anticuerpo que también se une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido de cualquiera de (a)-(f).

2. Un polipéptido aislado que tiene una actividad de enlace del dominio PDZ y que comprende una secuencia de aminoácido que comparte más del 90% de identidad del aminoácido a lo largo de su longitud con los aminoácidos 192 a 220 de la SEQ ID NO: 6.

3. Un ácido nucleico aislado constituido por una secuencia de nucleótido que codifica (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo constituido por una

(a) SEQ ID NO:4;

(b) SEQ ID NO:6;

(c) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos 25 a 220 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 117 a 145 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 118 a 137 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 146 a 161 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 162 a 181 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 162 a 191 de la SEQ ID NO:6, y los aminoácidos 192 a 220 de la SEQ ID NO:6; y

(d) una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos 1 a 10 de la SEQ ID NO: 6, los aminoácidos 1 a 33 de la SEQ ID NO:6, los aminoácidos 82 a 101 de la SEQ ID NO:6, y los aminoácidos 82 a 102 de la SEQ ID NO:6;

o (ii) un polipéptido de la reivindicación 2;

y 1 a 100,000 nucleótidos adicionales covalentemente unidos al extremo, a cada extremo, o ambos terminales de la molécula del ácido nucleico.

ES 2 284 678 T3

4. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la actividad del polipéptido de Claudina seleccionado del grupo constituido por una actividad de la formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, actividad de transporte de iones, enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, enlace de enterotoxinas, y actividad del enlace del dominio PDZ y comparte la identidad de la secuencia de nucleótidos con las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos de la reivindicación 3(i)(a)-(c) y 3(ii), en donde el porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo constituido por: al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, y al menos 99.5%.
5. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el ácido nucleico consiste de
- (i) SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5; o
 - (ii) SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 y 1 a 100,000 nucleótidos adicionales covalentemente unidos a otro extremo, cada extremo, o ambos extremos de la molécula del ácido nucleico.
6. Un vector de expresión que comprende al menos un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Una célula huésped recombinante aislada que comprende al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 6.
8. La célula huésped recombinante de la reivindicación 7, en donde el ácido nucleico se integra en el genoma de la célula huésped.
9. Un proceso para producir un polipéptido codificado por el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende el cultivo de una célula huésped recombinante bajo condiciones que promueven la expresión de dicho polipéptido, en donde la célula huésped recombinante comprende al menos un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
10. El proceso de la reivindicación 9 que comprende además la purificación de dicho polipéptido.
11. El polipéptido producido por el proceso de la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido es el que se menciona en la reivindicación 3(i) o 3(ii), y dicha célula huésped recombinante es una célula de mamífero.
12. Un anticuerpo aislado que une al polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11.
13. El anticuerpo de la reivindicación 12 en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
14. El anticuerpo de la reivindicación 12 en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
15. El anticuerpo de la reivindicación 12 en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
16. El anticuerpo de la reivindicación 12 en donde el anticuerpo inhibe la actividad del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11.
17. Un método para identificar los compuestos que alteran la actividad del polipéptido de Claudina que comprende
- (a) mezclar un compuesto de prueba con el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11; y
 - (b) determinar si el compuesto de prueba altera la actividad del polipéptido de Claudina de dicho polipéptido, en donde la actividad del polipéptido de Claudina se selecciona del grupo constituido por una actividad de la formación del empalme ajustado, función de la barrera epitelial o endotelial, actividad de transporte de iones, enlace homotípico, enlace heterotípico, enlace de proteínas virales, enlace de enterotoxinas, y la actividad del enlace del dominio PDZ.
18. Un método para identificar los compuestos que inhiben la actividad del enlace del dominio PDZ de los polipéptidos de Claudina que comprende:
- (a) mezclar un compuesto de prueba con el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11 y un enlace asociado de dicho polipéptido; y
 - (b) determinar si el compuesto de prueba inhibe la actividad del enlace de dicho polipéptido.
19. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11, o un antagonista de dicho polipéptido, para utilizar en terapia, en donde el antagonista se selecciona del grupo de ARN antisentido, ADN antisentido, ribozimas, tales como ribozimas cabezas de martillo y ribozimas de endoribonucleasa del ARN, anticuerpos y antagonistas de triple hélice.

ES 2 284 678 T3

20. El polipéptido de la reivindicación 19 para el especificado uso en esta, en donde el uso es para incrementar la actividad de la formación del empalme ajustado o actividad de la función de la barrera epitelial o endotelial en un paciente, o para el tratamiento de una condición de la función de la barrera epitelial o endotelial.
- 5 21. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11, para la preparación de una composición farmacéutica para incrementar la actividad de la formación del empalme ajustado o la actividad de la función de la barrera epitelial o endotelial en un paciente, o para el tratamiento de una condición de la función de la barrera epitelial o endotelial.
- 10 22. El antagonista de la reivindicación 19 para el especificado uso en esta, en donde el uso es para disminuir la actividad de la formación del empalme ajustado o la actividad de la función de la barrera epitelial o endotelial en un paciente, o para el tratamiento de una condición que involucra una exposición a las enterotoxinas.
- 15 23. Uso de un antagonista del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11 para la preparación de una composición farmacéutica para disminuir la actividad de la formación del empalme ajustado o la actividad de la función de la barrera epitelial o endotelial en un paciente, en donde el antagonista se selecciona del grupo del ARN antisentido, ADN antisentido, ribozimas, tal como ribozimas de cabezas de martillo y ribozimas de endoribonucleasa del ARN, anticuerpos y antagonistas de triple hélice.
- 20 24. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición de la función de la barrera epitelial o endotelial.
- 25 25. El polipéptido de la reivindicación 19 para el especificado uso en esta, o el uso de la reivindicación 24 en donde la condición de la función de la barrera epitelial o endotelial se selecciona del grupo constituido por una inflamación, asma, alergia, metástasis de células cancerosas, desórdenes de transportes de iones tales como defectos de transporte de magnesio en el riñón, y enfermedad inflamatoria del intestino.
- 30 26. Uso de un antagonista del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 11 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición que involucra la exposición a las enterotoxinas, en donde el antagonista se selecciona del grupo del ARN antisentido, ADN antisentido, ribozimas, tal como ribozimas de cabezas de martillo y ribozimas de endoribonucleasa del ARN, anticuerpos y antagonistas de triple hélice.
- 35 27. El antagonista de la reivindicación 22 para el especificado uso en esta, o el uso de un antagonista de la reivindicación 26 en donde la condición que involucra la exposición a las enterotoxinas se selecciona del grupo constituido por una: exposición a la enterotoxina del *Clostridium perfringens* (CPE) y el síndrome de muerte infantil súbita (SIDS).

40

45

50

55

60

65

ES 2 284 678 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Immunex Corporation
Youakim, Adel
DuBose, Robert F.
Wiley, Steven R.

<120> POLIPÉPTIDOS DE CLAUDIN

<130> 3142-WO

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Gly Leu Trp Gln Thr Cys Val Ile Gln Glu Glu Val Gly Met Gln
1 5 10 15

Cys Lys Asp Phe Asp Ser Phe Leu Ala Leu Pro Ala Glu Leu Arg Val
20 25 30

Ser Arg Ile Leu Met Phe Leu Ser Asn Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu
35 40 45

Leu Val Ser Gly Phe Gly Leu Asp Cys Leu Arg Ile Gly Glu Ser Gln
50 55 60

Arg Asp Leu Lys Arg Arg Leu Leu Ile Leu Gly Gly Ile Leu Ser Trp
65 70 75 80

Ala Ser Gly Ile Thr Ala Leu Val Pro Val Ser Trp Val Ala His Lys
85 90 95

Thr Val Gln Glu Phe Trp Asp Glu Asn Val Pro Asp Phe Val Pro
100 105 110

<210> 2

<211> 158

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 284 678 T3

<400> 2

Met Ala Leu Ile Phe Arg Thr Ala Met Gln Ser Val Gly Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Gly Trp Ile Leu Ser Ile Ile Thr Thr Tyr Leu Pro His
 20 25 30

Trp Lys Asn Leu Asn Leu Asp Leu Asn Glu Met Glu Asn Trp Thr Met
 35 40 45

Gly Leu Trp Gln Thr Cys Val Ile Gln Glu Glu Val Gly Met Gln Cys
 50 55 60

Lys Asp Phe Asp Ser Phe Leu Ala Leu Pro Ala Glu Leu Arg Val Ser
 65 70 75 80

Arg Ile Leu Met Phe Leu Ser Asn Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu
 85 90 95

Val Ser Gly Phe Gly Leu Asp Cys Leu Arg Ile Gly Glu Ser Gln Arg
 100 105 110

Asp Leu Lys Arg Arg Leu Leu Ile Leu Gly Gly Ile Leu Ser Trp Ala
 115 120 125

Ser Gly Ile Thr Ala Leu Val Pro Val Ser Trp Val Ala His Lys Thr
 130 135 140

Val Gln Glu Phe Trp Asp Glu Asn Val Pro Asp Phe Val Pro
 145 150 155

<210> 3

<211> 896

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

tccattatta caacttattt gccacactgg aagaacctca aacctggact taaatgaaat 60
 ggaaaactgg accatgggac tctggcaaac ctgtgtcatc caagaggaag tggggatgca 120
 atgcaaggac tttgactcct tcttggtttt gcctgctgaa ctcagggctc ccaggatcct 180
 aatgtttctg tcaaatgggc tgggatttct gggcctgctg gtctctgggt ttggcctgga 240
 ctgtttgaga attggagaga gtcagagaga tctcaagagg cgaactgctca ttctgggagg 300
 aattctgtcc tgggcctcgg gaatcacagc cctgggtccc gtctcttggg ttgccacaa 360
 gacggttcag gagttctggg atgagaacgt cccagacttt gtccccaggt gggagtttgg 420
 ggaggccctg tttctgggct ggtttgctgg actttctctt ctgctaggag ggtgtctgct 480
 caactgcgca gcctgctcca gccacgctcc cctagctttg ggccactatg cagtggcgca 540
 aatgcaaact cagtgtcctt acctggaaga tgggacagca gatcctcaag tgtaagactc 600

ES 2 284 678 T3

cgacaaggcc agagatgtat cctgtatcaa ctgtgatgac aaagacctct ttgttttcta 660
gctaaacctg tgatgctcac gttttctcat tcactatttt tctacagtag gtagaccac 720
5 ttccctctaa aatctgaata atgaaggaaa aatcttttat ctaaagaaa atgattatgg 780
taagcattat acaggtagaa gtgaaacaag cttcattgat ctggttattg aaattaatgt 840
10 ggtggctgtc caatacagtc agtttcaagc tttaatgtgt aaatttcata ttagaa 896

<210> 4

<211> 197

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

20

Pro Leu Leu Gln Leu Ile Cys His Thr Gly Arg Thr Ser Asn Leu Asp
1 5 10 15

25

Leu Asn Glu Met Glu Asn Trp Thr Met Gly Leu Trp Gln Thr Cys Val
20 25 30

30

Ile Gln Glu Glu Val Gly Met Gln Cys Lys Asp Phe Asp Ser Phe Leu
35 40 45

35

Ala Leu Pro Ala Glu Leu Arg Val Ser Arg Ile Leu Met Phe Leu Ser
50 55 60

40

Asn Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu Val Ser Gly Phe Gly Leu Asp
65 70 75 80

45

Cys Leu Arg Ile Gly Glu Ser Gln Arg Asp Leu Lys Arg Arg Leu Leu
85 90 95

50

Ile Leu Gly Gly Ile Leu Ser Trp Ala Ser Gly Ile Thr Ala Leu Val
100 105 110

55

Pro Val Ser Trp Val Ala His Lys Thr Val Gln Glu Phe Trp Asp Glu
115 120 125

60

65

ES 2 284 678 T3

Asn Val Pro Asp Phe Val Pro Arg Trp Glu Phe Gly Glu Ala Leu Phe
 130 135 140

5 Leu Gly Trp Phe Ala Gly Leu Ser Leu Leu Leu Gly Gly Cys Leu Leu
 145 150 155 160

10 Asn Cys Ala Ala Cys Ser Ser His Ala Pro Leu Ala Leu Gly His Tyr
 165 170 175

15 Ala Val Ala Gln Met Gln Thr Gln Cys Pro Tyr Leu Glu Asp Gly Thr
 180 185 190

20 Ala Asp Pro Gln Val
 195

<210> 5

25 <211> 895

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 5

tccattatta caacttattt gccacactgg aagaacctca acctggactt aatgaaatg 60
 gaaaactgga ccatgggact ctggcaaacc tgtgtcatcc aagaggaagt ggggatgcaa 120
 35 tgcaaggact ttgactcctt cctggctttg cctgtctgaac tcagggcttc caggatctta 180
 atgtttctgt caaatgggct gggatttctg ggcctgtctg tctctgggtt tggcctggac 240
 40 tgtttgagaa ttggagagag tcagagagat ctcaagaggc gactgctcat tctgggagga 300
 attctgtcct gggcctcggg aatcacagcc ctggttcccg tctcttgggt tgcccacaag 360
 acggttcagg agttctggga tgagaacgtc ccagactttg tccccaggtg ggagtttggg 420
 45 gaggcctgt ttctgggctg gtttctctga cttctctctc tgctaggagg gtgtctgctc 480
 aactgcgcag cctgtctccag ccacgctccc ctagcttttg gccactatgc agtggcgcaa 540
 atgcaaactc agtgtcccta cctggaagat gggacagcag atcctcaagt gtaagactcc 600
 50 gacaaggcca gagatgtatc ctgtatcaac tgtgatgaca aagacctctt tgtttttag 660
 ctaaacctgt gatgtcagc tttctctatt cactattttt ctacagtagg tagaccact 720
 tcctctaaa atctgaataa tgaaggaaaa atcttttctc taaaagaaaa tgattatggt 780
 55 aagcattata caggtagaag tgaacaagc ttcattgatc tggttattga aattaatgtg 840
 gtggctgtcc aatacagtc gtttcaagct ttaatgtgta aatttcatat tagaa 895

60 <210> 6

<211> 220

<212> PRT

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 284 678 T3

<400> 6

5 Met Ala Leu Ile Phe Arg Thr Ala Met Gln Ser Val Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15

10 Ser Phe Leu Gly Trp Ile Leu Ser Ile Ile Thr Thr Tyr Leu Pro His
20 25 30

15 Trp Lys Asn Leu Asn Leu Asp Leu Asn Glu Met Glu Asn Trp Thr Met
35 40 45

20 Gly Leu Trp Gln Thr Cys Val Ile Gln Glu Glu Val Gly Met Gln Cys
50 55 60

25 Lys Asp Phe Asp Ser Phe Leu Ala Leu Pro Ala Glu Leu Arg Val Ser
65 70 75 80

30 Arg Ile Leu Met Phe Leu Ser Asn Gly Leu Gly Phe Leu Gly Leu Leu
85 90 95

35 Val Ser Gly Phe Gly Leu Asp Cys Leu Arg Ile Gly Glu Ser Gln Arg
100 105 110

40 Asp Leu Lys Arg Arg Leu Leu Ile Leu Gly Gly Ile Leu Ser Trp Ala
115 120 125

45 Ser Gly Ile Thr Ala Leu Val Pro Val Ser Trp Val Ala His Lys Thr
130 135 140

50 Val Gln Glu Phe Trp Asp Glu Asn Val Pro Asp Phe Val Pro Arg Trp
145 150 155 160

55 Glu Phe Gly Glu Ala Leu Phe Leu Gly Trp Phe Ala Gly Leu Ser Leu
165 170 175

60 Leu Leu Gly Gly Cys Leu Leu Asn Cys Ala Ala Cys Ser Ser His Ala
180 185 190

65 Pro Leu Ala Leu Gly His Tyr Ala Val Ala Gln Met Gln Thr Gln Cys
195 200 205

70 Pro Tyr Leu Glu Asp Gly Thr Ala Asp Pro Gln Val
210 215 220

<210> 7

<211> 220

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

65

ES 2 284 678 T3

<400> 7

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

Ser Leu Leu Gly Trp Val Leu Ser Cys Leu Thr Asn Tyr Leu Pro His
 20 25 30

Trp Lys Asn Leu Asn Leu Glu Leu Asn Glu Met Glu Asn Trp Thr Met
 35 40 45

Gly Leu Trp Lys Ser Cys Val Ile Gln Glu Glu Val Gly Arg Gln Cys
 50 55 60

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

Arg Val Leu Met Ser Leu Cys Asn Gly Leu Gly Leu Leu Gly Leu Leu
 85 90 95

Ala Ser Gly Cys Gly Leu Asp Cys Leu Arg Leu Gly Glu Thr Gln Glu
 100 105 110

Gly Leu Lys Lys Arg Leu Leu Thr Leu Gly Gly Thr Leu Leu Trp Thr
 115 120 125

Ser Gly Val Met Val Leu Val Pro Val Ser Trp Val Ala His Lys Thr
 130 135 140

Val Arg Glu Phe Trp Asp Glu Thr Met Pro Glu Ile Val Pro Arg Trp
 145 150 155 160

Glu Phe Gly Glu Ala Leu Phe Leu Gly Trp Phe Ala Gly Phe Cys Leu
 165 170 175

Val Leu Gly Gly Cys Val Leu His Cys Ala Ala Cys Trp Ser Pro Ala
 180 185 190

Pro Ala Ala Ser Ser His Tyr Ala Val Ala Gly Pro Arg Asp His Gln
 195 200 205

Gln His Leu Glu Leu Lys Gln Ala Asn Pro Glu Ile
 210 215 220

<210> 8

<211> 211

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 284 678 T3

<400> 8

5 Met Ala Asn Ser Gly Leu Gln Leu Leu Gly Tyr Phe Leu Ala Leu Gly
1 5 10 15

Gly Trp Val Gly Ile Ile Ala Ser Thr Ala Leu Pro Gln Trp Lys Gln
20 25 30

10 Ser Ser Tyr Ala Gly Asp Ala Ile Ile Thr Ala Val Gly Leu Tyr Glu
35 40 45

15 Gly Leu Trp Met Ser Cys Ala Ser Gln Ser Thr Gly Gln Val Gln Cys
50 55 60

20 Lys Leu Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Asp Gly His Ile Gln Ser Ala
65 70 75 80

25 Arg Ala Leu Met Val Val Ala Val Leu Leu Gly Phe Val Ala Met Val
85 90 95

30 Leu Ser Val Val Gly Met Lys Cys Thr Arg Val Gly Asp Ser Asn Pro
100 105 110

35 Ile Ala Lys Gly Arg Val Ala Ile Ala Gly Gly Ala Leu Phe Ile Leu
115 120 125

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

40 Thr Gln Glu Phe Phe Asn Pro Ser Thr Pro Val Asn Ala Arg Tyr Glu
145 150 155 160

45 Phe Gly Pro Ala Leu Phe Val Gly Trp Ala Ser Ala Gly Leu Ala Val
165 170 175

50 Leu Gly Gly Ser Phe Leu Cys Cys Thr Cys Pro Glu Pro Glu Arg Pro
180 185 190

55 Asn Ser Ser Pro Gln Pro Tyr Arg Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ala Arg
195 200 205

Glu Tyr Val
210

60

<210> 9

<211> 193

<212> PRT

65

<213> *Mus musculus*

ES 2 284 678 T3

<400> 9

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

10 Leu Pro Gln Trp Lys Gln Ser Ser Tyr Ala Gly Asp Ala Ile Ile Thr
20 25 30

15 Ala Val Gly Leu Tyr Glu Gly Leu Trp Met Ser Cys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

20 Thr Gly Gln Val Gln Cys Lys Leu Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Asp
50 55 60

25 Gly His Ile Gln Ser Ala Arg Ala Leu Met Val Val Ala Val Leu Leu
65 70 75 80

30 Gly Phe Val Ala Met Val Leu Ser Val Val Gly Met Lys Cys Thr Arg
85 90 95

35 Val Gly Asp Ser Asn Pro Thr Ala Lys Ser Arg Val Ala Ile Ser Gly
100 105 110

40 Gly Ala Leu Phe Leu Leu Ala Gly Leu Cys Thr Leu Thr Ala Val Ser
115 120 125

45 Trp Tyr Ala Thr Leu Val Thr Gln Glu Phe Phe Asn Pro Ser Thr Pro
130 135 140

50 Val Asn Ala Arg Tyr Glu Phe Gly Pro Ala Leu Phe Val Gly Trp Ala
145 150 155 160

55 Ser Ala Gly Leu Ala Met Leu Gly Gly Ser Phe Leu Cys Cys Thr Cys
165 170 175

60 Pro Glu Pro Glu Arg Ala Asn Ser Ile Pro Gln Pro Tyr Arg Ser Gly
180 185 190

65 Pro

<210> 10

60 <211> 69

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 284 678 T3

<400> 10

Met Ala Asn Ser Gly Leu Gln Leu Leu Gly Tyr Phe Leu Ala Leu Gly
 1 5 10 15

5

Gly Trp His Ser Pro Ala Thr Val Glu Ala Val Phe Leu Arg Arg Leu
 20 25 30

10

Thr Ala Ile Ile Thr Ala Val Gly Leu Tyr Glu Gly Leu Trp Met Ser
 35 40 45

15

Cys Ala Ser Gln Ser Thr Gly Gln Val Gln Cys Lys Leu Tyr Asp Ser
 50 55 60

20

Leu Leu Ala Leu Asp
 65

<210> 11

<211> 229

<212> PRT

25

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

30

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

35

Ser Leu Leu Gly Trp Val Cys Ser Cys Val Thr Thr Ile Leu Pro Gln
 20 25 30

40

Trp Lys Thr Leu Asn Leu Glu Leu Asn Glu Met Glu Thr Trp Ile Met
 35 40 45

45

Gly Ile Trp Glu Val Cys Val Asp Arg Glu Glu Val Ala Thr Val Cys
 50 55 60

50

Arg Ile Leu Met Val Ala Ser His Gly Leu Gly Leu Leu Gly Leu Leu
 85 90 95

55

Leu Cys Ser Phe Gly Ser Glu Cys Phe Gln Phe His Arg Ile Arg Trp
 100 105 110

60

Val Phe Lys Arg Arg Leu Gly Leu Leu Gly Arg Thr Leu Glu Ala Ser
 115 120 125

Ala Ser Ala Thr Thr Leu Leu Pro Val Ser Trp Val Ala His Ala Thr
 130 135 140

65

Ile Gln Asp Phe Trp Asp Asp Ser Ile Pro Asp Ile Ile Pro Arg Trp

ES 2 284 678 T3

Ala Gly Leu Ala Ile Leu Val Ala Thr Ala Trp Tyr Gly Asn Arg Ile
 130 135 140

5 Val Gln Glu Phe Tyr Asp Pro Met Thr Pro Val Asn Ala Arg Tyr Glu
 145 150 155 160

10 Phe Gly Gln Ala Leu Phe Thr Gly Trp Ala Ala Ala Ser Leu Cys Leu
 165 170 175

15 Leu Gly Gly Ala Leu Leu Cys Cys Ser Cys Pro Arg Lys Thr Thr Ser
 180 185 190

20 Tyr Pro Thr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Pro Ala Pro Ser Ser Gly Lys
 195 200 205

Asp Tyr Val
 210

25 <210> 13
 <211> 211
 <212> PRT
 30 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 13

35 Met Ala Asn Ser Gly Leu Gln Leu Leu Gly Phe Ser Met Ala Leu Leu
 1 5 10 15

40 Gly Trp Val Gly Leu Val Ala Cys Thr Ala Ile Pro Gln Trp Gln Met
 20 25 30

45 Ser Ser Tyr Ala Gly Asp Asn Ile Ile Thr Ala Gln Ala Met Tyr Lys
 35 40 45

50 Gly Leu Trp Met Asp Cys Val Thr Gln Ser Thr Gly Met Met Ser Cys
 50 55 60

55 Lys Met Tyr Asp Ser Val Leu Ala Leu Ser Ala Ala Leu Gln Ala Thr
 65 70 75 80

60 Arg Ala Leu Met Val Val Ser Leu Val Leu Gly Phe Leu Ala Met Phe
 85 90 95

65 Val Ala Thr Met Gly Met Lys Cys Thr Arg Cys Gly Gly Asp Asp Lys
 100 105 110

Val Lys Lys Ala Arg Ile Ala Met Gly Gly Gly Ile Ile Phe Ile Val

ES 2 284 678 T3

	115	120	125
5	Ala Gly Leu Ala Ala Leu Val Ala Cys Ser Trp Tyr Gly His Gln Ile 130	135	140
10	Val Thr Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Ile Pro Thr Asn Ile Lys Tyr Glu 145	150	155
15	Phe Gly Pro Ala Ile Phe Ile Gly Trp Ala Gly Ser Ala Leu Val Ile 165	170	175
20	Leu Gly Gly Ala Leu Leu Ser Cys Ser Cys Pro Gly Asn Glu Ser Lys 180	185	190
25	Ala Gly Tyr Arg Ala Pro Arg Ser Tyr Pro Lys Ser Asn Ser Ser Lys 195	200	205
30	Glu Tyr Val 210		
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			