



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019018752-9 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 1 8 7 5 2 A 2 *

(22) Data do Depósito: 16/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 05/05/2020

(54) Título: ANTICORPOS ANTI-PAR2 E SEUS USOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61P 25/00; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2018 US 62/637,766; 16/03/2017 US 62/472,462.

(71) Depositante(es): MEDIMMUNE LIMITED.

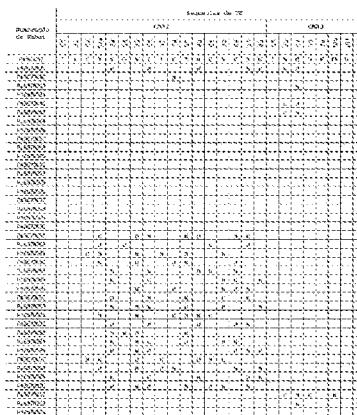
(72) Inventor(es): CLAIRE DOBSON; RICHARD WILLIAMS; IAN GURRELL; SADHANA PODICHETTY; DAVID FAIRMAN; PETER THORNTON; PHILIP NEWTON.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018056776 de 16/03/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/167322 de 20/09/2018

(85) Data da Fase Nacional: 10/09/2019

(57) Resumo: A presente descrição proporciona anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno capazes de se ligarem a PAR2. Em algumas modalidades, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 se ligam a PAR2 de uma maneira dependente do pH. A descrição proporciona adicionalmente métodos para fabricação e uso dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTI-CORPOS ANTI-PAR2 E USOS DOS MESMOS".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade a partir do Pedido Provisório dos E.U.A. No. 62/472,462, depositado a 16 de março, 2017 e a partir do Pedido Provisório dos E.U.A. No. 62/637,766, depositado a 2 de março, 2018. Os pedidos anteriores são incorporados aqui por referência na sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e que é deste modo incorporada por referência na sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada em 8 de março, 2018, é chamada 1848081-0002-093-WO1_SL.txt e tem 351,668 bytes em tamanho.

ANTECEDENTES DA DESCRIÇÃO

[0003] A dor crônica é uma condição que pode afetar qualquer pessoa e impõe uma carga em pacientes, sistemas de cuidados de saúde e economias. Aproximadamente 100 milhões de pessoas nos Estados Unidos sofrem de dor crônica e o custo de cuidados de saúde incrementais anuais totais devido à dor, incluindo custos médicos e os custos econômicos de tempo perdido e salários, é estimado como sendo entre \$560 e \$635 bilhões de dólares (Institute of Medicine of The National Academies, 2011). Todavia, em um questionário de sofredores de dor crônica, mais de metade sentiu que tinha pouco a nenhum controle sobre a sua dor (2006 Voices of Chronic Pain Survey, American Pain Foundation). A dor pode ser causada por uma variedade de condições e doenças, de câncer, a diabetes, a artrite, e pode ser classificada em categorias: dor nociceptiva, neuropática e do tipo misto. A dor nociceptiva é definida por estimulação de fibras nervosas (p.ex., por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos) enquanto a dor

neuropática é dor causada por diversas causas tais como danos nervosos, doenças e, importantemente, inflamação. A inflamação, o processo pelo qual os organismos recrutam células imunitárias e liberam fatores imunitários para o local de uma lesão ou infecção, pode ser assim tanto um processo útil de reparação de danos como uma causa de dor.

[0004] Muitos tratamentos para a dor inibem a inflamação. Duas classes comuns de terapêuticos para a dor anti-inflamatórios são fármacos anti-inflamatórios esteroides e fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs). Os fármacos anti-inflamatórios esteroides suprimem tipicamente as prostaglandinas e leucotrienos, os produtos de inflamação. Tais fármacos são confiáveis e potentes, mas transportam o risco de graves efeitos secundários, incluindo, por exemplo, densidade óssea reduzida, flutuações de peso, supressão do sistema imunitário e irregularidades no crescimento/puberdade (Irving, P. M. et al. (2007) *Aliment Pharmacol Ther.* 26 (3): 313-329; Goodman et al. *J Am Acad Orthop Surg.* Ag 2007; 15 (8): 450-60). Os NSAIDs inibem a ciclo-oxigenase-1 e/ou 2 (COX-1 e/ou COX-2), que catalisam elas próprias a reação de ácido araquidônico em prostaglandinas. A dor crônica e a inflamação podem requerer tratamento prolongado, e a inibição prolongada de enzimas COX pode levar a problemas do trato gastrointestinal, tais como sangramento e úlceras gástricas. Dados os riscos associados a tais tratamentos para a dor anti-inflamação existe uma necessidade de abordagens alternativas para tratamento da dor.

[0005] Os Receptores Acoplados à Proteína-G (GPCRs) são uma família de proteínas membranares que partilham um motivo estrutural comum de sete domínios transmembranares conectando um domínio extracelular N-terminal e um domínio intracelular C-terminal (Granier et al., *Nat Chem Biol.* Ag 2012; 8 (8): 670-673). Os GPCRs sentem sinais extracelulares tais como fótons, hormônios, quimiocinas, etc. e ativam

proteínas G intracelulares. Existem muitas famílias de GPCRs, tais como as famílias Frizzled, Rodopsina, Secretina, Adesão e receptores ativados por protease (PAR) (Zhang *et al.* *Nature*. 20 dez 2012; 492 (7429): 387–392; Zhang *et al.* *Mol Cells*. Out 2015;38 (10): 836-42). Embora as várias famílias de GPCR partilhem características estruturais globais exibem diferentes funções, se ligam a diferentes ligandos e são ativadas por diferentes mecanismos. A ativação da família PAR de GPCRs foi associada à inflamação e nocicepção (Gieseler *et al.* *Cell Commun Signal*. 2013; 11: 86).

[0006] Foram identificados quatro receptores PAR: PAR1, PAR2, PAR3 e PAR4 (Macfarlane *et al.* *Pharmacol Rev*. Jun 2001; 53 (2): 245-82; Gieseler *et al.* *Cell Commun Signal*. 2013; 11: 86). Foi mostrado que a ativação de PAR2 amplifica a inflamação e nocicepção, tornando a sua inibição um alvo atrativo para terapias contra a dor anti-inflamatórias. Os PARs, ao contrário de outros GPCRs, são ativados por clivagem proteolítica de seus domínios extracelulares, o que revela uma sequência N-terminal que atua como um ligante ativante ligado. PAR2, em particular, é clivado e ativado por tripsina e triptase.

[0007] A expressão de PAR2 foi detectada em tecidos vascularizados, vias aéreas, osteoblastos, tecido cardiovascular, queratinócitos, glândulas exócrinas, leucócitos, mastócitos, epitélio intestinal, rim, neurônios, pâncreas e uma variedade de tipos de músculo liso (Macfarlane *supra*). PAR2 foi também implicado em uma variedade de doenças ou condições associadas à inflamação neurogênica, nocicepção e transmissão de dor. PAR2 pode ser ativado por várias serina proteases derivadas de hospedeiro e patógenos (p.ex., tripsina, triptase de mastócitos, calicreinas de tecidos ou membros da cascata de coagulação TF-FVIIa e FVa-FXa).

[0008] Foi mostrado que os anticorpos monoclonais são úteis em uma variedade de aplicações terapêuticas e muitos terapêuticos de

anticorpos estão correntemente no mercado (Maggon, *Curr Med Chem.* 2007; 14 (18): 1978-87; Brekke e Sandlie, *Nat Rev Drug Discov* 2: 52-62, 2003). O tipo mais comum de anticorpo em circulação na corrente sanguínea é imunoglobulina G (IgG). A utilidade de um anticorpo IgG para propósitos terapêuticos depende de vários fatores, incluindo a especificidade do anticorpo pelo seu alvo, a força da sua ligação ao alvo, bem como quanto eficientemente o anticorpo pode ser produzido e quanto rapidamente o anticorpo é eliminado a partir do soro (a meia-vida no soro do anticorpo). As meias-vidas no soro de anticorpos são frequentemente reguladas por FcRn (receptor Fc neonatal), que se liga ao domínio Fc de imunoglobulina G (IgG). *In vivo* se pensa que as IgGs são absorvidas não especificamente por pinocitose de fase fluída (Pyzik *et al.*, *J Immunol.* 15 maio 2015; 194 (10): 4595-603). Uma vez no endossomo, a IgG se liga a FcRn, que separa a IgG em endossomos de reciclagem e de volta para a superfície celular, para longe de lisossomos e para longe da degradação. Embora a taxa de reciclagem de IgG tenha sido estimada como sendo 44% da taxa catabólica fracional, os terapêuticos de anticorpos podem ser ainda esgotados em uma questão de dias pós-administração (Kim, Jonghan, *et al.* *Clin. Immunol.* 122.2 (2007): 146-155).

[0009] A dor associada à inflamação é frequentemente uma condição crônica. É desejável a minimização da dosagem e da frequência de administração de uma molécula terapêutica. Assim existe uma necessidade de novos terapêuticos para a dor anti-inflamação. Anticorpos monoclonais padrão são candidatos atrativos, mas em alguns casos podem ser limitados pelas suas meias-vidas no soro. Como tal podem ser desejados tratamentos alternativos.

BREVE SUMÁRIO DA DESCRIÇÃO

[0010] A presente descrição proporciona anticorpos que se ligam a PAR2. Os anticorpos da descrição são úteis, *inter alia*, para inibição da

sinalização mediada por PAR2 e para tratamento de doenças e disfunções causadas pela ou relacionadas com a atividade e/ou sinalização de PAR2.

[0011] Em algumas modalidades, a descrição proporciona anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam a PAR2 com uma maior afinidade a pH 7,4 do que a pH 6,0. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 com pelo menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 vezes maior afinidade a pH 7,4 do que a pH 6,0. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), em que a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 3; ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 4; e iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 5; e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 8; ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 9; e iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições,

deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 10; em que as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos reduzem a afinidade de ligação do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno por PAR2 humano em não mais do que 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50 ou 10 vezes em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo uma VH com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e VL com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 quando testado a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos compreendem uma substituição homóloga. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos nas CDRs de VH em comparação com as sequências de aminoácidos de CDR na sequência de SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos nas CDRs de VL em comparação com as sequências de aminoácidos de CDR na sequência de SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos são 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições por uma histidina.

[0012] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), em que a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-17 (p.ex., posi-

ções 4, 5 e 7-17) de SEQ ID NO: 4; e iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-8 de SEQ ID NO: 5; e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-14 de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 e a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), em que a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5, 8, 12, 16 e 17 de SEQ ID NO: 4; e em que uma histidina está presente nas

posições de aminoácidos correspondendo às posições 2 e 3 de SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 5 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 7 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 8 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 12 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 15 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 16 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 17 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5 e 8 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5, 8, 12 e 16 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5, 8, 12, 16 e 17 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo às posições 5, 8, 12, 16 e 17 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 2 de SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 3 de SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 2 e 3 de SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 1 de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 5 de SEQ ID

NO: 10. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 6 de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 14 de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504, 514, 524, 534, 544, 554, 564, 574, 584, 594, 604, 614, 624, 634, 644, 654, 664, 674, 684, 694, 704, 714, 724, 734, 744, 754, 764, 774, 784, 794, e 811-818. Em algumas modalidades, a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 525, 535, 545, 555, 565, 575, 585, 595, 605, 615, 625, 635, 645, 655, 665, 675, 685, 695, 705, 715, 725, 735, 745, 755, 765, 775, 785, 795, e 819-820. Em algumas modalidades, a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790 e 800. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 14; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ

ID NO: 15, e em que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 811; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 819 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 814; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 820 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 816; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 818; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH compreende regiões de arcabouço que são pelo menos 90% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 803-806. Em algumas modalidades, a VH compreende regiões de arcabouço que são pelo menos 95% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 803-806. Em algumas modalidades, a VH compreende regiões de arcabouço correspondendo a SEQ ID NOs: 803-806. Em algumas modalidades, a VL compreende regiões de arcabouço que são pelo menos 90% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 807-810. Em algumas modalidades, a VL compreende regiões de arcabouço que são pelo menos 95% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 807-810. Em al-

gumas modalidades, a VL comprehende regiões de arcabouço correspondendo a SEQ ID NOs: 807-810. Em algumas modalidades, a VH comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, e 792. Em algumas modalidades, a VL comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, e 797. Em algumas modalidades, a VH comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 12 em que a VL comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a VH comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 12 e em que a VL comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a VH comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 821 e a VL comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a

SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, a VH comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 824 e a VL comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, a VH comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 827 e a VL comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, a VH comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 831 e a VL comprehende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é um fragmento de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o fragmento de ligação ao antígeno é um scFv. Em algumas modalidades, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab'. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é um anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é humano. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 90% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 95% de identidade com qualquer uma

de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 90% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 95% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736,

746, 756, 766, 776, 786, e 796. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 90% de identidade com SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 95% de identidade com SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 90% de identidade com SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 95% de identidade com SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno previne a interação de tripsina, triptase e/ou matriptase com PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno previne a clivagem de tripsina, triptase e/ou matriptase de PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno previne a clivagem do domínio extracelular de PAR2. Em algumas modalidades, o

anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno inibe a exposição do ligante ligado. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno previne a interação do ligante ligado com a segunda alça transmembranar de PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 com uma maior afinidade a um pH de 7,4 do que a um pH de 6,0. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 100 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 50 nM quando compete com um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 40 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 500 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 6,0 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 1000 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 6,0 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 1100 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 6,0 em um ensaio de ligação a

PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} mais do que 20 vezes mais baixa a um pH de 7,4 do que a um pH de 6,0 quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} mais do que 25 vezes mais baixa a um pH de 7,4 do que a um pH de 6,0 quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} mais do que 30 vezes mais baixa a um pH de 7,4 do que a um pH de 6,0 quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $3,0 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células A549 humanas. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $1,5 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células A549 humanas. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $7,0 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células KNRK de rato. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $5,5 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células KNRK de rato. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $7,0 \times 10^{-11}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células CYNOM-K1 de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $5,0 \times 10^{-11}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células CYNOM-K1 de macaco cinomo-

Igo. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC₅₀ de menos do que 6,0 x 10⁻¹¹ M em um ensaio de influxo de cálcio em células LL/2 de murino. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC₅₀ de menos do que 4,0 x 10⁻¹¹ M em um ensaio de influxo de cálcio em células LL/2 de murino. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é eliminado mais lentamente a partir de soro de um paciente tratado do que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno não tendo modificações de histidina. Em algumas modalidades, a histidina ou histidinas opcionalmente presentes reduzem a afinidade de ligação do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno por PAR2 humano em não mais do que 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50 ou 10 vezes em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo uma VH com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e VL com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 quando testado a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2.

[0013] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um ácido nucleico capaz de expressar qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31,

41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos é pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de qualquer

uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 95% idêntica a SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 95% idêntica a SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 16.

[0014] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um vetor compreendendo qualquer um dos ácidos nucleicos divulgados aqui. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um conjunto de vetores compreendendo qualquer um ou mais dos ácidos nucleicos divulgados aqui.

[0015] Em algumas modalidades, a descrição proporciona uma célula hospedeira compreendendo qualquer um ou mais dos vetores divulgados aqui.

[0016] Em algumas modalidades, a descrição proporciona uma composição compreendendo um transportador farmaceuticamente aceitável e qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui.

[0017] Em algumas modalidades, a descrição proporciona uma composição liofilizada compreendendo qualquer um dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui.

[0018] Em algumas modalidades, a descrição proporciona uma composição liofilizada reconstituída compreendendo qualquer um dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui. Em algumas modalidades, a composição é formulada para administração por pastilha, pulverização, administração oral, liberação retardada ou liberação sustentada, administração transmucosal, xarope, mucoadesiva, formulação bucal, comprimido mucoadesivo, administração tópica, administração parenteral, injeção, administração transdérmica, solução oral, administração retal, administração bucal ou administração transdérmica.

[0019] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um estojo compreendendo qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui ou qualquer uma das composições divulgadas aqui.

[0020] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método para tratamento da dor em um sujeito com sua necessidade, compreendendo administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método para tratamento da dor em um sujeito com sua necessidade, compreendendo administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer uma das composições divulgadas aqui. Em algumas modalidades, a dor é selecionada do grupo consistindo em: dor nociceptiva, neuropática e do tipo misto. Em algumas modalidades, a dor está associada a uma dor de cabeça, dor de cabeça crônica, uma enxaqueca, um câncer, uma infecção viral, artrite reumatoide, osteoartrite, doença de Crohn, doença hepática,

esclerose múltipla, lesão da medula espinhal, neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética, dor da parte inferior das costas, doença cardíaca inflamatória, doença renal, gastrite, gengivite, doença periodontal, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença autoimune, síndrome do intestino irritável, fibromialgia, dores nas pernas, síndrome das pernas inquietas, neuropatia diabética, uma condição alérgica, um procedimento cirúrgico, lesão física aguda ou crônica, fratura óssea ou uma lesão por esmagamento, lesão da medula espinal, uma doença inflamatória, uma condição de dor neuropática ou disfuncional não inflamatória ou uma sua combinação. Em algumas modalidades, a dor é dor de osteoartrite. Em algumas modalidades, o sujeito é um ser humano.

[0021] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método de produção de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui, compreendendo os passos de: expressão de qualquer um dos ácidos nucleicos divulgados aqui em uma célula cultivada, purificação do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0022] Esta patente ou pedido de patente depositado contém pelo menos um desenho executado em cor. As cópias desta publicação de patente ou pedido de patente com desenho(s) a cor serão proporcionadas pelo Escritório após pedido e pagamento da taxa necessária.

[0023] As Figuras 1A e 1B são tabelas ilustrando as diferenças de sequências em CDR2 (SEQ ID NOS 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504, 514, 524, 534, 544, 554, 564, 574, 584, 594, 604, 614, 624, 634, 644, 654, 664, 674, 684, 694, 704, 714, 724, 734, 744, 754, 764, 774, 784, e 794, respectivamente, por ordem de aparecimento) e CDR3 de VH

(SEQ ID NOS 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 525, 535, 545, 555, 565, 575, 585, 595, 605, 615, 625, 635, 645, 655, 665, 675, 685, 695, 705, 715, 725, 735, 745, 755, 765, 775, 785, e 795, respectivamente, por ordem de aparecimento) de vários clones em comparação com as mesmas CDRs de Par0067. CDR1 e as regiões de arcabouço são as mesmas para Par0067 e para todos os clones indicados (*i.e.*, Par0067 e cada um dos clones compreenderam as sequências de SEQ ID NOS: 3 e 803-806).

[0024] As Figuras 2A e 2B são tabelas ilustrando as diferenças de sequências em CDR3 de VL ((SEQ ID NOS 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, e 800, respectivamente, por ordem de aparecimento) de VH de vários clones em comparação com a mesma CDR de Par0067. CDR1, CDR2 e as regiões de arcabouço são as mesmas para Par0067 e para todos os clones indicados (*i.e.*, os clones compreenderam as sequências de SEQ ID NOS: 8, 9 e 807-810).

[0025] A Figura 3 proporciona dados de IC₅₀ a partir de um ensaio de potência celular usando vários anticorpos à base de IgG. Os tipos de célula usados em cada um dos ensaios celulares são indicados. NI = não inibidor.

[0026] A Figura 4A proporciona curvas de IC₅₀ para PaB670129 contra tripsina em células A549, em relação a respostas agonistas ao anticorpo às concentrações equivalentes. A Figura 4B proporciona

curvas de IC_{50} para PaB670129 contra diferentes ativadores de protease PAR2.

[0027] As Figuras 5A-5F ilustram os resultados de experiências nas quais neurônios sensoriais dos gânglios radiculares dorsais (DRG) ou células não neuronais de rato foram tratados com matriptase na presença ou ausência de PaB670129 (também referido aqui como PaB670129). Os neurônios sensoriais DRG de rato pré-tratados com controle de isotipo (20 nM) exibe transientes de cálcio induzidos por matriptase (5A). Os neurônios sensoriais pré-tratados com PaB670129 IgG1TM (20 nM) não respondem à matriptase (5B); % de neurônios respondendo à matriptase quantificada em (5C). As células não neuronais dos DRG pré-tratados com controle de isotipo (20 nM) também exibem transientes de cálcio induzidos por matriptase (8D), mas as células não neuronais pré-tratados com PaB670129 IgG1TM (20 nM) não (5E); % de células não neuronais respondendo à matriptase quantificada em (5F). As Figuras 5A-5E divulgam "LIGRLO" como SEQ ID NO: 832

[0028] A Figura 6 ilustra os efeitos de PaB670129 (versus anticorpos anti-PAR1 ou Vorapaxar) na ativação de PAR1 induzida por trombina em células A549 humanas.

[0029] A Figura 7A ilustra um gráfico ilustrando o efeito de diferentes tratamentos (incluindo um anticorpo contra PAR2, Par0067) na percentagem de hipersensibilidade ipsilateral/contralateral induzida por monoiodoacetato (MIA) em rato. A Figura 7B ilustra um gráfico ilustrando o efeito de diferentes doses de PaB670129 ou um anticorpo de controle de isotipo na percentagem de hipersensibilidade ipsilateral/contralateral induzida por MIA em rato. "i.v." significa intravenoso e "p.o." significa per os (oral).

[0030] A Figura 8 ilustra um gráfico ilustrando o efeito de diferentes doses de PaB670129 ou um anticorpo de controle de isotipo na

percentagem de hipersensibilidade ipsilateral/contralateral induzida por ligação parcial de nervo periférico em camundongo. "s.c." significa subcutâneo. N= 9-10 por grupo. Os dados foram analisados usando ANOVA de 2 vias com tempo e tratamento como fatores dependentes. A significância estatística subsequente foi obtida usando teste Post-Hoc de Tukey. Comparações individuais mostradas * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 vs. Op + controle de isotipo 10 mg/kg.

DESCRÍÇÃO DETALHADA

[0031] Antes de a presente descrição ser descrita é para ser entendido que esta descrição não está limitada a métodos e condições experimentais particulares descritos, pois tais métodos e condições podem variar. É também para ser entendido que a terminologia usada aqui é somente para o propósito de se descreverem modalidades particulares e não se destina a ser limitante.

[0032] A não ser que definidos de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por um perito na técnica à qual esta descrição pertence.

[0033] Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente descrição, os métodos e materiais preferenciais são agora descritos.

A. Definições

[0034] Como usadas em este relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referentes plurais a não ser que o contexto dite claramente de outro modo.

[0035] Os aminoácidos podem ser referidos aqui pelos seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.. Os nucleotídeos, do mesmo modo, podem ser referidos

pelos seus códigos de uma letra comumente aceites.

[0036] É conveniente destacar aqui que "e/ou" onde usado aqui é para ser tomado como descrição específica de cada uma das duas características ou componentes especificados com ou sem o outro. Por exemplo, "A e/ou B" é para ser tomado como descrição específica de cada um de (i) A, (ii) B e (iii) A e B, apenas como se cada um fosse apresentado individualmente aqui.

[0037] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados indistintamente aqui para se referirem a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um mimético químico artificial de um aminoácido ocorrendo naturalmente correspondente, bem como a polímeros de aminoácidos ocorrendo naturalmente e polímeros de aminoácidos não ocorrendo naturalmente.

[0038] As expressões "receptor ativado por protease 2", "PAR2" e similares, como usadas aqui, se referem a uma proteína PAR2 humana tendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 801 ou seus fragmentos biologicamente ativos.

[0039] O termo "ligante ligado" se refere a uma região da porção N-terminal de PAR2 que se liga ao e ativa o próprio receptor PAR2. Em algumas modalidades, a porção de ligante ligado de PAR2 não é exposta até uma protease (p.ex., trombina ou tripsina) clivar proteoliticamente uma porção da enzima PAR2. Em algumas modalidades, o ligante ligado corresponde a um polipeptídeo que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntico à sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NO: 802

[0040] Como usado aqui, "um anticorpo que se liga a PAR2", "anticorpo anti-PAR2" e similares inclui anticorpos, e seus fragmentos de

ligação ao antígeno, que se ligam a PAR2 ligado à membrana ou seus fragmentos. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PAR2 ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga à porção de ligante ligado de PAR2.

B. Anticorpos e Seus Fragmentos de Ligação ao Antígeno

[0041] Como usados aqui, "anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da descrição" se referem a qualquer um ou mais dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno proporcionados aqui. Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da descrição compreendem uma cadeia pesada (VH) compreendendo um domínio variável de cadeia pesada e uma cadeia leve (VL) compreendendo um domínio variável de cadeia leve. Um domínio VH compreende três CDRs, tais como qualquer uma das CDRs proporcionadas aqui e como definidas ou identificadas pelos sistemas de Chothia, Kabat ou IMGT. Estas CDRs estão tipicamente intercaladas com regiões de arcabouço (FR) e, em conjunto, compreendem o domínio VH. Similarmente, uma VL compreende três CDRs, tais como qualquer uma das CDRs proporcionadas aqui e como definidas pelos sistemas de Chothia, Kabat ou IMGT. Estas CDRs estão tipicamente intercaladas com regiões de arcabouço (FR) e, em conjunto, compreendem o domínio VL. As regiões FR, tais como FR1, FR2, FR3 e/ou FR4, podem ser similarmente definidas ou identificadas pelos sistemas de Chothia, Kabat ou IMGT. Ao longo do pedido, quando as CDRs são indicadas como sendo, como identificadas ou como definidas pelos sistemas de Chothia, Kabat ou IMGT, o que se entende é que as CDRs são de acordo com esse sistema (p.ex., as CDRs de Chothia, CDRs de Kabat ou as CDRs de IMGT). Qualquer um destes termos pode ser usado para indicar se as CDRs de Chothia, Kabat ou IMGT estão a ser referidas.

[0042] O termo "anticorpo", como usado aqui, inclui também fragmentos de ligação ao antígeno de moléculas de anticorpos totais. Os

termos "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo e similares, como usados aqui, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína ocorrendo naturalmente, enzimaticamente obtêvel, sintético ou geneticamente manipulado que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo podem ser derivados, p.ex., de moléculas de anticorpos totais usando quaisquer técnicas-padrão adequadas tais como digestão proteolítica ou técnicas de manipulação genética recombinante envolvendo a manipulação e expressão de DNA codificando domínios variáveis e opcionalmente constantes de anticorpos. Tal DNA é conhecido e/ou está prontamente disponível a partir de, p.ex., fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, p.ex., bibliotecas de fagos-anticorpos) ou pode ser sintetizado. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou por uso de técnicas de biologia molecular, por exemplo, para arranjar um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada ou para introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou deletar aminoácidos, etc.

[0043] Em algumas modalidades, a descrição proporciona anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam a PAR2 com uma maior afinidade a pH 7,4 do que a pH 6,0. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 com pelo menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 vezes maior afinidade a pH 7,4 do que a pH 6,0. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), em que a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de

SEQ ID NO: 3; ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 4; e iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 5; e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 8; ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 9; e iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 10; em que as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos reduzem a afinidade de ligação do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno por PAR2 humano em não mais do que 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10 ou 5 vezes em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo uma VH com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e VL com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 quando testado a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos compreendem uma substituição homóloga. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos nas CDRs de VH em comparação com as sequências de aminoácidos de CDR na sequência de SEQ ID NO: 2.

Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos nas CDRs de VL em comparação com as sequências de aminoácidos de CDR na sequência de SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos são 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições por uma histidina.

[0044] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), em que a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 13; ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 14; e iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 15 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 15; e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 18; ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 19; e iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID

NO: 20; em que as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos reduzem a afinidade de ligação do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno por PAR2 humano em não mais do que 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10 ou 5 vezes em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo uma VH com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e VL com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 quando testado a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2. Em algumas modalidades, as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos compreendem uma substituição homóloga. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos nas CDRs de VH em comparação com as sequências de aminoácidos de CDR na sequência de SEQ ID NO: 12. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos nas CDRs de VL em comparação com as sequências de aminoácidos de CDR na sequência de SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), em que a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos são 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou

10 substituições por uma histidina.

[0045] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno comprehende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VH comprehende pelo menos uma, duas ou todas as três CDRs (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, e 792. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno comprehende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VH comprehende pelo menos CDR1, CDR2 e CDR3 (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, e 792. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno comprehende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um do-

mínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VH compreende pelo menos uma, duas ou todas as três CDRs (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 12. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VL compreende pelo menos uma, duas ou todas as três CDRs (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, e 797. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VL compreende pelo menos CDR1, CDR2 e CDR3 (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, e 797. Em algumas modalida-

des, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VL compreende pelo menos uma, duas ou todas as três CDRs (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VH compreende CDR1, CDR2 e CDR3 (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, e 792, e em que o domínio VL compreende pelo menos CDR1, CDR2 e CDR3 (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, e 797. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, em que o

anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de cadeia pesada (VH); em que o domínio VH compreende CDR1, CDR2 e CDR3 (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 ou 12, e em que o domínio VL compreende CDR1, CDR2 e CDR3 (p.ex., como medidas usando qualquer um dos sistemas de Chothia, IMGT ou Kabat) da sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7 ou 17.

[0046] Logo que as sequências de nucleotídeos codificando tais anticorpos tenham sido determinadas, anticorpos quiméricos ou humanizados podem ser produzidos por métodos recombinantes. Ácidos nucleicos codificando os anticorpos são introduzidos em células hospedeiras e expressos usando materiais e procedimentos geralmente conhecidos na técnica e como divulgados aqui. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841. Em algumas modalidades, a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com SEQ ID NO: 1 ou 11. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOS: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796. Em algumas modalidades, a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com SEQ ID NO: 6 ou 16.

[0047] A presente descrição inclui anticorpos anti-PAR2 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam a PAR2. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-PAR2 ou fragmento de ligação ao antígeno neutralizante e/ou bloqueante. Um anticorpo ou fragmento de ligação "neutralizante" ou "bloqueante", como usado aqui, se destina a se referir a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno cuja ligação a PAR2: (i) interfere com a interação entre PAR2 e uma protease (p.ex., tripsina, triptase e/ou matriptase); (ii) inibe a clivagem de PAR2 por uma protease; ii) inibe a sinalização de PAR2 ou ativação de PAR2; e/ou (iv) resulta na inibição de pelo menos uma função biológica de PAR2. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da descrição inibem a ativação de PAR2. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno inibem a conversão de PAR2 não clivado, inativo em PAR2 clivado, ativo. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno inibem a exposição do ligante ligado. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno inibem a ativação de um receptor PAR2 pelo seu ligante liga-

do. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno inibem a ligação do ligante ligado ao segundo domínio transmembranar de PAR2. A inibição causada por um anticorpo neutralizante ou bloqueante anti-PAR2 não necessita de ser completa desde que seja detectável usando um ensaio apropriado. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno inibe a atividade de PAR2 pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% em comparação com PAR2 ativo não inibido. Alguns exemplos de ensaios para detecção da atividade de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2 representativo são descritos na secção da Exemplificação. O trabalhador perito está ciente de ensaios de atividade de anticorpos anti-PAR2 adicionais.

[0048] Em modalidades particulares, qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui interfere com a interação entre PAR2 e uma protease. Em algumas modalidades, a protease é tripsina. Em algumas modalidades, a protease é neutrófilos elastase. Em algumas modalidades, a protease é neutrófilos proteína 3. Em algumas modalidades, a protease é mastócitos triptase. Em algumas modalidades, a protease é fator de tecidos/fator VIIa/fator Xa. Em algumas modalidades, a protease é peptidase relacionada com calicreinas. Em algumas modalidades, a protease é serina proteína-1/matriptase 1 ligada à membrana. Em algumas modalidades, a protease é cisteína proteína parasitária. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 bloqueiam a interação entre PAR2 e uma protease (p.ex., tripsina) *in vitro*, com um valor de IC₅₀ de menos do que cerca de 15 nM, como medido por um ensaio de ligação tal como aquele descrito na seção da Exemplificação. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente descrição bloqueiam a interação entre

PAR2 é uma protease (p.ex., tripsina) *in vitro* a um pH de 7,4 com um valor de IC₅₀ de menos do que cerca de 200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 5 pM, 1 pM ou 0,1 pM. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente descrição bloqueiam a interação entre PAR2 e uma protease (p.ex., tripsina) *in vitro* a um pH de 6,0 com um valor de IC₅₀ de mais do que cerca de 300 nM, 500 nM, 750 nM, 1000 nM, 1100 nM ou 1200 nM. Em certas modalidades, a IC₅₀ do anticorpo ou seu fragmento anti-PAR2 é medida em um ensaio de competição de epítópos, tal como o ensaio de competição de epítópos descrito na secção de Exemplificação proporcionada aqui. Em algumas modalidades, a IC₅₀ do anticorpo ou seu fragmento anti-PAR2 é medida em um ensaio de potência celular. Em algumas modalidades, o ensaio de potência celular utiliza uma célula humana (p.ex., célula A549), uma célula de rato (p.ex., célula KNRK), uma célula de macaco cinomolgo (p.ex., célula CYNOM-K1) ou uma célula de murino (p.ex., uma célula LL/2). Em algumas modalidades, o ensaio de potência celular utiliza um ensaio de influxo de cálcio (p.ex., o ensaio de influxo de cálcio descrito na secção de Exemplificação proporcionada aqui). Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno inibe o influxo de cálcio no ensaio de influxo de cálcio com uma IC₅₀ de menos do que 1 nM, 500 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM, 5 pM, 1 pM ou 0,1 pM. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno previnem a ativação anormal de PAR2 por tripsina. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno inibem/reduzem a dor induzida por inflamação.

[0049] Em modalidades particulares, qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui interfere com a interação entre PAR2 e uma protease (p.ex., tripsina). Em algumas

modalidades, os anticorpos previnem a ligação, clivagem e/ou ativação por protease (p.ex., tripsina) de PAR2. A presente descrição proporciona anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 que se ligam a moléculas de PAR2 com elevada afinidade a pH extracelular, fisiológico (*i.e.*, pH 7,4). Em algumas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos se ligam a PAR2 a pH 7,4 (p.ex., a 25 °C ou 37 °C) com uma K_D de menos do que cerca de 5 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 500 pM, 200 pM, 100 pM ou 50 pM. Em algumas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos se ligam a PAR2 a um pH ligeiramente ácido (tal como pH 6,0) (p.ex., a 25 °C ou 37 °C) com uma K_D de mais do que cerca de 1 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 80 nM ou 100 nM. Em algumas modalidades, o pH ligeiramente ácido é o pH de um compartimento endossomal. Em algumas modalidades, a K_D pode ser medida de acordo com métodos correntemente padrão, tal como usando Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) ou Microequilíbrio de Cristais de Quartzo (QCM).

[0050] A presente invenção inclui também anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 que se ligam especificamente a PAR2 com uma meia-vida dissociativa ($t_{1/2}$) de mais do que cerca de 1,5 minutos, 1,75 minutos, 2 minutos, 2,5 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos ou 30 minutos como medido usando um ensaio tal como ressonância de plasmon de superfície a 25 °C ou 37 °C a pH 7,4. Em algumas modalidades, os anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 se ligam a PAR2 com uma meia-vida dissociativa ($t_{1/2}$) de menos do que cerca de 1 minuto, 45 segundos, 30 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 13 segundos, 7 segundos, 5 segundos ou 3 segundos como medido usando um ensaio tal como ressonância de plasmon de superfície a 25 °C ou 37 °C a um pH

ligeiramente ácido (p.ex., pH 6). Em algumas modalidades, o pH ligeiramente ácido é o pH de um compartimento endossomal. Em algumas modalidades, a K_D pode ser medida de acordo com métodos correntemente padrão, tal como usando Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) ou Microequilíbrio de Cristais de Quartzo (QCM).

[0051] Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente descrição podem possuir uma ou mais das características biológicas acima mencionadas ou quaisquer suas combinações. Outras características biológicas dos anticorpos da presente descrição serão evidentes a um perito na técnica a partir de uma revisão da presente descrição incluindo a seção de Exemplificação proporcionada aqui.

[0052] Como aplicado a polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências de peptídeos, quando otimamente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de intervalo padrão, partilham pelo menos 95% de identidade de sequências, ainda mais preferencialmente pelo menos 98% ou 99% de identidade de sequências. Preferencialmente, as posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservativas. Em algumas modalidades, qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 substituições de aminoácidos conservativos em comparação com uma sequência de referência (p.ex., qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 7, 12 ou 17). Uma "substituição de aminoácido conservativa" é uma na qual um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (p.ex., carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservativa não mudará substancialmente as proprieda-

des funcionais de uma proteína. Em casos onde duas ou mais sequências de aminoácidos diferem entre si por substituições conservativas, a percentagem de identidade de sequência ou grau de similaridade pode ser ajustada para cima para corrigir quanto à natureza conservativa da substituição. Meios para fazer este ajuste são bem conhecidos dos peritos na técnica. Ver, p.ex., Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem (1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadeias laterais de hidroxila alifáticas: serina e treonina; (3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; (4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; (5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato e (7) cadeias laterais contendo enxofre são cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservativas preferenciais são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina.

[0053] Alternativamente, uma substituição conservativa é qualquer mudança tendo um valor positivo na matriz de probabilidade-log PAM250 divulgada em Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. Uma substituição "moderadamente conservativa" é qualquer mudança tendo um valor não negativo na matriz de probabilidade-log PAM250.

[0054] Dependendo das sequências de aminoácidos dos domínios constantes das suas cadeias pesadas, os anticorpos (imunoglobulinas) podem ser atribuídos a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e várias destas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), p.ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamados α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As estruturas de subunida-

des e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas e descritas geralmente em, por exemplo, Abbas *et al. Cellular and Mol. Immunology*, 4^a ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Um anticorpo pode ser parte de uma molécula de fusão maior, formada por associação covalente ou não covalente do anticorpo a uma ou mais outras proteínas ou peptídeos.

[0055] Exemplos não limitantes de fragmentos de ligação ao antígeno incluem: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos Fab'; (iii) fragmentos F(ab')₂; (iv) fragmentos Fd; (v) fragmentos Fv; (vi) moléculas Fv de cadeia única (scFv); (vii) fragmentos dAb; e (viii) unidades de reconhecimento mínimo consistindo nos resíduos de aminoácidos que mimetizam a região hipervariável de um anticorpo (p.ex., uma região determinadora da complementaridade (CDR) isolada tal como um peptídeo CDR3) ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 restrito. Outras moléculas manipuladas, tais como anticorpos específicos de domínio, anticorpos de domínio único, anticorpos de camelídeo, anticorpos com domínios deletados, anticorpos quiméricos, anticorpos com enxerto de CDR, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos (p.ex., nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes, etc.), adnectinas, pequenos imunofarmacêuticos modulares (SMIPs) e domínios IgNAR variáveis, são também englobadas dentro da expressão "fragmento de ligação ao antígeno", como usado aqui.

[0056] Um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo compreenderá tipicamente pelo menos um domínio variável (p.ex., pelo menos um de VH ou VL). O domínio variável pode ter qualquer tamanho ou composição de aminoácidos e compreenderá geralmente pelo menos uma CDR que é adjacente a ou em grelha com uma ou mais sequências de arcabouço. Em fragmentos de ligação ao antígeno tendo um domínio VH associado a um domínio VL, os domínios VH e VL podem estar situados um em relação ao outro em qualquer arranjo

adequado. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros VH-VH, VH-VL ou VL-VL. Alternativamente, o fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter um domínio VH ou VL monomérico.

[0057] Em certas modalidades, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável covalentemente ligado a pelo menos um domínio constante. Configurações exemplificativas, não limitantes de domínios variáveis e constantes que podem ser encontradas dentro do fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente descrição incluem: (i) VH-CH1 ; (ii) VH-CH2; (iii) VH- CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (V) VH-CH1 -CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1 ; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; e (xiv) VL-CL. Em qualquer configuração de domínios variáveis e constantes, incluindo qualquer uma das configurações exemplificativas listadas acima, os domínios variáveis e constantes podem estar diretamente ligados uns aos outros ou podem estar ligados por uma região de charneira ou ligante total ou parcial. Uma região de charneira pode consistir em pelo menos 2 (p.ex., 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos que resulta em uma ligação flexível ou semiflexível entre domínios variáveis e/ou constantes adjacentes em uma única molécula de polipeptídeo. Em algumas modalidades, a região de charneira compreende um ligante de glicina-serina.

[0058] Além do mais, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente descrição pode compreender um homodímero ou heterodímero (ou outro multímero) de qualquer uma das configurações de domínios variáveis e constantes listadas acima em associação não covalente a uma em relação à outra e/ou a um ou mais domínios VH ou VL monoméricos (p.ex., por ligação(ões) de dissulfeto).

[0059] Como com moléculas de anticorpos totais, os fragmentos

de ligação ao antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (p.ex., biespecíficos). Um fragmento de ligação ao antígeno multiespecífico de um anticorpo compreenderá pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável é capaz de se ligar especificamente a um antígeno separado ou a um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpo multiespecífico, incluindo os formatos de anticorpos biespecíficos exemplificativos divulgados aqui, pode ser adaptado para uso no contexto de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente descrição usando técnicas de rotina disponíveis na técnica.

[0060] Em certas modalidades da descrição, os anticorpos anti-PAR2 da descrição são anticorpos humanos. O termo "anticorpo humano", como usado aqui, se destina a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinal humana. Os anticorpos humanos da descrição podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinal humana (p.ex., mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo nas CDRs e, em algumas modalidades, CDR3. No entanto, o termo "anticorpo humano", como usado aqui, não se destina a incluir anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linha germinal de outras espécies de mamíferos, tais como um camundongo, foram enxertadas em sequências de arca-bouço humanas.

[0061] Os anticorpos da descrição podem, em algumas modalidades, ser anticorpos humanos recombinantes. O termo "anticorpo humano recombinante", como usado aqui, se destina a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfetado para uma célula

hospedeira (descrito adicionalmente em baixo), anticorpos isolados a partir de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatorial, recombinante (descrita adicionalmente em baixo), anticorpos isolados a partir de um animal (p.ex., um camundongo) que é transgênico quanto a genes de imunoglobulina humana (ver, p.ex., Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295) ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva *splicing* de sequências de genes de imunoglobulina humana com outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinal humana. Em certas modalidades, no entanto, tais anticorpos humanos recombinantes são sujeitos a mutagênese *in vitro* (ou, quando é usado um animal transgênico quanto a sequências de Ig humana, mutagênese somática *in vivo*) e assim as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de e relacionadas com as sequências VH e VL da linha germinal humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha germinal de anticorpos humanos *in vivo*.

[0062] Os anticorpos humanos podem existir em duas formas que estão associadas à heterogeneidade de charmeira. Em uma forma, uma molécula de imunoglobulina compreende um construto de quatro cadeias estável de aproximadamente 150-160 kDa no qual os dímeros são mantidos unidos por uma ligação de dissulfeto de cadeia pesada intercadeias. Em uma segunda forma, os dímeros não estão ligados através de ligações de dissulfeto intercadeias e uma molécula de cerca de 75-80 kDa é formada composta por uma cadeia leve e pesada covalentemente acoplada (meio-anticorpo). Estas formas têm sido extremamente difíceis de separar, mesmo após purificação por afinidade.

[0063] A frequência de aparecimento da segunda forma em vários isótipos de IgG intatos é devido a, mas não se limitando a, diferenças

estruturais associadas ao isotipo da região de charneira do anticorpo. Uma substituição de aminoácido único na região de charneira da charneira IgG₄ humana pode reduzir significativamente o aparecimento da segunda forma (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology* 30: 105) até níveis tipicamente observados usando uma charneira IgG₁ humana. A corrente descrição contempla anticorpos tendo uma ou mais mutações na região de charneira, CH2 ou CH3 que podem ser desejáveis, por exemplo, na produção, para melhorar o rendimento da forma de anticorpo desejada.

[0064] Os anticorpos da descrição podem ser anticorpos isolados ou fragmentos de ligação ao antígeno isolados. Um "anticorpo isolado" ou "fragmento de ligação ao antígeno isolado", como usado aqui, significa um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de pelo menos um componente do seu ambiente natural. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que foi separado ou removido a partir de, pelo menos, um componente de um organismo, ou a partir de um tecido ou célula no qual o anticorpo existe naturalmente ou é naturalmente produzido, é um "anticorpo isolado" ou um "fragmento de ligação ao antígeno isolado" para propósitos da presente descrição. Um anticorpo isolado inclui também um anticorpo *in situ* dentro de uma célula recombinante. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno isolados são anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que foram sujeitos a, pelo menos, um passo de purificação ou isolamento. De acordo com certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno isolado pode estar substancialmente isento de outros materiais celulares e/ou químicos.

[0065] Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 divulgados aqui podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos nas regiões de arca-

bouço e/ou CDR dos domínios de cadeias pesadas e leves em comparação com as sequências da linha germinal correspondentes a partir das quais os anticorpos foram derivados. A presente invenção inclui anticorpos, e seus fragmentos de ligação ao antígeno, que são derivados a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos divulgadas aqui, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões de arcabouço e/ou CDR são mutados no(s) resíduo(s) correspondente(s) da sequência da linha germinal a partir da qual o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno foi derivado ou no(s) resíduo(s) correspondente(s) de outra sequência da linha germinal humana ou em uma substituição de aminoácidos conservativa do(s) resíduo(s) da linha germinal correspondente(s) (tais mudanças de sequência são referidas aqui coletivamente como "mutações da linha germinal"). Um perito na técnica, começando com as sequências de região variável de cadeias pesadas e leves divulgadas aqui, pode facilmente produzir numerosos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que compreendem uma ou mais mutações da linha germinal individuais ou suas combinações. Em certas modalidades, todos os resíduos de arcabouço e/ou CDR dentro dos domínios VH e/ou VL são mutados de volta para os resíduos encontrados na sequência da linha germinal original a partir da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, somente certos resíduos são mutados de volta para a sequência da linha germinal original, p.ex., somente os resíduos mutados encontrados dentro dos primeiros 8 aminoácidos de FR1 ou dentro dos últimos 8 aminoácidos de FR4 ou somente os resíduos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais do(s) resíduo(s) de arcabouço e/ou CDR são mutados no(s) resíduo(s) correspondente(s) de uma sequência da linha germinal diferente (*i.e.*, uma sequência da linha germinal que é diferente da sequência da linha germinal a partir da qual o anticorpo foi

originalmente derivado). Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VH 1 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 803. Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VH 2 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 804. Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VH 3 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 805. Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VH 4 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 806. Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VL 1 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 807. Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VL 2 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 808. Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VL 3 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 809. Em algumas modalidades, a região de arcabouço de VL 4 compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 810. Em algumas modalidades, o arcabouço de VH compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10

substituições conservativas em comparação com uma sequência de referência de qualquer uma de SEQ ID NOs: 803-806. Em algumas modalidades, o arcabouço de VL compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições conservativas em comparação com uma sequência de referência de qualquer uma de SEQ ID NOs: 807-810.

[0066] Além do mais, os anticorpos da presente descrição podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações da linha germinal dentro das regiões de arcabouço e/ou CDR, p.ex., em que certos resíduos individuais são mutados no resíduo correspondente de uma sequência da linha germinal particular enquanto certos outros resíduos que diferem da sequência da linha germinal original são mantidos ou são mutados no resíduo correspondente de uma sequência da linha germinal diferente. Uma vez obtidos, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que contêm uma ou mais mutações da linha germinal podem ser facilmente testados quanto a uma ou mais propriedades desejadas tais como especificidade de ligação melhorada, afinidade de ligação aumentada, propriedades biológicas antagonistas ou agonistas melhoradas ou intensificadas, etc. Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno obtidos desta maneira geral são englobados dentro da presente descrição.

[0067] A presente invenção inclui também anticorpos anti-PAR2 compreendendo variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos de VH, VL e/ou CDR divulgadas aqui tendo uma ou mais substituições conservativas. Por exemplo, a presente descrição inclui anticorpos anti-PAR2 tendo sequências de aminoácidos de VH, VL e/ou CDR com, p.ex., 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 substituições de aminoácidos conservativas em relação a qualquer uma das sequências de aminoácidos de VH, VL e/ou CDR divulgadas aqui.

[0068] O termo "epítopo" se refere a um determinante antigênico que interage com um local de ligação ao antígeno específico na região

variável de uma molécula de anticorpo conhecido como um parátopo. Um antígeno único pode ser mais do que um epítopo. Assim, diferentes anticorpos podem se ligar a diferentes áreas em um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. Os epítopos podem ser conformacionais ou lineares. Um epítopo conformacional é produzido por aminoácidos espacialmente justapostos de diferentes segmentos da cadeia de polipeptídeo linear. Um epítopo linear é um produzido por resíduos de aminoácidos adjacente em uma cadeia de polipeptídeo. Em certas modalidades, um epítopo pode incluir frações de sacarídeos, grupos fosforila ou grupos sulfonila no antígeno.

[0069] Deve ser notado que qualquer porção de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da descrição pode ser similarmente modificada, tal como com um marcador de epítopo, uma fração ou frações de PEG e similares. Além disso, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem compreender mais do que um marcador de epítopo, tal como 2 marcadores de epítopo, ou podem incluir 0 marcadores de epítopos.

[0070] O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntico", quando se refere a um ácido nucleico ou seu fragmento, indica que, quando otimamente alinhados com inserções ou deleções de nucleotídeos apropriados com outro ácido nucleico (ou sua fita complementar), existe identidade de sequências de nucleotídeos em pelo menos cerca de 95%, e mais preferencialmente 96%, 97%, 98% ou 99%, das bases de nucleotídeos, como medida por qualquer algoritmo bem conhecido de identidade de sequências, tal como FASTA, BLAST ou Gap, como discutido em baixo. Uma molécula de ácido nucleico tendo identidade substancial com uma molécula de ácido nucleico de referência pode, em certos casos, codificar um polipeptídeo tendo a mesma sequência de aminoácidos ou sequência de aminoácidos substancialmente similar que o polipeptídeo codificado pela molécula

de ácido nucleico de referência.

[0071] A similaridade de sequências para polipeptídeos, que é também referida como identidade de sequências, é tipicamente medida usando software de análise de sequências. O software de análise de proteínas emparelha sequências similares medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácidos conservativas. Por exemplo, o software GCG contém programas tais como Gap e Bestfit que podem ser usados com parâmetros padrão para se determinar homologia de sequências ou identidade de sequências entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína de tipo selvagem e uma sua mutante. Ver, p.ex., GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeos podem ser também comparadas usando FASTA usando parâmetros padrão ou recomendados, um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (p.ex., FASTA2 e FASTA3) proporciona alinhamentos e percentagem de identidade de sequências das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson (2000) *supra*). Outro algoritmo preferencial quando se compara uma sequência da descrição com uma base de dados contendo um grande número de sequências de diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, usando parâmetros padrão. Ver, p.ex., Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 e Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402. Em algumas modalidades, as sequências são comparadas usando alinhamento de sequências par a par EMBOSS Needle.

[0072] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é um fragmento de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o fragmento de ligação ao antígeno é um scFv. Em algumas modalidades, o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab'.

Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é um anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

[0073] Os anticorpos se tornaram úteis e de interesse como agentes farmacêuticos com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais são produzidos usando qualquer método que produza moléculas de anticorpos por linhas de células contínuas em cultura. Exemplos de métodos adequados para preparação de anticorpos monoclonais incluem os métodos de hibridoma de Kohler *et al.* (1975, *Nature* 256: 495-497) e o método de hibridoma de células B humanas (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; e Brodeur *et al.*, 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque), pp. 51-63). Em muitos casos são usados hibridomas para gerar um anticorpo inicial de origem murina ou de roedor. Esse anticorpo inicial pode ser depois modificado, tal como usando técnicas recombinantes, para produzir variantes de roedor, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e similares. Existem outros métodos para produzir um anticorpo inicial, e tais métodos são conhecidos na técnica. No entanto, independentemente do método usado para gerar um anticorpo inicial ou mesmo uma variante desse anticorpo inicial, qualquer dado anticorpo de origem não humana pode ser depois modificado para aumentar a sua humanidade.

[0074] Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da descrição podem ser preparados por uso de bibliotecas combinatoriais para rastrear anticorpos com a atividade ou atividades desejadas. Por exemplo, uma variedade de métodos é conhecida na técnica para geração de bibliotecas de exibição em fagos e rastreio de tais bibliotecas quanto a anticorpos possuindo as características de ligação desejadas. Tais métodos são descritos geralmente em Hoogenboom *et al.* em *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human

Press, Totowa, NJ, 2001). Por exemplo, um método de geração de anticorpos de interesse é através do uso de uma biblioteca de exibição em fagos como descrito em Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340 (5): 1073-93.

[0075] Em princípio, clones de anticorpos sintéticos são selecionados por rastreio de bibliotecas de fagos contendo fagos que exibem vários fragmentos de região variável de anticorpo (Fv) fundidos à proteína de revestimento dos fagos. Tais bibliotecas de fagos são *panned* por cromatografia de afinidade contra o antígeno desejado. Os clones expressando fragmentos Fv capazes de se ligarem ao antígeno desejado são adsorvidos ao antígeno e assim separados dos clones sem ligação na biblioteca. Os clones de ligação são depois eluídos do antígeno e podem ser adicionalmente enriquecidos por ciclos adicionais de adsorção/eluição de antígenos. Qualquer um dos anticorpos da descrição pode ser obtido por desenho de um procedimento de rastreio de anticorpos adequado para selecionar o clone de fago de interesse seguido por construção de um clone de anticorpo de comprimento total usando as sequências de Fv do clone de fago de interesse e sequências de região constante (Fc) adequadas descritas em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, Publicação NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Pode ser vantajoso aumentar a humanidade de um anticorpo não humano para o torna-lo mais adequado para uso em sujeito e células humanas, para propósitos de diagnóstico, terapêutico ou de investigação. Os anticorpos podem ser modificados para uso como terapêuticos. Exemplos de tais anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpos) incluem anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos. Existem numerosos métodos na técnica para geração de anticorpos quiméricos, humanizados e humanos. No contexto da presente descrição, um anticorpo é considerado humanizado se pelo menos um domínio VH ou domínio

VL for humanizado. Além do mais, um domínio VH ou VL é humanizado se a sequência de aminoácidos de pelo menos uma porção de pelo menos uma das regiões FR tiver sido modificada, em relação a um anticorpo não humano (p.ex., murino) original, tal que a sequência de aminoácidos dessa porção corresponda àquela de um anticorpo humano ou sequência de consenso humana. Em certas modalidades, pelo menos uma, duas, três ou quatro regiões FR do domínio VH e/ou pelo menos uma, duas, três ou quatro regiões FR do domínio VL foram modificadas (na totalidade ou em parte) tal que a sua sequência esteja mais intimamente relacionada com uma sequência humana. Para qualquer um dos anteriores em certas modalidades, um fragmento de anticorpo humanizado pode ser proporcionado no contexto de uma região constante de cadeia leve e/ou cadeia pesada humana ou não humana (p.ex., compreendendo um CL e um ou mais de um domínio CH1, charneira, CH2 e/ou CH3). Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno humanizado da descrição é proporcionado no contexto de domínios constantes de cadeia leve e/ou cadeia pesada humanos, quando presentes. Anticorpos e fragmentos de ligação de anticorpos combinando qualquer um dos domínios variáveis de cadeia leve e/ou domínios variáveis de cadeia pesada humanizados descritos aqui são exemplificativos de anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da descrição. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é quimérico. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é humano.

[0076] De acordo com certas modalidades da presente descrição são proporcionados anticorpos anti-PAR2 compreendendo um domínio Fc compreendendo uma ou mais mutações que intensificam ou diminuem a ligação do anticorpo ao receptor FcRn, p.ex., a pH ácido em

comparação com pH neutro. Por exemplo, a presente descrição inclui anticorpos anti-PAR2 compreendendo uma mutação na região CH2 ou CH3 do domínio Fc, em que a(s) mutação(ões) aumenta(m) a afinidade do domínio Fc por FcRn em um ambiente ácido (p.ex., em um endossomo onde o pH varia de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento na meia-vida no soro do anticorpo quando administrado a um animal. Exemplos não limitantes de tais modificações de Fc incluem, p.ex., uma modificação na posição 250 (p.ex., E ou Q); 250 e 428 (p.ex., L ou F); 252 (p.ex., L/Y/F/W ou T), 254 (p.ex., S ou T) e 256 (p.ex., S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (p.ex., H/L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (p.ex., H/F ou Y); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (p.ex., 308F, V308F) e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação 428L (p.ex., M428L) e 434S (p.ex., N434S); uma modificação 428L, 259I (p.ex., V259I) e 308F (p.ex., V308F); uma modificação 433K (p.ex., H433K) e 434 (p.ex., 434Y); uma modificação 252, 254 e 256 (p.ex., 252Y, 254T e 256E); uma modificação 250Q e 428L (p.ex., T250Q e M428L); e uma modificação 307 e/ou 308 (p.ex., 308F ou 308P). Ainda em outra modalidade, a modificação compreende uma modificação 265A (p.ex., D265A) e/ou 297A (p.ex., D297A). Todas as combinações possíveis das mutações de domínio Fc anteriores, e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpos divulgadas aqui, são contempladas dentro do escopo da presente descrição. Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem a mutação tripla L234F/L235E/P331S ("TM"). A TM causa uma diminuição profunda na atividade de ligação de moléculas de IgG1 humanas a C1q, CD64, CD32A e CD16 humanas. Ver, p.ex., Oganesyan *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 64: 700-704 (2008). Anticorpos com meias-vidas aumentadas podem ser também gerados por modificação de resíduos de aminoácidos identificados como es-

tando envolvidos na interação entre o Fc e o receptor FcRn. Por exemplo, a introdução da mutação tripla M252Y/S254T/T256E ("YTE") no domínio CH2 de moléculas de imunoglobulina G (IgG) humana causa um aumento na sua ligação ao receptor Fc neonatal humano (FcRn). Ver Patente dos E.U.A. No. 7,083,784, os conteúdos da qual são aqui incorporados por referência na sua totalidade. Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem as modificações YTE.

[0077] De acordo com certas modalidades da presente descrição são proporcionados anticorpos anti-PAR2 compreendendo uma ou mais mutações nos domínios VH e/ou VL que intensificam ou diminuem a ligação do anticorpo a PAR2, p.ex., a pH ácido em comparação com pH neutro. Por exemplo, a presente descrição inclui anticorpos anti-PAR2 compreendendo uma mutação na região CDR2 (SEQ ID NO: 4) ou uma CDR3 (SEQ ID NO: 5) do domínio VH e/ou na CDR3 (SEQ ID NO: 10) do domínio VL, em que a(s) mutação(ões) substitui(em) um ou mais aminoácidos por histidina e diminui(em) a afinidade do domínio VH e/ou VL por PAR2 em um ambiente ácido (p.ex., no endossomo onde o pH varia de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento na meia-vida no soro do anticorpo quando administrado a um animal. Exemplos não limitantes de tais modificações de VH incluem, p.ex., uma modificação nas posições de aminoácidos 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16 e 17 de CDR2 (SEQ ID NO: 4) e 1, 2, 4, 5 e 7 de CDR3 (SEQ ID NO: 5). Exemplos não limitantes de tais modificações de VL incluem, p.ex., uma modificação nas posições 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 e 14 de CDR3 (SEQ ID NO: 10). Ainda em outra modalidade, a VH compreende modificações nas posições 5, 8, 12, 16 e 17 de CDR2 (SEQ ID NO: 4) e posições 2 e 3 de CDR3 (SEQ ID NO: 5). Todas as combinações possíveis das mutações de domínio VH e VL anteriores, e outras mutações dentro do domínio Fc divulgadas aqui, são contempladas dentro do escopo da pre-

sente descrição.

[0078] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), em que a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-17 (p.ex., 4, 5 e 7-17) de SEQ ID NO: 4; e iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-8 de SEQ ID NO: 5; e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-14 de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a VH compreende: i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e em que a VL compreende: i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno tem uma histidina na posição de aminoácido correspondendo a qualquer uma ou mais das posições 7, 8, 12, 15, 16 ou 17 de SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmen-

to de ligação ao antígeno tem uma histidina na posição de aminoácido correspondendo a qualquer uma ou mais das posições 2 ou 3 de SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno tem uma histidina na posição de aminoácido correspondendo a qualquer uma ou mais das posições 1, 5, 6 ou 14 de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5, 8, 12, 16 e 17 de SEQ ID NO: 4; e em que uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 2 e 3 de SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504, 514, 524, 534, 544, 554, 564, 574, 584, 594, 604, 614, 624, 634, 644, 654, 664, 674, 684, 694, 704, 714, 724, 734, 744, 754, 764, 774, 784, 794, e 811-818. Em algumas modalidades, a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 525, 535, 545, 555, 565, 575, 585, 595, 605, 615, 625, 635, 645, 655, 665, 675, 685, 695, 705, 715, 725, 735, 745, 755, 765, 775, 785, 795, e 819-820. Em algumas modalidades, a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510,

520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790 e 800. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 14; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15, e em que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 811; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 819 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 814; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 820 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 816; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 818; a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15 e a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20. Em algumas modalidades, a VH compreende regiões de arcabouço que são cada uma pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticas a SEQ ID NOs: 803-806. Em algumas modalidades, a VL compreende regiões de arcabouço que são cada uma pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticas a SEQ ID NOs: 807-810. Em algumas modalidades, a VH compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a qualquer uma das sequências selecionadas do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, e 792. Em algumas modalidades, a VL compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a qualquer uma das sequências selecionadas do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, e 797. Em algumas modalidades, a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 12 e a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 821 e a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 824 e a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, a VH compreende uma se-

quência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 827 e a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17. Em algumas modalidades, a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 831 e a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17.

[0079] A presente descrição inclui também anticorpos anti-PAR2 compreendendo uma região constante de cadeia pesada (CH) quimérica, em que a região CH quimérica compreende segmentos derivados a partir das regiões CH de mais do que um isotipo de imunoglobulina. Por exemplo, os anticorpos da descrição podem compreender uma região CH quimérica compreendendo parte ou todo de um domínio CH2 derivado a partir de uma molécula IgG₁ humana, IgG₂ humana ou IgG₄ humana combinada com parte ou todo de um domínio CH3 derivado a partir de uma molécula IgG₁ humana, IgG₂ humana ou IgG₄ humana. De acordo com certas modalidades, os anticorpos da descrição compreendem uma região CH quimérica tendo uma região de charneira quimérica. Por exemplo, uma charneira quimérica pode compreender uma sequência de aminoácidos de "charneira superior" (resíduos de aminoácidos a partir das posições 216 até 227 de acordo com numeração de EU) derivada a partir de uma região charneira de IgG₁ humana, IgG₂ humana ou IgG₄ humana, combinada com uma sequência de "charneira inferior" (resíduos de aminoácidos a partir das posições 228 até 236 de acordo com numeração de EU) derivada a partir de uma região charneira de IgG₁ humana, IgG₂ humana ou IgG₄ humana.

[0080] De acordo com certas modalidades, a região de charneira quimérica compreende resíduos de aminoácidos derivados a partir de uma charneira superior de IgG₁ humana ou IgG₄ humana e resíduos de aminoácidos derivados a partir de uma charneira inferior de IgG₂

humana. Um anticorpo compreendendo uma região CH quimérica como descrita aqui pode, em certas modalidades, exibir funções efetoras de Fc modificadas sem afeta adversamente as propriedades terapêuticas ou farmacocinéticas do anticorpo. (Ver, p.ex., US 2015-0203591 A1).

[0081] A presente invenção inclui anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 que interagem com um ou mais aminoácidos de PAR2. O epítopo ao qual os anticorpos se ligam pode consistir em uma única sequência contínua de 3 ou mais (p.ex., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos de PAR2. Alternativamente, o epítopo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos (ou sequências de aminoácidos) não contíguos de PAR2.

[0082] Várias técnicas conhecidas de peritos na técnica podem ser usadas para determinar se um anticorpo "interage com um ou mais aminoácidos" dentro de um polipeptídeo ou proteína. Técnicas exemplificativas incluem, p.ex., ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como aquele descrito em *Antibodies*, Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análise mutacional de rastreio de alanina, análise de transferência de peptídeos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463) e análise de clivagem de peptídeos. Adicionalmente, métodos tais como excisão de epítopos, extração de epítopos e modificação química de抗ígenos podem ser empregues (Tomer, 2000, *Protein Science* 9: 487-496). Outro método que pode ser usado para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual um anticorpo interage é permuta de hidrogênio/deutério por espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de permuta de hidrogênio/deutério envolve marcação com deutério da proteína de interesse, seguida por ligação do anticorpo à proteína marcada com deutério. De seguida, o complexo proteína/anticorpo é transferido para água para

permitir a ocorrência de permuta de hidrogênio-deutério exceto para resíduos protegidos pelo anticorpo (que permanece marcado com deutério). Após dissociação do anticorpo, a proteína alvo é sujeita a clivagem com protease e análise de espectrometria de massa, revelando deste modo os resíduos marcados com deutério que correspondem aos aminoácidos específicos com os quais o anticorpo interage. Ver, p.ex., Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2): 252-259; Engen e Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0083] A presente invenção inclui adicionalmente anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 que se ligam ao mesmo epítopo que qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui (p.ex., um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 12 e 17). Do mesmo modo, a presente invenção inclui também anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 que competem quanto à ligação a PAR2 com qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui (p.ex., um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 12 e 17). O trabalhador perito pode facilmente determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epítopo que, ou compete quanto à ligação com, um anticorpo anti-PAR2 de referência por uso de métodos de rotina conhecidos na técnica e exemplificados aqui. Por exemplo, para se determinar se um anticorpo de teste se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo anti-PAR2 de referência da descrição, é permitido que o anticorpo de referência se ligue a uma proteína PAR2. De seguida, a capacidade de um anticorpo de teste de se ligar à molécula de PAR2 é avaliada. Se o anticorpo de teste for capaz de se ligar a PAR2 após ligação de saturação com o anticorpo anti-PAR2 de referência pode ser concluído que o anticorpo de teste se liga a um epítopo diferente do que o anticorpo anti-PAR2

de referência. Por outro lado, se o anticorpo de teste não for capaz de se ligar à molécula de PAR2 após ligação de saturação com o anticorpo anti-PAR2 de referência, então o anticorpo de teste pode se ligar ao mesmo epítopo que o epítopo ligado pelo anticorpo anti-PAR2 de referência da descrição. Experimentação de rotina adicional (p.ex., mutação de peptídeos e análises de ligação) pode ser depois levada a cabo para confirmar se a ausência observada de ligação do anticorpo de teste é de fato devida à ligação ao mesmo epítopo que o anticorpo de referência ou se o bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável pela ausência de ligação observada. As experiências deste tipo podem ser realizadas usando ELISA, RIA, Biacore, citometria de fluxo ou qualquer outro ensaio de ligação de anticorpos quantitativo ou qualitativo disponível na técnica. De acordo com certas modalidades da presente descrição, dois anticorpos se ligam ao mesmo epítopo (ou epítopo sobreposto) se, p.ex., um excesso de 1, 5, 10, 20 ou 100 vezes de um anticorpo inibir a ligação do outro em pelo menos 50% mas preferencialmente 75%, 90% ou mesmo 99% como medido em um ensaio de ligação competitiva (ver, p.ex., Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990; 50: 1495-1502).

[0084] Alternativamente, dois anticorpos são considerados como se ligante ao mesmo epítopo se essencialmente todas as mutações de aminoácidos no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzirem ou eliminarem a ligação do outro. Dois anticorpos são considerados como tendo "epítopos sobrepostos" se somente um subconjunto de mutações de aminoácidos que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzir ou eliminar a ligação do outro.

[0085] Para determinar se um anticorpo compete quanto à ligação (ou compete de modo cruzado quanto à ligação) com um anticorpo anti-PAR2 de referência, a metodologia de ligação acima descrita é realizada em duas orientações. Em uma primeira orientação é permiti-

do que o anticorpo de referência se ligue a uma proteína PAR2 sob condições de saturação seguido por avaliação da ligação do anticorpo de teste à molécula de PAR2. Em uma segunda orientação é permitido que o anticorpo de teste se ligue a uma molécula de PAR2 sob condições de saturação seguido por avaliação da ligação do anticorpo de referência à molécula de PAR2. Se, em ambas as orientações, somente o primeiro anticorpo (saturante) for capaz de se ligar à molécula PAR2, então é concluído que o anticorpo de teste e o anticorpo de referência competem quanto à ligação a PAR2. Como será apreciado por um perito na técnica, um anticorpo que compete quanto à ligação com um anticorpo de referência pode não se ligar necessariamente ao mesmo epítopo que o anticorpo de referência, mas pode bloquear estericamente a ligação do anticorpo de referência por ligação a um epítopo sobreposto ou adjacente.

[0086] Métodos para geração de anticorpos monoclonais, incluindo anticorpos monoclonais totalmente humanos, são conhecidos na técnica. Quaisquer tais métodos conhecidos podem ser usados no contexto da presente descrição para fabricar anticorpos humanos que se ligam especificamente a PAR2 humana.

[0087] Usando tecnologia VELOCIMMUNE™, por exemplo, ou qualquer outro método conhecido para geração de anticorpos monoclonais totalmente humanos, anticorpos contra PAR2 quiméricos de elevada afinidade são inicialmente isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Como na seção experimental em baixo, os anticorpos são caracterizados e selecionados quanto a características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, epítopo, etc. Se necessário, as regiões constantes de camundongo são substituídas por uma região constante humana desejada, por exemplo IgG₁ ou IgG₄ de tipo selvagem ou modificada, para gerar um anticorpo anti-PAR2 totalmente humano. Embora a região constante

selecionada possa ser variada de acordo com o uso específico, as características de ligação ao antígeno com elevada afinidade e especificidade pelo alvo residem na região variável. Em certos casos, os anticorpos anti-PAR2 totalmente humanos são isolados diretamente a partir de células N positivas quanto ao antígeno.

[0088] Os anticorpos anti-PAR2 e fragmentos de anticorpos da presente descrição englobam proteínas tendo sequências de aminoácidos que podem variar daquelas dos anticorpos descritos, mas que retêm a capacidade de se ligarem a PAR2 (p.ex., SEQ ID NO: 801) ou, mais especificamente em algumas modalidades, um ligante ligado a PAR2 (p.ex., SEQ ID NO: 802). Tais anticorpos e fragmentos de anticorpos variantes compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos quando comparados com uma sequência original, mas exibem atividade biológica que é essencialmente equivalente àquela dos anticorpos descritos. Do mesmo modo, as sequências de DNA codificando anticorpos anti-PAR2 da presente descrição englobam sequências que compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de nucleotídeos quando comparadas com as sequências divulgadas, mas que codificam um anticorpo anti-PAR2 ou fragmento de anticorpo que é essencialmente bioequivalente a um anticorpo anti-PAR2 ou fragmento de anticorpo da descrição. Exemplos de tais sequências de aminoácidos e DNA variantes são discutidos acima.

[0089] Dois anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são considerados bioequivalentes se, por exemplo, forem equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cuja taxa e extensão de absorção não mostrem uma diferença significativa quando administrados à mesma dose molar sob condições experimentais similares, dose única ou dose múltipla. Alguns anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno serão considerados equivalentes ou alternativas farmacêuti-

cas se forem equivalentes na extensão de sua absorção mas não em sua taxa de absorção e podem todavia ser considerados bioequivalentes porque tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e estão refletidas na rotulagem, não são essenciais para o alcance de concentrações efetivas de fármaco no corpo, p.ex., uso crônico, e são consideradas medicamente insignificantes para o produto de fármaco particular estudado.

[0090] Em algumas modalidades, dois anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são bioequivalentes se não existirem diferenças clinicamente significativas na sua segurança, pureza e potência.

[0091] Em algumas modalidades, dois anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são bioequivalentes se um paciente puder ser trocado uma ou mais vezes entre o produto de referência e o produto biológico sem um aumento esperado no risco de efeitos adversos, incluindo uma mudança clinicamente significativa na imunogenicidade, ou eficácia diminuída, em comparação com terapia continuada sem tal troca.

[0092] Em algumas modalidades, dois anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são bioequivalentes se ambos atuarem por um mecanismo ou mecanismos de ação comuns para a condição ou condições de uso, na medida em que tais mecanismos sejam conhecidos.

[0093] A bioequivalência pode ser demonstrada por métodos *in vivo* e *in vitro*. As medidas de bioequivalência incluem, p.ex., (a) um teste *in vivo* em humanos ou outros mamíferos, no qual a concentração do anticorpo ou seus metabolitos é medida no sangue, plasma, soro ou outro fluido biológico como uma função do tempo; (b) um teste *in vitro* que foi correlacionado com e é razoavelmente preditor de dados de biodisponibilidade *in vivo* em humanos; c) um teste *in vivo* em humanos ou outros mamíferos no qual o efeito farmacológico agudo apropriado do anticorpo (ou seu alvo) é medido como uma função do

tempo; e (d) em um ensaio clínico bem controlado que estabeleça segurança, eficácia ou biodisponibilidade ou bioequivalência de um anticorpo.

[0094] As variantes bioequivalentes de anticorpos anti-PAR2 da descrição podem ser construídas, por exemplo, fazendo várias substituições de resíduos ou sequências ou deletando resíduos ou sequências terminais ou internos não necessários para a atividade biológica. Por exemplo, resíduos de cisteína não essenciais para a atividade biológica podem ser deletados ou substituídos por outros aminoácidos para prevenir a formação de pontes de dissulfeto intramoleculares desnecessárias ou incorretas após renaturação. Em outros contextos, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno bioequivalentes podem incluir variantes de anticorpos anti-PAR2 compreendendo mudanças de aminoácidos que modificam as características de glicosilação dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, p.ex., mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

[0095] A presente descrição, de acordo com certas modalidades, proporciona anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 que se ligam a PAR2 humano, mas não a PAR2 de outras espécies. A presente descrição inclui também anticorpos anti-PAR2 que se ligam a PAR2 humano e a PAR2 de uma ou mais espécies não humanas. Por exemplo, os anticorpos anti-PAR2 da descrição podem se ligar a PAR2 humano e podem se ligar ou não, conforme o caso, a um ou mais de PAR2 de camundongo, rato, porquinho-da-índia, *hamster*, gerbil, porco, gato, cão, coelho, cabra, ovelha, vaca, cavalo, camelo, macaco cinomolgo, sagui, *rhesus* ou chimpanzé. De acordo com certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno se ligam a PAR2 em células A549 humanas, células KNRK de rato, células CYNOM-K1 de macaco cinomolgo ou células LL/2 de camundongo.

[0096] A descrição engloba anticorpos monoclonais anti-PAR2 conjugados a uma fração terapêutica ("imunoconjungado"), tal como uma citotoxina, um quimioterapêutico, um imunossupressor ou um radioisótopo. Exemplos de agentes citotóxicos e agentes quimioterapêuticos adequados para formação de imunoconjungados são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, WO 05/103081).

[0097] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente descrição podem ser monoespecíficos, biespecíficos ou multiespecíficos. Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos por diferentes epitopos de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação ao antígeno específicos de mais do que um polipeptídeo alvo. Ver, p.ex., Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147: 60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22: 238-244. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 da presente descrição podem ser ligados a ou coexpressos com outra molécula funcional, p.ex., outro peptídeo ou proteína. Por exemplo, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno pode ser funcionalmente ligado (p.ex., por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, tal como outro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno para produzir um anticorpo biespecífico ou multiespecífico com uma segunda especificidade de ligação. Por exemplo, a presente descrição inclui anticorpos biespecíficos em que um braço de uma imunoglobulina é específico de PAR2 humano ou um seu fragmento e o outro braço da imunoglobulina é específico de um segundo alvo terapêutico ou está conjugado a uma fração terapêutica.

[0098] Um formato de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno biespecífico exemplificativo que pode ser usado no contexto da presente descrição envolve o uso de um primeiro domínio CH3 de imunoglobulina (Ig) e um segundo domínio CH3 de Ig, em que os pri-

meiro e segundo domínios CH3 de Ig diferem um do outro por pelo menos um aminoácido, e em que pelo menos uma diferença de aminoácido reduz a ligação do anticorpo biespecífico à Proteína A em comparação com um anticorpo biespecífico não tendo a diferença de aminoácido. Em uma modalidade, o primeiro domínio CH3 de IgG se liga à Proteína A e o segundo domínio CH3 de IgG contém uma mutação que reduz ou abole a ligação da Proteína A tal como uma modificação H95R (por numeração de exons de IMGT; H435R por numeração de EU). O segundo CH3 pode adicionalmente compreender uma modificação Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Modificações adicionais que podem ser encontradas dentro do segundo CH3 incluem: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M e V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG₁; N44S, K52N e V82I (IMGT; N384S, K392N e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG₂; e Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q e V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG₄. Variações no formato de anticorpos biespecíficos descrito acima são contempladas dentro do escopo da presente descrição.

[0099] Outros formatos biespecíficos exemplificativos que podem ser usados no contexto da presente descrição incluem, sem limitação, formatos biespecíficos à base de scFv ou de diacorpos, fusões IgG-scFv, (DVD)-Ig de domínio variável dual, Quadroma, *knobs-into-holes*, cadeia leve comum (p.ex., cadeia leve comum com *knobs-into-holes*, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)corpo, fecho de leucinas, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG de atuação dual e formatos biespecíficos de Mab<2> (ver, p.ex., Klein *et al.* 2012, *mAbs* 4: 6, 1-11 e referências citadas aí, para uma revisão dos formatos anteriores). Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno biespecíficos podem ser também construídos usando conjugação peptídeo/ácido nucleico, p.ex.,

em que aminoácidos não naturais com reatividade química ortogonal são usados para gerar conjugados anticorpo-oligonucleotídeo sítio-específicos que depois se automontam em complexos multiméricos com composição, valência e geometria definidas. (Ver, p.ex., Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: 4 dez., 2012]).

C. Ácidos Nucleicos e Sistemas de Expressão

[00100] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um ácido nucleico capaz de expressar qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui. Os ácidos nucleicos podem ser moléculas de DNA ou RNA, de fita única ou fita dupla. Em modalidades adicionais, as sequências de ácido nucleico do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno podem ser isoladas, recombinantes e/ou fundidas com uma sequência de nucleotídeos heteróloga, ou em uma biblioteca de DNA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, e/ou 791. Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636,

646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e/ou 796. Em algumas modalidades, o ácido nucleico comprehende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 1, 6, 11 e/ou 16.

[00101] Em certas modalidades, os ácidos nucleicos codificando anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno incluem também sequências de nucleotídeos que hibridam sob condições altamente estringentes com um polinucleotídeo codificando qualquer uma das sequências de nucleotídeos de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno acima mencionadas ou suas sequências complementares. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos hibridam sob condições altamente estringentes com um polinucleotídeo codificando uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, e 792. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos hibridam sob condições altamente estringentes com um polinucleotídeo codificando uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597, 607, 617, 627, 637, 647, 657, 667,

677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, e 797. Um perito na técnica entenderá prontamente que as condições de estringência apropriadas que promovem a hibridação de DNA podem ser variadas. Por exemplo se poderia realizar a hibridação a 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45 °C, seguida por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50 °C. Por exemplo, a concentração de sal no passo de lavagem pode ser selecionada de uma baixa estringência de cerca de 2,0 x SSC a 50 °C a uma elevada estringência de cerca de 0,2 x SSC a 50 °C. Adicionalmente, a temperatura no passo de lavagem pode ser aumentada de condições de baixa estringência à temperatura ambiente, cerca de 22 °C, a condições de elevada estringência a cerca de 65 °C. Tanto a temperatura como o sal podem ser variados, ou a temperatura ou concentração de sal pode ser mantida constante enquanto a outra variável é mudada. Em uma modalidade, a descrição proporciona ácidos nucleicos que hibridam sob condições de baixa estringência de 6 x SSC à temperatura ambiente seguida por uma lavagem a 2 x SSC à temperatura ambiente.

[00102] Os ácidos nucleicos isolados que diferem dos ácidos nucleicos codificando o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno devido à degenerescência no código genético estão também dentro do escopo da descrição. Por exemplo, um número de aminoácidos é designado por mais do que um triplete. Os códons que especificam o mesmo aminoácido, ou sinônimos (por exemplo, CAU e CAC são sinônimos de histidina), podem resultar em mutações "silenciosas" que não afetam a sequência de aminoácidos da proteína. No entanto é esperado que polimorfismos de sequências de DNA que levem a mudanças nas sequências de aminoácidos das proteínas em questão existirão entre células de mamífero. Um perito na técnica apreciará que estas variações em um ou mais nucleotídeos (até cerca de 3-5% dos nucleotídeos) dos ácidos nucleicos codificando uma proteína particular

podem existir entre indivíduos de uma dada espécie devido à variação alélica natural. Qualquer uma das e todas tais variações de nucleotídeos e polimorfismos de aminoácidos resultantes estão dentro do escopo desta descrição.

[00103] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um vetor compreendendo qualquer um dos ácidos nucleicos divulgados aqui. Em algumas modalidades, a descrição proporciona uma célula hospedeira compreendendo qualquer um dos vetores divulgados aqui.

[00104] Não obstante quando um anticorpo da descrição é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno de comprimento total, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da descrição podem ser recombinantemente expressos em linhas de células. Em estas modalidades, as sequências codificando anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno particulares podem ser usadas para transformação de uma célula hospedeira adequada, tal como uma célula hospedeira de mamífero ou uma célula hospedeira de levedura. e acordo com estas modalidades, a transformação pode ser alcançada usando qualquer método conhecido para introdução de polinucleotídeos em uma célula hospedeira, incluindo, por exemplo, empacotamento do polinucleotídeo em um vírus (ou em um vetor viral) e transdução de uma célula hospedeira com o vírus (ou vetor) ou por procedimentos de transfecção conhecidos na técnica. Geralmente, o procedimento de transformação usado pode depender do hospedeiro a ser transformado. Os métodos para introdução de polinucleotídeos heterólogos em células de mamífero são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, eletroporação, encapsulação do(s) polinucleotídeo(s) em lipossomos e microinjeção direta do DNA em núcleos.

[00105] De acordo com certas modalidades da descrição, uma mo-

lécula de ácido nucleico codificando a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia pesada (toda ou uma porção), uma região variável de cadeia pesada da descrição, uma região constante de cadeia leve ou uma região variável da cadeia leve da descrição é inserida em um vetor de expressão apropriado usando técnicas de ligação padrão. Em uma modalidade preferencial, a região constante de cadeia pesada ou leve é anexa ao terminal C da região variável apropriada e está ligada em um vetor de expressão. O vetor é tipicamente selecionado para ser funcional na célula hospedeira particular empregue (*i.e.*, o vetor é compatível com a maquinaria da célula hospedeira tal que a amplificação do gene e/ou expressão do gene possam ocorrer). Para uma revisão de vetores de expressão ver Goeddel (ed.), 1990, *Meth. Enzymol.* Vol. 185, Academic Press, N.Y. No contexto da expressão de anticorpos, tanto a cadeia pesada como a leve podem ser expressas a partir do mesmo vetor (p.ex., a partir dos mesmos promotores ou promotores diferentes presentes no mesmo vetor) ou as cadeias pesada e leve podem ser expressas a partir de vetores diferentes. Em certas modalidades, as cadeias pesada e leve são expressas a partir de vetores diferentes que são transfectados na mesma célula hospedeira e coexpressos. Não obstante quando as cadeias pesada e leve são expressas na mesma célula hospedeira a partir do mesmo vetor ou um vetor diferente, as cadeias podem depois se associar para formar um anticorpo (ou fragmento de anticorpo, dependendo das porções da cadeia pesada e leve sendo expressas).

[00106] Tipicamente, os vetores de expressão usados em qualquer uma das células hospedeiras conterão sequências para manutenção do plasmídeo e para clonagem e expressão de sequências de nucleotídeos exógenas. Tais sequências, coletivamente referidas como "sequências flanqueantes" em certas modalidades incluirão tipicamente uma ou mais das seguintes sequências de nucleotídeos: um promotor,

uma ou mais sequências intensificantes, uma origem de replicação, uma sequência de terminação transcripcional, uma sequência de ítron completa contendo um local de *splice* dador e aceitador, uma sequência codificando uma sequência líder para secreção de polipeptídeos, um local de ligação ao ribossomo, uma sequência de poliadenilação, uma região poliligante para inserção do ácido nucleico codificando o polipeptídeo a ser expresso e um elemento marcador selecionável. Estas porções de vetores são bem conhecidas, e existem numerosos vetores geralmente disponíveis que podem ser selecionados e usados para a expressão de proteínas. Se podem prontamente selecionar vetores com base na célula hospedeira e aplicação desejadas.

[00107] Uma origem de replicação é tipicamente uma parte daqueles vetores de expressão procariótica adquiridos comercialmente, e a origem auxilia na amplificação do vetor em uma célula hospedeira. Se o vetor de escolha não contém um local de origem de replicação, um pode ser quimicamente sintetizado com base em uma sequência conhecida e ligado ao vetor. Por exemplo, a origem de replicação do plasmídeo pBR322 (New England Biolabs, Beverly, Mass.) é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas e várias origens virais (p.ex., SV40, polioma, adenovírus, vírus da estomatite vesicular (VSV) ou papilomavírus tais como HPV ou BPV) são úteis para clonagem de vetores em células de mamífero. Geralmente, o componente de origem de replicação não é necessário para vetores de expressão de mamífero (por exemplo, a origem de SV40 é frequentemente usada somente porque contém também o promotor inicial do vírus).

[00108] Os vetores de expressão e clonagem da descrição conterão tipicamente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e operacionalmente ligado à molécula codificando a cadeia pesada e/ou leve. Os promotores são sequências não transcritas localizadas a montante (i.e., 5') do códon de partida de um gene estrutural (geral-

mente dentro de cerca de 100 a 1000 pb) que controlam a transcrição do gene estrutural. Os promotores são convencionalmente agrupados em uma de duas classes: promotores indutíveis e promotores constitutivos. Os promotores indutíveis iniciam níveis aumentados de transcrição a partir do DNA sob seu controle em resposta a alguma mudança nas condições de cultura, tal como a presença ou ausência de um nutriente ou uma mudança na temperatura. Os promotores constitutivos, por outro lado, iniciam a produção contínua de produtos de gene; isto é, existe pouco ou nenhum controle sobre a expressão de genes. Um grande número de promotores, reconhecidos por uma variedade de potenciais células hospedeiras, é bem conhecido. Um promotor adequado está operacionalmente ligado ao DNA codificando a cadeia pesada ou cadeia leve compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da descrição. Em certas modalidades, o mesmo promotor é usado para ambas as cadeias pesada e leve. Em outras modalidades, diferentes promotores (presentes no mesmo vetor ou diferentes vetores) são usados para cada uma.

[00109] Promotores adequados para uso com hospedeiros de levedura são também bem conhecidos na técnica. Intensificadores de levedura são vantajosamente usados com promotores de levedura. Promotores adequados para uso com células hospedeiras de mamífero são bem conhecidos e incluem aqueles, mas não estão limitados àqueles, obtidos a partir dos genomas de vírus tais como vírus de poliomídia, vírus da gripe de galinhas, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e, o mais preferencialmente, Vírus Símio 40 (SV40). Outros promotores de mamíferos adequados incluem promotores de mamíferos heterólogos, por exemplo, promotores de choque térmico e o promotor da actina.

[00110] Promotores adicionais que podem ter interesse incluem,

mas não estão limitados a: a região promotora inicial de SV40 (Bernouist e Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); o promotor de CMV; o promotor contido na repetição terminal longa 3' do vírus de sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22: 787-97); o promotor da timidina cinase da herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1444-45); as sequências reguladoras do gene da metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296: 39-42); vetores de expressão procariótica tais como o promotor da beta-lactamase (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-31); ou o promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25). São também de interesse as seguintes regiões de controle transcrional de animais, que exibem especificidade de tecidos e têm sido usadas em animais transgênicos: a região de controle do gene da elastase I que é ativa em células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38: 639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); a região de controle do gene da insulina que é ativada em células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); a região de controle do gene da imunoglobulina que é ativa em células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436-44); a região de controle do vírus de tumoral mamário de camundongo que é ativada em células do testículo, mama, linfóide e mastócitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45: 485-95); a região de controle do gene da albumina que é ativada no fígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); a região de controle do gene da alfa-feto-proteína que é ativa no fígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235: 53-58); a região de controle do gene da alfa 1-antitripsina que é ativada no fígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); a região de controle do gene da beta-globina que é ativada em células miel-

oides (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46: 89-94); a região de controle do gene da proteína básica mielina que é ativa em células de oligodendrócitos no cérebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48: 703-12); a região de controle do gene de cadeia leve-2 da miosina que é ativa em músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); e a região de controle do gene do hormônio liberador gonadotrópico que é ativa no hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234: 1372-78).

[00111] O vetor pode também incluir uma sequência intensificadora para aumentar a transcrição de DNA codificando cadeia leve ou cadeia pesada.

[00112] Os vetores de expressão da descrição podem ser construídos a partir de um vetor de partida tal como um vetor comercialmente disponível. Tais vetores podem ou não conter todas as sequências flanqueantes desejadas. Quando uma ou mais das sequências flanqueantes descritas aqui não estão já presentes no vetor, elas podem ser individualmente obtidas e ligadas no vetor. Métodos usados para obtenção de cada uma das sequências flanqueantes são bem conhecidos de um perito na técnica.

[00113] Após o vetor ter sido construído e uma molécula de ácido nucleico codificando a cadeia leve ou cadeia pesada ou cadeia leve e cadeia pesada compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da descrição ter sido inserida no local apropriado do vetor, o vetor completado pode ser inserido em uma célula hospedeira adequada para amplificação e/ou expressão de polipeptídeos. A transformação de um vetor de expressão em uma célula hospedeira selecionada pode ser alcançada por métodos bem conhecidos incluindo transfecção, infecção, coprecipitação com fosfato de cálcio, eletroporação, microinjeção, lipofecção, transfecção mediada por DEAE-dextrano ou outras técnicas conhecidas. O método selecionado será em parte uma

função do tipo de célula hospedeira a ser usada. Estes métodos e outros métodos adequados são bem conhecidos do trabalhador perito.

[00114] A célula hospedeira, quando cultivada sob condições apropriadas, sintetiza o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da descrição que pode subsequentemente ser coletado do meio de cultura (se a célula hospedeira o secretar para o meio) ou diretamente da célula hospedeira o produzindo (se não for secretado). A seleção de uma célula hospedeira apropriada dependerá de vários fatores, tais como níveis de expressão desejados, modificações de polipeptídeos que são desejáveis ou necessárias para a atividade (tal como glicosilação ou fosforilação) e facilidade de dobragem em uma molécula biologicamente ativa.

[00115] As linhas de células de mamíferos disponíveis para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas a, muitas linhas de células imortalizadas disponíveis a partir da American Type Culture Collection (A.T.C.C.) incluindo, mas não se limitando a células de ovário de *hamster chinês* (CHO), células HeLa, células de rim de *hamster bebê* (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p.ex., Hep G2) e um número de outras linhas de células. Em outra modalidade se pode selecionar uma linha de células a partir da linhagem de células B que não produz o seu próprio anticorpo mas tem uma capacidade de produzir e secretar um anticorpo heterólogo (p.ex., linhas de células de mieloma de camundongo NS0 e SP2/0). Em outras modalidades, uma célula sem ser uma célula de mamífero é usada, tal como uma linha de células de levedura (p.ex., *Pichia*).

[00116] Em certas modalidades, a linha de células expressa estavelmente um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da descrição. Em outras modalidades, as células expressam transientemente um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da descrição.

D. Formulacão Terapêutica e Administração

[00117] A descrição proporciona composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 da presente descrição. As composições farmacêuticas da descrição são formuladas com transportadores, excipientes e outros agentes adequados que proporcionam transferência, administração, tolerância e similares melhorados. Uma multíitude de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido de todos os químicos farmacêuticos: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, geleias, ceras, óleos, lipídeos, vesículas contendo lipídeos (catiônicos ou aniónicos) (tais como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), pastas de absorção anidras, emulsões óleo-em-água e água-em-óleo, emulsões de carbowax (polietilenoglicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos e misturas semissólidas contendo carbowax. Ver também Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52: 238-311.

[00118] A dose de anticorpo administrada a um paciente pode variar dependendo da idade e do tamanho do paciente, doença alvo, condições, via de administração e similares. A dose preferencial é tipicamente calculada de acordo com o peso corporal ou área superficial corporal. Dependendo da gravidade da condição, a frequência e a duração do tratamento podem ser ajustadas. As dosagens e horários efetivos para administração de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 podem ser determinados empiricamente; por exemplo, o progresso do paciente pode ser monitorizado por avaliação periódica, e a dose ajustada conformemente. Além do mais, o escalonamento interespécies de dosagens pode ser realizado usando métodos bem conhecidos na técnica (p.ex., Mordenti *et al.*, 1991, *Pharma-*

ceut. Res. 8: 1351).

[00119] Vários sistemas de administração são conhecidos e podem ser usados para administrar as composições farmacêuticas da descrição, p.ex., encapsulação em lipossomos, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar os vírus mutantes, endocitose mediada por receptores (ver, p.ex., Wu *et al*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Os métodos de introdução incluem, mas não estão limitados a, vias intradérmica, intratecal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural e oral. A composição pode ser administrada por qualquer via conveniente, por exemplo por infusão ou injeção de bólus, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (p.ex., mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.) e pode ser administrada em conjunto com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local.

[00120] Em algumas modalidades, os anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno têm utilidade no tratamento de condições e disfunções associadas ao sistema nervoso central e, particularmente, associadas ao cérebro. Embora vários fatores tenham de ser considerados quando se administra uma macromolécula tal como um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ao cérebro de um sujeito, *i.e.*, capacidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), o trabalhador perito está ciente de métodos de administração de tais macromoléculas ao cérebro. Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é covalentemente modificado com uma ou mais poliaminas catiônicas, tais como hexametilenodiamina ou tetrametilenodiamina de modo a aumentar a probabilidade de o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ser internalizado através da BBB. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno biespecífico,

em que o anticorpo ou fragmento visa PAR2 e também visa um receptor que facilita o transporte através da BBB (p.ex., receptor de transferrina, receptor de insulina e TMEM30A). Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é conjugado a um agente que visa um receptor que facilita o transporte através da BBB (p.ex., receptor de transferrina, receptor de insulina e TMEM30A). Em algumas modalidades, a BBB é temporariamente perturbada antes da ou durante a administração do anticorpo ou fragmento. Em algumas modalidades, a BBB é temporariamente perturbada por meio de ultrassom, radiação, tratamento bioquímico (p.ex., com um agonista de receptor de K_{Ca} tal como NS-1619) ou infusão intra-arterial de soluções hiperosmóticas concentradas.

[00121] Uma composição farmacêutica da presente descrição pode ser administrada subcutaneamente ou intravenosamente com uma agulha e seringa padrão. Adicionalmente, no que refere-se à administração subcutânea, um dispositivo de administração em caneta tem prontamente aplicações na administração de uma composição farmacêutica da presente descrição. Um tal dispositivo de administração em caneta pode ser reusável ou descartável. Um dispositivo de administração em caneta reusável utiliza um cartucho substituível que contém uma composição farmacêutica. Logo que toda a composição farmacêutica dentro do cartucho tenha sido administrada e o cartucho esteja vazio, o cartucho vazio pode ser prontamente descartado e substituído por um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de administração em caneta pode ser depois reusado. Em um dispositivo de administração em caneta descartável, não existe cartucho substituível. Ao invés, o dispositivo de administração em caneta descartável vem pré-cheio com a composição farmacêutica mantida em um reservatório dentro do dispositivo. Logo que o reservatório seja esvaziado da composição farmacêutica, o dispositivo inteiro é descar-

tado.

[00122] Numerosos dispositivos de administração em caneta e autoinjetor reusáveis têm aplicações na administração subcutânea de uma composição farmacêutica da presente descrição. Exemplos incluem, mas não estão limitados, a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), caneta DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suíça), caneta HUMALOG MIX 75/25™, caneta HUMALOG™, caneta HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhaga, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhaga, Dinamarca), caneta BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ e OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemanha), só para nomear alguns. Exemplos de dispositivos de administração em caneta descartáveis tendo aplicações na administração subcutânea de uma composição farmacêutica da presente descrição incluem a, mas não estão limitados à, caneta SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) e KWIKPEN™ (Eli Lilly), Autoinjetor SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Estugarda, Alemanha), EPIPEN (Dey, L.P.) e Caneta HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), só para nomear alguns.

[00123] Em certas situações, a composição farmacêutica pode ser administrada em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade pode ser usada uma bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201). Em outra modalidade podem ser usados materiais poliméricos; ver *Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Flórida. Ainda em outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado em proximidade do alvo da composição, requerendo assim somente uma fração da dose sistêmica (ver, p.ex., Goodson, 1984, em *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*,

vol- 2, pp. 115-138). Outros sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão por Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533.

[00124] As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagem para injeções intravenosas, subcutâneas, intratecais, intracutâneas e intramusculares, infusões por gotejamento, etc. Estas preparações injetáveis podem ser preparadas por métodos publicamente conhecidos. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas, p.ex., por dissolução, suspensão ou emulsificação de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui ou seu sal descritos acima em um meio aquoso estéril ou um meio oleoso convencionalmente usado para injeções. Como o meio aquoso para injeções existem, por exemplo, solução salina fisiológica, uma solução isotônica contendo glucose e outros agentes auxiliares, etc., que podem ser usados em combinação com um agente solubilizante apropriado tal como um álcool (p.ex., etanol), um polialcool (p.ex., propilenoglicol, polietilenoglicol), um tensoativo não iônico [p.ex., polissorbato 80, HCO-50 (aduto de polioxietileno (50 mol) de óleo de rícino hidrogenado)], etc. Como o meio oleoso são empregues, p.ex., óleo de gergelim, óleo de soja, etc., que podem ser usados em combinação com um agente solubilizante tal como benzoato de benzila, álcool de benzila, etc. A injeção assim preparada é preferencialmente cheia em uma ampola apropriada.

[00125] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para uso oral ou parenteral descritas acima são preparadas em formas de dosagem em uma dose unitária adequada para se ajustar a uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagem em uma dose unitária incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios, etc. A quantidade do anticorpo acima mencionado contida é geralmente cerca de 5 a cerca de 500 mg por forma de dosagem em uma dose unitária; especialmente na forma de injeção é

preferencial que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno acima mencionado esteja contido em cerca de 5 a cerca de 100 mg e em cerca de 10 a cerca de 250 mg para as outras formas de dosagem.

E. Usos Terapêuticos dos Anticorpos

[00126] Para qualquer um dos métodos descritos aqui, a descrição contempla o uso de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da descrição.

[00127] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método de tratamento de uma disfunção em um sujeito na qual está envolvida atividade indesejada e/ou aberrante de PAR2, compreendendo administração de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui. Como usado aqui, "disfunção", "condição" e "doença" são usados indistintamente para se referirem a qualquer uma das disfunções, condições ou doenças divulgadas aqui. Em algumas modalidades, a doença/disfunção/condição na qual está envolvida atividade indesejada e/ou aberrante de PAR2 é uma doença/disfunção/condição associada a inflamação aberrante ou indesejada. Exemplos de doenças/disfunções/condições nas quais está envolvida atividade aberrante ou indesejada de PAR2 incluem dor aguda ou crônica, coceira aguda ou crônica, inflamação aguda ou crônica (p.ex., inflamação aguda ou crônica das articulações, pulmões, cérebro, trato gastrointestinal, periodonto, pele e sistemas vasculares), disfunções autoimunes, periodontite, osteoartrite, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, artrite, psoríase, obesidade, diabetes, doença cardiovascular, pancreatite, câncer (p.ex., câncer de mama, pulmão, cólon, estômago ou próstata) asma, fibrose, úlcera gástrica, fibrose ou disfunções fibróticas, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, dermatite de contato, Doença de Crohn, colite ulcerosa, síndrome da dificuldade respiratória do adulto (ARDS), glomerulonefrite e meningite. Em algumas modalidades, a descrição proporciona métodos de tra-

tamento de um sujeito com síndrome metabólica ou uma ou mais condições associadas à síndrome metabólica, tais como deposição de gordura visceral, hipertensão, homeostase de glucose e insulina deficiente, resistência à insulina, danos endoteliais, hipertrofia cardiovascular, inflamação, inflamação vascular, aterosclerose, disfunção contrátil ventricular, fibrose e doença hepática gorda. Em modalidades particulares, a descrição proporciona métodos de tratamento da dor, p.ex., dor associada a qualquer uma das doenças/disfunções/condições divulgadas aqui (p.ex., dor osteoartrítica). Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades, o sujeito é um humano.

[00128] Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método de interferência com a interação entre uma protease (p.ex., tripsina) e PAR2, compreendendo o passo de administração de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui a uma célula. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método de inibição da exposição do ligante ligado de PAR2 em uma célula, compreendendo o passo de administração de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui a uma célula. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método de inibição da interação do ligante ligado de PAR2 e da segunda alça transmembranar da proteína PAR2, compreendendo o passo de administração de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui a uma célula. Em algumas modalidades, a descrição proporciona um método de inibição da ativação de um receptor PAR2 em uma célula, compreendendo o passo de administração de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui a uma célula. Em algumas modalidades, a célula é um neurônio (p.ex., um neurônio sensorial). Em algumas modalidades, a célula está *in vitro*. Em outras modalidades, a célula está

em um sujeito. Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades, o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito sofre de qualquer uma das disfunções divulgadas aqui.

[00129] Para qualquer um dos métodos descritos aqui, a descrição contempla a combinação de qualquer passo ou passos de um método com qualquer passo ou passos de outro método. Estes métodos envolvem administração a um indivíduo com sua necessidade de uma quantidade eficaz de um composto da descrição apropriada para a doença ou condição particular. Em modalidades específicas, estes métodos envolvem administração de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui às células de um sujeito com sua necessidade.

[00130] Os termos "tratamento", "tratando", "alívio" e similares são usados aqui para significar geralmente a obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado e podem ser também usados para se referir à melhoria, alívio e/ou diminuição da gravidade de um ou mais sintomas de uma condição sendo tratada. O efeito pode ser profilático em termos de retardamento total ou parcial do início ou recorrência de uma doença, condição, ou seus sintomas, e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença ou condição e/ou efeito adverso atribuível à doença ou condição. "Tratamento" como usado aqui abrange qualquer tratamento de uma doença ou condição de um mamífero, particularmente um humano, e inclui qualquer um ou mais de: (a) impedir que a doença ou condição ocorra em um sujeito que possa estar predisposto à doença ou condição, mas não foi ainda diagnosticado como a tendo; (b) inibir a doença ou condição (p.ex., parar o seu desenvolvimento); ou (c) aliviar a doença ou condição (p.ex., causar regressão da doença ou condição, proporcionando melhoria em um ou mais sintomas). Por exemplo, o

"tratamento" da dor (p.ex., dor osteoartrítica) envolve uma redução, paragem, alívio ou eliminação dos sintomas da dor no sujeito tratado. A população de sujeitos tratados pelo método da doença inclui sujeitos sofrendo da condição ou doença indesejável, bem como sujeitos em risco de desenvolvimento da condição ou doença.

[00131] Para qualquer um dos métodos descritos aqui, a descrição contempla o uso de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos ao longo do pedido. Adicionalmente, para qualquer um dos métodos descritos aqui, a descrição contempla a combinação de qualquer passo ou passos de um método com qualquer passo ou passos de outro método.

[00132] Em certas modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de condições associadas a qualquer uma das doenças/condições/disfunções divulgadas aqui, p.ex., dor aguda ou crônica (p.ex., dor osteoartrítica). Estes métodos envolvem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno como descritos acima. Estes métodos são particularmente visados a tratamentos terapêuticos e profiláticos de animais e, mais particularmente, humanos. A descrição contempla todas as combinações de qualquer um dos aspectos e modalidades anteriores, bem como combinações com qualquer das modalidades apresentadas na descrição detalhada e exemplos.

[00133] Pelo termo "dose terapeuticamente eficaz" se entende uma dose que produz o efeito desejado para o qual é administrado. A dose exata dependerá do propósito do tratamento e será averiguável por um perito na técnica usando técnicas conhecidas (ver, p.ex., Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[00134] Em certas modalidades, qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção pode ser

administrado sozinho ou em combinação com um ou mais compostos adicionais ou terapias para o tratamento de qualquer uma das doenças/condições/disfunções divulgadas aqui, p.ex., dor aguda ou crônica (p.ex., dor osteoartrítica). Por exemplo, qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui pode ser coadministrado em conjunção com um ou mais compostos terapêuticos. Quando é indicada coadministração, a terapia de combinação pode englobar administração simultânea ou alternante. Adicionalmente, a combinação pode englobar administração aguda ou crônica. Opcionalmente, o anticorpo/fragmento de ligação ao antígeno e compostos adicionais atuam de uma maneira aditiva ou sinérgica para tratar qualquer uma das doenças/condições/disfunções divulgadas aqui, p.ex., dor aguda ou crônica (p.ex., dor osteoartrítica). Compostos adicionais a serem usados em terapias de combinação incluem, mas não estão limitados a, moléculas pequenas, polipeptídeos, anticorpos, oligonucleotídeos antissenso e moléculas de siRNA. Em algumas modalidades, o composto adicional é qualquer um ou mais de: um fármaco anti-inflamatório, analgésico, um fármaco anti-inflamatório não esteroide (NSAID), corticoesteroide, ácido hialurônico, acetaminofeno, codeína, lorcet, lortab, vicodina, hidrocodona, morfina, oxicontina, Roxicodona, Percocet, aspirina, celecoxib, pregabalina, fusão articular, substituição de articulações, abatacept, adalimumab, anakinra, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, rituximab, tocilizumab e tofacitinib. Dependendo da natureza da terapia combinatória, a administração dos anticorpos ou divulgações de ligação ao antígeno da descrição pode ser continuada enquanto a outra terapia está sendo administrada e/ou subsequentemente. A administração dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno pode ser feita em uma dose única ou em múltiplas doses. Em alguns casos, a administração dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno é iniciada pelo menos vários dias antes da

outra terapia, enquanto, em outros casos, a administração é iniciada imediatamente antes ou aquando da administração da outra terapia. Em algumas modalidades, qualquer um dos compostos adicionais divulgados aqui é conjugado a qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno divulgados aqui.

[00135] Em outro exemplo de terapia de combinação, qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da descrição pode ser usado como parte de um regime terapêutico combinado com uma ou mais modalidades de tratamento adicionais. A título de exemplo, tais outras modalidades de tratamento incluem, mas não estão limitadas a, terapia dietética, terapia ocupacional, fisioterapia, terapia psiquiátrica, massagem, acupuntura, acupressão, auxiliares de mobilidade, animais de assistência e similares.

[00136] Nota-se que, embora os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui possam ser usados em combinação com outras terapias, em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é proporcionado a única forma de terapia. Não obstante serem administrados sozinhos ou em combinação com outras medicações ou regimes terapêuticos, a dosagem, frequência, via de administração e momento de administração dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são determinados por um médico com base na condição e necessidades do paciente.

[00137] De acordo com certas modalidades da presente descrição, múltiplas doses de um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2 (ou uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de um anticorpo anti-PAR2 e qualquer uma das terapias adicionais mencionadas aqui) podem ser administradas a um sujeito ao longo de um ciclo de tempo definido. Os métodos de acordo com este aspecto da descrição compreendem administração sequencial a um sujeito de múltiplas doses de um anticorpo ou fragmento de

ligação ao antígeno anti-PAR2 da descrição. Como usado aqui, "administração sequencial" significa que cada dose de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2 é administrada ao sujeito em um momento diferente no tempo, p.ex., em dias diferentes separados por um intervalo predeterminado (p.ex., horas, dias, semanas ou meses). A presente descrição inclui métodos que compreendem administração sequencial ao paciente de uma dose inicial única de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2, seguida por uma ou mais doses secundárias do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2 e, opcionalmente, seguida por uma ou mais doses terciárias do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2.

[00138] Os termos "dose inicial", "doses secundárias" e "doses terciárias" se referem à sequência temporal de administração do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2 da descrição. Assim, a "dose inicial" é a dose que é administrada no início do regime de tratamento (também referida como a "dose de linha de base"); as "doses secundárias" são as doses que são administradas após a dose inicial; e as "doses terciárias" são as doses que são administradas após as doses secundárias. As doses inicial, secundárias e terciárias podem todas conter a mesma quantidade de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2, mas geralmente podem diferir umas das outras em termos de frequência de administração. Em certas modalidades, no entanto, a quantidade de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno anti-PAR2 contida nas doses inicial, secundárias e/ou terciárias varia entre si (p.ex., ajustada para cima ou para baixo como apropriado) durante o ciclo de tratamento. Em certas modalidades, duas ou mais (p.ex., 2, 3, 4 ou 5) doses são administradas no início do regime de tratamento como "doses de carga" seguidas por doses subsequentes que são administradas em uma base menos frequente

(p.ex., "doses de manutenção").

F. Diagnóstico/Outros Usos dos Anticorpos ou Fragmentos de Ligação ao Antígeno

[00139] Os anticorpos anti-PAR2 da presente descrição podem ser também usados para detectar e/ou medir PAR2, ou células expressando PAR2, em uma amostra, p.ex., para propósitos de diagnóstico. Por exemplo, um anticorpo, ou seu fragmento de ligação ao antígeno, anti-PAR2 pode ser usado para diagnosticar uma condição ou doença caracterizada por expressão aberrante (p.ex., sobre-expressão, subexpressão, ausência de expressão, etc.) de PAR2. Ensaios de diagnóstico exemplificativos para PAR2 podem compreender, p.ex., contato de uma amostra obtida a partir de um paciente com um anticorpo anti-PAR2 da descrição, em que o anticorpo anti-PAR2 está marcado com um marcador detectável ou molécula repórter.

[00140] Alternativamente, um anticorpo anti-PAR2 não marcado pode ser usado em aplicações de diagnóstico em combinação com um anticorpo secundário que está ele próprio detectavelmente marcado. O marcador detectável ou molécula repórter pode ser um radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I ; uma fração fluorescente ou quimiluminescente tal como isotiocianato de fluoresceína, ou rodamina; ou uma enzima tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase, peroxidase de rábano-silvestre ou luciferase. Ensaios exemplificativos específicos que podem ser usados para detectar ou medir PAR2 em uma amostra incluem ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e separação de células ativada por fluorescência (FACS).

[00141] As composições da descrição têm numerosos usos. Por exemplo, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da descrição são úteis para estudar a distribuição preferencial de células e tecidos em células e em tecidos *in vitro* e/ou *in vivo*. Similarmente, os

anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, quer sozinhos ou conjugados a um agente heterólogo, são úteis como agentes de visualização, tal como para aplicações de diagnóstico *ex vivo* ou *in vivo*. Por exemplo, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno conjugados a uma fração radioativa são úteis para estudos de visualização *ex vivo* ou *in vivo*. Similarmente, qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da descrição são similarmente úteis.

[00142] Quando usados *in vitro*, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da descrição são adequados para identificar parceiros de ligação para o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno sendo administrado (p.ex., identificar proteínas ou peptídeos que se ligam ao anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno) e para avaliar a localização e tráfego. Similarmente, quando usados *in vivo*, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno são úteis para identificar parceiros de ligação para o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno sendo administrado (p.ex., identificar proteínas ou peptídeos que se ligam ao anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno), para avaliar a localização e tráfego, para avaliar a biodistribuição e meia-vida e para avaliar a imunogenicidade.

G. Modelos Animais/Celulares

[00143] Numerosos modelos animais são conhecidos do trabalhador perito que seriam úteis para examinar qualquer um dos anticorpos ou seus fragmentos. Ver, p.ex., Kuyinu *et al.*, 2016, *J Orthop Surg Res*, 11 (19): 10.1186/s13018-016-0346-5. Em algumas modalidades, o modelo animal é um modelo baseado em dor gerado pelo tratamento do animal com um químico, tal como monoiodoacetato de sódio (MIA) ou carragenano. Em algumas modalidades, o químico é injetado no local onde a dor é para ser induzida no animal. Em algumas modalidades, o modelo animal é um animal no qual uma lesão é introduzida pós-operativamente (p.ex., incisional), tal como transecção do liga-

mento cruzado anterior, meniscectomia ou transecção do menisco medial. Em algumas modalidades, o modelo animal é um associado a uma condição inflamatória, tal como irritação esofágica inferior, inflamação do cólon, ulceração do estômago, inflamação da bexiga urinária, inflamação do pâncreas e inflamação uterina. Ver, p.ex., os modelos animais referidos no National Research Council Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, "*Models of Pain*", 2009.

H. Estojos

[00144] Em certas modalidades, a invenção também proporciona uma embalagem farmacêutica ou estojo compreendendo um ou mais recipientes cheios com pelo menos um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da descrição. Opcionalmente associada a tal(ais) recipiente(s) pode estar uma nota na forma prescrita por uma agência governamental regulando a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, nota essa que reflete (a) aprovação pela agência da fabricação, uso ou venda para administração humana, (b) direções para uso ou ambas.

EXEMPLOS

[00145] Os seguintes exemplos são apresentados de modo a proporcionar aos peritos na técnica uma descrição e descrição completas de como preparar e usar os métodos e composições da descrição e não se destinam a limitar o escopo do que os inventores consideram como a sua descrição. Foram feitos esforços para assegurar precisão no que refere-se aos números usados (p.ex., quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros experimentais e desvios devem ser tidos em conta. A não ser que indicado de outro modo, as partes são partes em peso, o peso molecular é peso molecular médio, a temperatura é em graus Centígrados e a pressão é à ou próxima da atmosférica.

Exemplo 1: Geração de anticorpos com ligação sensível ao pH contra PAR2

Geração de proteínas PAR2 e PAR1 recombinantes humanas, de rato e cinomolgo.

[00146] Os construtos de PAR2 (Receptor Ativada por Proteína 2) humana, rato e cinomolgo (*Macaca fascicularis*) compreendendo resíduos extracelulares 1-75 foram desenhados com AviTag™ N-terminal (Avidity LLC) e Flag C-terminal e marcadores de poli Histidina e clonados no vetor pDEST12.2 OriP FH (Life Technologies). O construto de PAR1 (Receptor Ativada por Proteína 1) humana compreendendo resíduos extracelulares 1-102 foi desenhado com Flag C-terminal e marcadores de poli Histidina e clonados no vetor pDEST12.2 OriP FH (Life Technologies). Os construtos foram expressos em células HEK293 e purificados a partir dos meios usando purificação por cromatografia de afinidade e exclusão por tamanhos padrão. Para gerar proteínas biotiniladas, o AviTag™ foi biotinilado enzimaticamente de acordo com as instruções do fabricante.

Construção de bibliotecas de rastreio de histidina combinatoriais

[00147] Oligonucleotídeos de agrupamento dividido foram desenhados para introduzir histidina ou o aminoácido de tipo selvagem em cada posição da VHCDR2, VHCDR3 ou VLCDR3 de Par0067. Três bibliotecas de exibição em fagos Par0067 scFv foram subsequentemente construídas nas quais existiram 0% e 100% de resíduos de histidina em qualquer uma das VHCDR2, VHCDR3 ou VLCDR3.

Seleção de scFvs variantes de Par0067 sensíveis ao pH

[00148] As bibliotecas de rastreio de histidina combinatoriais foram sujeitas a seleções de exibição em fagos à base de anticorpos com o objetivo de se isolarem variantes de Par0067 que se ligam a PAR2 a pH 7,4 mas com ligação reduzida a pH 6,0. Para alcançar isto, quatro rodadas de seleção foram realizadas com cada biblioteca usando con-

concentrações decrescentes de PAR2 humano recombinante biotinilado (Hawkins, RE et al., 5 ag 1992; 226 (3): 889-96). Em cada ronda, os fagos foram pré-incubados durante 1 hora com esférulas paramagnéticas revestidas com estreptavidina (dynabeads®) para remover quaisquer ligantes de estreptavidina. As esférulas de estreptavidina foram subsequentemente removidas com um ímã DYNAL® e descartadas e os fagos restantes adicionados ao PAR2 humano recombinante biotinilado a pH 7,4. A seleção procedeu durante 2 horas antes da adição de esférulas paramagnéticas revestidas com estreptavidina para capturar os fagos ligados ao PAR2 humano recombinante biotinilado. As esférulas foram lavadas 5 vezes com PBS Tween (PBST) antes da eluição de scFv específico em tampão com baixo pH (pH 5,5 – pH 6,0). As partículas de scFv-fago selecionadas foram depois resgatadas como descrito previamente (Osbourne, J.K., et al. *Immunotechnology*, 2 (3): 181-96, 1996), e o processo de seleção foi repetido na presença de concentrações decrescentes de PAR2 biotinilado (1 nM – 0,05 nM ao longo de 4 rodadas).

Reformatação de scFv em IgG1-TM

[00149] Os anticorpos foram convertidos de ScFv no formato de anticorpo mutante triplo de imunoglobulina G1 completa (IgG1-TM, sequência Fc de IgG1 incorporando as mutações L234F, L235E e P331S) essencialmente como descrito em Persic et al. (1997, *Gene*, 187, 9-18) com as seguintes modificações. Um fragmento de OriP foi incluído nos vetores de expressão para facilitar o uso com células transientes de CHO e para permitir replicação episomal. O domínio pesado variável (VH) foi clonado em um vetor contendo os domínios constantes de cadeia pesada humanos e elementos reguladores para expressar cadeia pesada de IgG1-TM completa em células de mamíferos. Similarmente, o domínio leve (VL) foi clonado em um vetor para a expressão dos domínios constantes (lambda) de cadeia leve humanos

e elementos reguladores para expressar cadeia leve de IgG completa em células de mamíferos. Para se obterem IgGs, os vetores expressando IgG de cadeia pesada e leve foram transfetados em células de mamíferos transientes de CHO (Daramola *et al.* *Biotechnol Prog* 30 (1): 132-41 (2014)). As IgGs foram expressas e secretadas no meio. As coletas foram filtradas antes da purificação, depois a IgG foi purificada usando cromatografia com Proteína A. Os sobrenadantes da cultura foram carregados em uma coluna de tamanho apropriado de Proteína A Cerâmica (BioSepa) e lados com Tris-HCl a 50 mM pH 8,0, NaCl a 250 mM. A IgG ligada foi eluída da coluna usando Citrato de Sódio a 0,1 M (pH 3,0) e neutralizada pela adição de Tris-HCl (pH 9,0). O material eluído foi submetido a troca de tampões para PBS usando colunas Nap10 (Amersham, #17-0854-02) e a concentração de IgG foi determinada espectrofotometricamente usando um coeficiente de extinção baseado na sequência de aminoácidos da IgG (Mach *et al.*, *Anal. Biochem.* 200 (1): 74-80 (1992)). A IgG purificada foi analisada quanto à agregação e pureza de degradação usando SEC-HPLC e por SDS-PAGE.

Rastreio quanto a scFvs e IgGs variantes de Par0067 sensíveis ao pH
[00150] De modo a rastrear quanto a e perfilar anticorpos com potencial ligação sensível ao pH, um formato de ensaio de competição de epítopo bioquímico foi usado. O ensaio, que usou tecnologia de Fluorescência Resolvida no Tempo Homogênea (HTRFTM), foi desenhado para avaliar a capacidade dos anticorpos de teste (scFv ou IgG) de inibirem a interação da ligação de anticorpo IgG Par0067 original ao domínio extracelular (ECD) de PAR2 humano. Importantemente, o ensaio foi implementado a dois valores de pH diferentes (pH 7,4 e pH 6,0).

[00151] Ensaios paralelos a pH 7,4 e pH 6,0 (como descrito acima) foram em primeiro lugar usados para rastrear scFv não purificado em

bruto (extratos bacterianos) em um rastreio de elevada produtividade (HTS) de 384 poços de ponto único. Este formato de HTS paralelo de ponto único permitiu o rastreio de muitos 1000s de scFv de teste e aqueles anticorpos que resultaram em inibição reduzida da interação da ligação de IgG Par0067 a PAR2 humano a pH 6,0 *versus* pH 7,4 foram levados avante para caracterização adicional. Subsequentemente, a mesma abordagem de ensaio de competição de epítopo foi depois implementada em um formato de IC₅₀ de resposta à dose multipontos para testar tanto scFv purificado e IgG purificada (em este último caso, uma modificação mínima do desenho do ensaio foi requerida como apresentado na Seção C). Novamente, os ensaios foram implementados a pH 7,4 e pH 6,0, no entanto, em estas experiências, estávamos mais interessados em anticorpos de teste onde as curvas de inibição de resposta à dose mostrassem um grande desvio para a direita (*i.e.*, valor de IC₅₀ significativamente aumentado) a pH 6,0 em relação às curvas de inibição de resposta à dose correspondentes observadas a pH 7,4.

[00152] O seguinte protocolo inclui métodos para teste de ponto único de scFv não purificado em bruto e teste subsequente de scFv e IgG purificados.

Seção A: Condições de Ensaio Gerais:

Tampões de ensaio:

[00153] Os tampões de ensaio foram preparados frescos no dia de uso. Para experiências a pH 7,4, DPBS (Gibco 14190-086) foi suplementado com KF (0,4 M) (VWR, 103444T) e BSA (0,1% p/v) (PAA, K05-013) seguido por rechecagem do pH e ajuste fino até pH 7,4 como requerido. Para experiências a pH 6,0, enquanto se mantinham todos os outros componentes de tampão idênticos ao tampão do ensaio a pH 7,4 delineado acima, o tampão do ensaio a pH 6,0 foi formulado usando um tampão de base de MES a 200 mM (Sigma, M-5287)

(em posição a DPBS). Após adição de KF (0,4 M) e BSA (0,1% p/v), o tampão baseado em MES a 200 mM foi depois ajustado até pH 6,0 com HCl.

Placas de Ensaio: Os ensaios foram realizados usando placas de 384 poços ocos pretas (Fundo redondo, não ligantes) (Corning, 4514)

Volume de Ensaio: 20 µL

Incubação e Leitura da Placa: As placas de ensaio foram incubadas durante 2 hrs à TA antes da leitura usando um protocolo de leitura de HTRF™ padrão em um leitor de placas Envision.

Seção B: Teste de scFv: (Lisados bacterianos não purificados e scFv purificado)

Ordem de Adição e Componentes do Ensaio:

	Total	nsb	Teste
IgG Par0067 (x4 [final])	5 µL	5 µL	5 µL
scFv de teste (x4 [final])	-	-	5 µL
Tampão de Ensaio	5 µL	5 µL	-
ECD de Bio-humano-PAR2 (x4 [final])	5 µL	-	5 µL
Tampão de Ensaio	-	5 µL	-
Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio			
mais anti-Fc-humano marcado com XL ⁶⁶⁵ (ambos x4 [final])	5 µL	5 µL	5 µL

Preparação/Adição de IgG Par0067:

[00154] IgG Par0067 purificada não marcada (gerada internamente) foi constituída até uma concentração de 4,44 nM (1,11 nM [ensaio] final) em cada um dos dois tampões de ensaio previamente descritos na Seção A (pH 7,4 & pH 6,0). 5 µL/poço da solução de IgG Par0067 a 4,44 nM com pH apropriado foram adicionados a todos os poços da placa de ensaio relevante (pH 7,4 e pH 6,0).

Preparação/Adição de scFv de Teste:

a) Para HTS de ponto único em paralelo de amostras de scFv de lisados bacterianos não purificados em bruto a pH 7,4 e pH 6,0, amostras foram em primeiro lugar pré-diluídas até 40% da sua concentração pura usando tampão de ensaio a pH 7,4 ou pH 6,0 como apropriado. Subsequentemente, 5 µL de amostra pré-diluída até 40% foram depois transferidos para o ensaio apropriado (pH 7,4 ou pH 6,0) de modo a dar uma concentração de amostra de ensaio final de 10,0% (no volume de ensaio final de 20 µL. O scFv Par0067 original foi incluído em todas as experiências de HTS como um controle como o foram anticorpos dependentes de pH específicos à medida que esses se tornaram disponíveis (para referência).

b) Para teste de IC₅₀ de resposta à dose multipontos de anticorpo scFv purificado, amostras foram testadas a partir de um ensaio final de topo de ¼ da amostra não diluída pura (*i.e.*, nenhum passo de pré-diluição foi realizado). Diluições em série 1:3 de 11 pontos em duplo-círculo foram depois preparadas em placas Greiner de polipropileno de 384 poços em cada um dos dois tampões de ensaio (pH 7,4 & 6,0). 5 µL por poço de cada diluição em série foram transferidos a partir da placa de diluição de scFv a pH relevante para a placa de ensaio correspondente (pH 7,4 e pH 6,0). 5 µL do tampão de ensaio a pH apropriado foram adicionados aos poços totais e não específicos. O scFv purificado Par0067 original foi incluído em todas as experiências de IC₅₀ de resposta à dose multipontos como um controle como o foram scFv purificados dependentes de pH específicos à medida que esses se tornaram disponíveis (para referência). Os dados são apresentados na Tabela 1.

Preparação/Adição de ECD de PAR2 Humano Biotinilado:

[00155] O ECD de PAR2 humano biotinilado gerado internamente foi diluído em cada um dos dois tampões de ensaio (pH 7,4 & pH 6,0) para dar soluções de trabalho a 4,0 nM (concentração de ensaio final

de 1 nM). 5 µL/poço da solução de trabalho de ECD de PAR2 humano biotinilado a 4,0 nM apropriada foram depois adicionados a todos os poços da placa de ensaio correspondente (pH 7,4 e pH 6,0) com a exceção dos poços de controle de ligação negativa. 5 µL/poço do tampão de ensaio a pH apropriado foram adicionados aos poços de ligação negativa.

Preparação/Adição de Reagentes de Detecção de HTRF:

[00156] Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio (CisBio, 610SAKLB) e Anti-Fc-Humano Marcado com XL⁶⁶⁵ (CisBio, 61HFCXLB) foram cada um diluídos em cada tampão de ensaio de pH (pH 7,4 & pH 6,0) para dar soluções de trabalho combinadas às concentrações de 6,0 nM (Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio) e 40 nM (Anti-Fc-Humano Marcado com XL⁶⁶⁵). Permitindo a diluição de x4 no ensaio, isto resultou em concentrações de ensaio finais de 1,5 nM (Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio) e 10 nM (Anti-Fc-Humano Marcado com XL⁶⁶⁵). 5 µL/poço da solução de trabalho de reagente de detecção de HTRF™ combinado a pH relevante foram depois adicionados a todos os poços da placa de ensaio correspondente (pH 7,4 e pH 6,0).

Seção C: Teste de IgG Purificada:

Ordem de Adição e Componentes do Ensaio:

	Total	nsb	Teste
IgG Par0067 marcada com Dylight ⁶⁵⁰ (x4 [final])	5 µL	5 µL	5 µL
IgG de teste (x4 [final])	-	-	5 µL
Tampão de Ensaio	5 µL	5 µL	-
ECD de Bio-humano-PAR2 (x4 [final])	5 µL	-	5 µL
Tampão de Ensaio	-	5 µL	-
Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio (x4 [final])	5 µL	5 µL	5 µL

Marcação com Dylight⁶⁵⁰ de IgG Par0067:

[00157] A marcação com Dylight⁶⁵⁰ de IgG Par0067 foi realizada usando um estojo de marcação Dylight⁶⁵⁰ (Thermo Scientific Cat. No. 84536). A marcação de IgG Par0067 purificada gerada internamente foi realizada de acordo com o procedimento de marcação recomendado pelo fabricante. A concentração de IgG Par0067 marcada com Dylight⁶⁵⁰ final foi determinada como 0,56 mg/mL com uma razão de incorporação de corante média entre Dylight⁶⁵⁰ e IgG de 2,7 moles de corante/mole de IgG.

Preparação/Adição de IgG Par0067 Marcada com Dylight⁶⁵⁰:

[00158] IgG Par0067 marcada com Dylight⁶⁵⁰ (0,56 mg/mL, 3,733 nM) foi constituída até uma concentração de 4,44 nM (para dar 1,11 nM [ensaio] final) em cada um dos dois tampões de ensaio previamente descritos na seção dos materiais (pH 7,4 & pH 6,0). 5 µL/poço da solução de IgG Par0067 Dylight⁶⁵⁰ a 4,44 nM com pH apropriado foram adicionados a todos os poços da placa de ensaio relevante (pH 7,4 e pH 6,0).

Diluição em Série/Adição de IgG de Teste:

[00159] IgG Par0067 original (usada como uma referência/controle em todos os ensaios) foi pré-diluída para dar um estoque de 2000 nM em cada um dos dois tampões de ensaio a pH diferente (de modo a dar uma concentração de IgG de ensaio final de topo de 500 nM). Todas as IgG de teste, ou outra de referência/controle, foram testadas a partir de uma concentração de ensaio final de topo de ¼ da amostra não diluída pura (*i.e.*, nenhum passo de pré-diluição foi realizado). Diluições em série 1:3 de 11 pontos em duplicado foram depois preparadas em placas Greiner de polipropileno de 384 poços em cada um dos dois tampões de ensaio (pH 7,4 & 6,0). 5 µL foram transferidos a partir da placa de diluição de IgG a pH relevante para a placa de ensaio correspondente (pH 7,4 e pH 6,0). 5 µL do tampão de ensaio a pH apro-

priado foram adicionados aos poços totais e não específicos.

Preparação/Adição de ECD de PAR2 Humano Biotinilado:

[00160] O ECD de PAR2 humano biotinilado gerado internamente foi diluído em cada um dos dois tampões de ensaio (pH 7,4 & pH 6,0) para dar soluções de trabalho a 4,0 nM (concentração de ensaio final de 1 nM). 5 µL/poço da solução de trabalho de ECD de PAR2 humano biotinilado a 4,0 nM apropriada foram depois adicionados a todos os poços da placa de ensaio correspondente (pH 7,4 e pH 6,0) com a exceção dos poços de controle de ligação negativa. 5 µL/poço do tampão de ensaio a pH apropriado foram adicionados aos poços de ligação negativa.

Preparação/Adição de Reagentes de Detecção de HTRF:

[00161] Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio (CisBio, 610SAKLB) foi diluída com cada tampão de ensaio de pH (pH 7,4 & pH 6,0) para dar soluções de trabalho a uma concentração de 6,0 nM. Permitindo uma diluição de x4 no ensaio, isto resultou em uma concentração de Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio de ensaio final de 1,5 nM. 5 µL/poço da solução de trabalho de Estreptavidina Marcada com Criptato de Európio a pH relevante foram depois adicionados a todos os poços da placa de ensaio correspondente (pH 7,4 e pH 6,0).

Seção D: Análise de Dados:

[00162] As contagens a 665 nm e 620 nm foram em primeiro lugar convertidas em valores de razão 665/620. Delta F (%) foi depois calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Delta F (\%)} = ((\text{razão de amostras} - \text{razão negativa})/\text{razão negativa}) * 100$$

[00163] Os valores de razão negativa foram calculados na ausência de IgG Par0067 a partir de poços de controle de ligação negativa relevantes.

[00164] A % de Ligação Específica foi depois calculada usando a seguinte equação:

% de Ligação Específica ={(% de Delta F da Amostra – % de Delta F de Ligação Negativa)/(% de Delta F de Ligação Total – % de Delta F de Ligação Negativa)} * 100

[00165] Para a HTS de ponto único, a % de Ligação Específica a pH 6,0 versus pH 7,4 foi representada graficamente nos eixos x e y, respectivamente, de modo a visualizar a distribuição de scFv com inibição reduzida (% de Ligação Específica mais elevada) a pH 6,0 em relação a pH 7,4.

[00166] Para as curvas de resposta à dose multipontos, os valores da % de Ligação Específica foram representados graficamente versus concentração de anticorpo purificado de teste (scFv ou IgG). Os valores de IC₅₀ foram determinados através de um ajuste de curva de declive variável de inibição de resposta à dose sigmoidal (equação logística de 4 parâmetros) usando Software Graphpad Prism.

TABELA 1

Clone (IgG)	Ensaio de Competição de Epítopo Par0067			
	IC ₅₀ a pH 7,4 (nM)	IC ₅₀ a pH 6,0 (nM)	Variante: Vezes IC ₅₀ (pH 6,0 v pH 7,4)	Vezes IC ₅₀ pH 7,4 (Variante v Par0067)
Par0067	3,3	3,6	1,1	1,0
PaB670010	15,4	41,8	2,7	4,7
PaB670020	5,6	18,5	3,3	1,7
PaB670034	5,6	14,2	2,5	1,7
PaB670045	9,8	72,5	7,4	3,0
PaB670048	14,5	139,4	9,6	4,4
PaB670064	67,1	289,9	4,3	20,3
PaB670066	52,2	486,9	9,3	15,8
PaB670067	14,4	113,2	7,9	4,4
PaB670068	77,8	447,6	5,8	23,6
PaB670070	60,4	270,0	4,5	18,3
PaB670071	101,2	424,8	4,2	30,7
PaB670073	72,1	428,3	5,9	21,8
PaB670075	101,8	603,0	5,9	30,8

Clone (IgG)	Ensaio de Competição de Epítopo <i>Par0067</i>			
	IC ₅₀ a pH 7,4 (nM)	IC ₅₀ a pH 6,0 (nM)	Variante: Vezes IC ₅₀ (pH 6,0 v pH 7,4)	Vezes IC ₅₀ pH 7,4 (Variante v Par0067)
PaB670076	46,2	291,8	6,3	14,0
PaB670077	55,4	619,9	11,2	16,8
PaB670078	33,3	319,2	9,6	10,1
PaB670079	44,2	489,8	11,1	13,4
PaB670080	16,6	158,1	9,5	5,0
PaB670081	51,4	260,0	5,1	15,6
PaB670082	25,4	77,9	3,1	7,7
PaB670083	45,2	151,8	3,4	13,7
PaB670084	54,5	282,7	5,2	16,5
PaB670085	48,1	154,7	3,2	14,6
PaB670087	40,9	130,7	3,2	12,4
PaB670088	29,8	114,7	3,8	9,0
PaB670089	29,9	134,0	4,5	9,1
PaB670090	22,6	85,5	3,8	6,8
PaB670091	25,2	98,9	3,9	7,6
PaB670092	41,1	193,5	4,7	12,5
PaB670093	18,6	58,7	3,2	5,6
PaB670094	72,5	236,8	3,3	22,0
PaB670095	20,0	113,2	5,7	6,1
PaB670097	21,8	77,9	3,6	6,6
PaB670098	65,9	210,3	3,2	20,0
PaB670099	12,9	62,4	4,8	3,9
PaB670100	20,3	69,0	3,4	6,2
PaB670101	146,9	496,5	3,4	44,5
PaB670102	5,3	13,7	2,6	1,6
PaB670103	27,9	203,5	7,3	8,5
PaB670104	21,7	202,2	9,3	6,6
PaB670105	74,4	495,5	6,7	22,5
PaB670106	312,8	1188,0	3,8	94,8
PaB670107	42,7	463,9	10,9	12,9
PaB670108	29,1	148,6	5,1	8,8

Recombinação de múltiplas histidinas em um único scFv

[00167] Os resíduos de histidina de scFv que demonstraram ligação dependente de pH no ensaio de ligação de competição de epítopo Par0067 foram recombinados usando mutagênese sítio-dirigida (Rei-

kofski J e Tao BY, 1992, *Biotechnol Adv*, 10 (4): 535-547). Os scFv resultantes que continham histidinas em duas CDRs diferentes foram retestados no ensaio de ligação de competição como mutante triplo de imunoglobulina G1 inteira (IgG1-TM) (Tabela 2) para identificar variantes com melhorias adicionais na ligação dependente de pH em comparação com o anticorpo original, Par0067.

[00168] Os alinhamentos de sequências para cada um dos clones modificados por histidina em comparação com as sequências de CDR do anticorpo Par0067 é proporcionado nas Figuras 1A-1B e 2A-2B.

TABELA 2

Clone (IgG)	Ensaio de Competição de Epitopo <i>Par0067</i>			
	IC ₅₀ a pH 7,4 (nM)	IC ₅₀ a pH 6,0 (nM)	Variante: Vezes IC ₅₀ (pH 6,0 v pH 7,4)	Vezes IC ₅₀ pH 7,4 (Variante v Par0067)
Par0067	0,835	0,790	0,95	1,00
PaB670045	2,9	25,8	8,9	3,5
PaB670048	5,7	48,2	8,5	6,8
PaB670128	32,8	IC	ND	39,3
PaB670129	56,1	IC	ND	67,2
PaB670084	10,3	64,6	6,3	12,3
PaB670141	2,4	13,9	5,9	2,8
PaB670142	4,8	67,1	14,0	5,7
PaB670143	3,4	40,0	11,8	4,0
PaB670144	29,0	564,8	19,5	34,7
PaB670146	91,9	784,3	8,5	110,1
PaB670148	48,5	844,6	17,4	58,1
PaB670149	504,9	IC	ND	604,7
PaB670151	69,5	796,0	11,5	83,2
PaB670152	438,8	6604,0	15,1	525,5
PaB670153	93,0	1639,0	17,6	111,4
PaB670156	7,0	190,0	27,2	8,4
PaB670157	15,8	932,4	59,0	18,9
PaB670158	6,8	477,0	69,8	8,2
PaB670159	161,0	IC	ND	192,8
PaB670160	16,9	634,3	37,5	20,2
PaB670161	47,9	1899,0	39,6	57,4
PaB670162	11,4	906,2	79,5	13,7
PaB670163	145,1	IC	ND	173,8

IC = Curva Incompleta; ND = Não Demonstrado

Afinidade de Fabs anti-PAR2 por PAR2 humano, de rato e cinomolgo como determinada por BIACORE™

[00169] Fragmentos de ligação ao antígeno (Fabs) dos anticorpos anti-PAR2 foram expressos (Spooner J. et al. (2015) *Biotechnol Bioeng.* 112: 1472-7) e a afinidade por PAR2 recombinante de várias espécies (humano, rato e cinomolgo) determinada por Biacore.

Análise de Afinidade Biacore

[00170] A afinidade dos Fabs anti-PAR2 foi medida usando o Biacore T100 a 25 °C a vários pHs (pH 7,4, pH 6,0 e pH 5,6). As experiências foram levadas a cabo usando PAR2 recombinante humano, de rato e cinomolgo com um marcador Avi N-terminal e marcadores Flag-His C-terminais.

[00171] A estreptavidina foi covalentemente immobilizada em uma superfície de *chip* C1 usando técnicas de acoplamento de amina a uma concentração de 4 µg/mL em Acetato de sódio a 10 mM pH 4,5. Uma superfície de estreptavidina final de aproximadamente 30-100 RUs foi alcançada. Espécies de PAR2 biotinilada recombinante (produzida internamente) foram tituladas na superfície do *chip* de estreptavidina a 4 µg/mL em tampão HBS-EP+ para permitir ligação de Fab em saturação (R_{\max}). Este baixo nível de ligação de analito assegurou efeitos mínimos de transporte de massa.

[00172] Os Fabs anti-PAR2 Fabs foram diluídos em série (0,39 nM-25 nM) em tampão HBS-EP+ pH 7,4 ou tampão MES-BS-EP+ pH 6,0 ou em tampão MES-BS-EP+ pH 5,6 e fluíram sobre o *chip* a 50 µL/min, com associação de 3 minutos e dissociação até 30 minutos. Múltiplas injeções somente com tampão foram feitas sob as mesmas condições para permitir a subtração da dupla referência dos conjuntos de sensorgramas finais, que foram analisados usando o software Bi-Eval (versão 2.0.1). A superfície do *chip* foi totalmente regenerada

com pulsos de MgCl₂ a 4 M.

[00173] Os resultados de afinidade BiaCore para clones selecionados são proporcionados em baixo nas Tabelas 3-13.

Tabela 3: Fab. Par0067

pH	Espécies	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	6,66 E+6	4,96 E-5	7,5	50,1
6,0	Humano	3,12 E+6	9,72 E-5	31,2	39,3
7,4	Rato	5,16 E+6	1,94 E-4	37,6	111
6,0	Rato	3,21 E+6	5,44 E-4	170	100

Tabela 4: Fab. PaB670048

pH	Espécies	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	4,20 E+6	5,19 E-4	124	69,0
6,0	Humano	1,94 E+6	4,97 E-3	2569	58,3
7,4	Rato	5,24 E+6	3,07 E-3	586	124,7
6,0	Rato	4,00 E+6	2,05 E-2	5120	105,2

Tabela 5: Fab. PaB670084

pH	Espécies	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	6,49 E+6	1,62 E-3	250	68,4
6,0	Humano	1,73 E+6	7,63 E-3	4,410	104,6
7,4	Rato	6,83 E+6	8,37 E-3	1226	97,6
6,0	Rato	2,57 E+6	2,77 E-2	10,800	91,97

Tabela 6: Fab. PaB670076

pH	Espécies	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	5,84 E+6	1,21 E-3	207	63,5
6,0	Humano	1,11 E+6	5,14 E-3	4,611	99,51
7,4	Rato	6,34 E+6	1,07 E-2	1,689	87,9
6,0	Rato	1,66 E+6	5,10 E-2	30,730	82,61

Tabela 7: Fab. PaB670120

pH	Espécies	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	5,54 E+6	1,37 E-3	247	61,62
6,0	Humano	3,48 E+6	2,10 E-2	6,047	94,67
7,4	Rato	5,62 E+6	1,46 E-2	2,606	84,23
6,0	Rato	8,26 E+6	0,281	34,040	73,35

Tabela 8: Fab. PaB670128

pH	Espécies	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	5,95 E+6	3,65 E-3	613	59,57
6,0	Humano	2,22 E+6	4,57 E-2	20,062	79,4
7,4	Rato	6,49 E+6	1,96 E-2	3,023	80,86
6,0	Rato	1,79 E+6	6,89 E-2	38,520	63,26

Tabela 9: Fab. PaB670048

pH	Espécies	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	5,59 E+6	5,80 E-4	104	58,53
6,0	Humano	1,84 E+6	4,58 E-3	2,488	93,02
7,4	Rato	7,46 E+6	3,25 E-3	435	81,2
6,0	Rato	4,84 E+6	2,17 E-2	4,483	80,14

Tabela 10: Fab. PaB670129

pH	Espécies	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	8,20 E+6	5,04 E-3	614	54,98
6,0	Humano	1,59 E+6	5,54 E-2	34,840	76,02
7,4	Rato	8,82 E+6	2,63 E-2	2,979	73,16
6,0	Rato	1,45 E+6	8,41 E-2	57,910	67,27

Tabela 11: Fab. PaB670136

pH	Espécies	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	5,17 E+6	4,95 E-3	957	50,27
6,0	Humano	7,92 E+8	14,9	18,840	67,97
7,4	Rato	7,57 E+6	3,14 E-2	4,149	73,24
6,0	Rato	1,57 E+6	5,89 E-2	37,550	47,7

Tabela 12: Fab. PaB670103

pH	Espécies	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	3,52 E+6	1,11 E-4	32,5	46,3
6,0	Humano	3,36 E+5	6,07 E-4	1,805	70,66
7,4	Rato	3,04 E+6	5,58 E-4	184	74,2
6,0	Rato	5,31 E+5	5,42 E-3	10,200	69,58

Tabela 13: Fab PaB670129 a 3 pHs diferentes.

pH	Espécies	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)	$R_{máx}$
7,4	Humano	7,14 E+6	5,34 E-3	747,8	75,9
		6,81 E+6	5,30 E-3	778,0	66,5
6,0	Humano	1,56 E+6	5,76 E-2	36,910	58,1
		3,26 E+6	0,109	33,500	48,4
5,6	Humano	1,33 E+6	0,112	84,550	42,5
7,4	Cinomolgo	6,67 E+6	2,23 E-3	333,3	59,7
		6,59 E+6	2,21 E-3	335,0	51,9
6,0	Cinomolgo	2,14 E+6	2,75 E-2	12,840	49,6
		1,74 E+6	2,36 E-2	13,560	44,2
5,6	Cinomolgo	3,66 E+6	0,139	37,840	41,3

Exemplo 2: Ensaio de Atividade de PAR2 e PAR1 à Base de Células

[00174] Células A549 humanas, células KNRK de rato, LL/2 de camundongo ou CYNOM-K1 de cinomolgo expressando PAR2 endógeno, ou células 1321N1-hPAR2-cl8 humanas sobre-expressando PAR2 humano, foram inoculadas a 5,000 (humano, cino) ou 7,000 (camundongo, rato) células por poço em Placas de Cultura de Tecidos revestidas com PDL (Greiner Bio-One). As células foram carregadas com o co-rante de Cálcio Fluo-Screen Quest™ Fluo-8 No Wash (AAT Bioquest, Inc). As células foram pré-tratadas com IgGs ou Fabs diluídos em tampão de ensaio (HBSS, BSA a 0,1%, HEPES a 20 mM) durante 1 h à temperatura ambiente. Para os ensaios em camundongo e cino, as células foram pré-tratadas com trombina a 0,5 nM ou 10 nM, respecti-

vamente, para dessensibilizar a atividade de PAR1. As respostas de cálcio a PAR2 à tripsina a 11 nM (humano), 400 nM (camundongo) ou 80 nM (rato, cíno) (Polymun) foram medidas em um Leitor de Placas de Visualização Fluorescente (FLIPR) Tetra (Molecular Devices). Para se determinar a atividade funcional contra PAR1 humana, as respostas de cálcio conduzidas por trombina na linha de células A549 humanas foram determinadas também no FLIPR tetra e em estes ensaios IgGs anti-PAR1 neutralizantes WEDE15 (Beckman Coulter) e ATAP2 (Life Technologies) foram usadas como controles positivos. Para se determinar a atividade funcional contra diversas proteases, células 1321N1-hPAR2-cl8 sobre-expressando PAR2 humano foram pré-tratadas com PaB670129, antes da estimulação da liberação de cálcio com tripsina a 0,5 nM, triptase a 500 nM ou matriptase a 1 nM. As medições de fluorescência foram medidas antes da, durante a e após a adição de protease e as RFU de pico calculadas por pico. A % de respostas (em relação à protease sozinha) foi calculada contra a concentração de anticorpo e as IC₅₀s determinadas usando software GraphPad Prism.

[00175] Os resultados de células de humano, macaco cinomolgo, rato e camundongo em estes ensaios são proporcionados na Figura 3 (A, B, C e D, respectivamente), as IC₅₀s de PAR2 calculadas na Figura 3E e Figura 6 (dados de especificidade de PAR1). Os cálculos de IC₅₀ demonstram que PaB670129 inibe potenteamente as respostas de cálcio de PAR2 induzidas por tripsina em células de humano, camundongo, rato e macaco cinomolgo expressando PAR2 (Figura 3E). Além do mais, em células A549 humanas, a ativação de PAR1 induzida por trombina não é inibida por PaB670129 mas pode ser efetivamente bloqueada pelos anticorpos monoclonais Vorapaxar e anti-PAR1 (Figura 6). Estes dados demonstram que PaB670129 é um antagonista potente e específico de PAR2. A aplicação de PaB670129 sozinho a células expressando PAR2 não tem efeito nos níveis basais de cálcio celular,

demonstrando que PaB670129 não tem qualquer atividade agonista em PAR2 (Figura 4A). Além do mais, PaB670129 antagoniza potente-mente as respostas provocadas por PAR2 a diversas proteases inclu-indo tripsina, triptase e matriptase (Figura 4B).

Ensaio de Cálcio de PAR2 Glial-neuronal de DRG Primários

[00176] Culturas dissociadas de gânglios radiculares dorsais de cri-as de ratos Sprague dawley (DRG) foram preparadas e cultivadas em laminina e Placas de Cultura de Tecido revestidas com PDL (Greiner Bio-One). As placas foram incubadas a 37 graus durante 24-72 horas antes do uso no ensaio. As células foram carregadas com corante Fura-2 cálcio a 2 μ M (Life Technologies). As células foram incubadas em tampão de visualização (HBSS, HEPES a 20 mM, Sulfinpirazona a 0,1 mM, antagonista de PAR1 Vorapaxar a 10 μ M) contendo anticorpos contra PAR2 a 20 nM. O cálcio intracelular foi depois quantificado por visualização radiométrica Fura-2 em um microscópio Olympus IX81 equipado com uma lâmpada em arco de Xênon excitando a 340 e 380 nm em resposta à aplicação dos agonistas trombina (Sigma) e matriptase (R&D Systems), peptídeo ativante de PAR2 LIGRLO (SEQ ID NO: 832) (Peptides International) e elevado potássio extracelular (50 mM). O número de neurônios *versus* glia foi calculado por campo de vista (neurônios definidos como mostrando resposta a elevado potássico). Os neurônios e glia sensíveis à matriptase totais foram depois calculados por campo de vista. Os resultados do ensaio de cálcio são propor-cionados nas Figuras 5A-F e ilustram que o anticorpo PaB670129 re-duziu efetivamente a sensibilidade à matriptase em células neuronais DRG (Figuras 5A-C) e não neuronais (Figuras 5D-F).

Exemplo 3: Efeitos de um Anticorpo Anti-PAR2 em um Modelo de Rato de Dor articular inflamatória

[00177] A administração intra-articular de Iodoacetato Monossódico (MIA) no joelho ipsilateral de ratos Sprague Dawley leva ao desenvol-

vimento de uma hiperalgesia robusta e duradoura e alodinia associada inicialmente a uma resposta inflamatória. Se acredita que o desenvolvimento destes sinais em este modelo animal seja clinicamente relevante; refletindo os sintomas exibidos por pacientes apresentando dor inflamatória crônica associada a condições subjacentes tais como osteoartrite (OA) ou artrite reumatoide (Bove *et al.*, 2003; Fernihough *et al.*, 2004; Kalbhen 1987). Foi previamente demonstrado que (usando o suporte de peso como um ponto final) a evolução temporal da hiperalgesia induzida por MIA segue um padrão bifásico com um componente inicial, predominantemente inflamatório, que é sensível a Cox-2; e marcadamente reduzido pelo padrão de ouro Celecoxib. Esta fase inflamatória inicial dá lugar a um fenótipo de dor mais crônica que é sensível à Pregabalina (PGB) e insensível ao Celecoxib sugerindo um componente do tipo mais neuropático subjacente.

[00178] *Suporte de peso:* Os ratos sem tratamento distribuem o seu peso corporal igualmente entre as duas patas posteriores. No entanto, quando o joelho posterior injetado (esquerdo) está inflamado e/ou dolorido, o peso é redistribuído tal que menos peso seja colocado no membro afetado (diminuição no suporte de peso no membro lesionado). O suporte de peso através de cada membro posterior é medido usando um testador de incapacidade de rato (Linton Instruments, RU).

[00179] Ratos Sprague Dawley foram colocados no testador de incapacidade com as patas traseiras em sensores separados e a força média exercida por ambos os membros posteriores foi registrada ao longo de 4 segundos.

[00180] *Procedimento:* Após entrega, os ratos foram submetidos a um período mínimo de habituação de 7 dias antes do início do estudo. Os ratos sem tratamento foram aclimatizados à câmara de procedimento nas suas gaiolas caseiras, com alimento e água disponíveis ad

libitum. As habituações à câmara de suporte de peso foram realizadas ao longo de vários dias. As leituras de suporte de peso da linha de base foram tiradas no dia final.

[00181] No Dia 0, após leitura da linha de base final, os animais foram anestesiados usando isoflurano e oxigênio misturados 3:1 em condições estéreis. A área do joelho esquerdo foi raspada e limpa com uma solução diluída de hibiscrub.

[00182] A osteoartrite (OA) foi induzida por injeção de solução de MIA (Sigma, I2512), 25 μ L de 80 mg/mL (2 mg) na articulação do joelho da pata posterior esquerda. Os animais de controle foram injetados com solução salina. Foi permitido que os animais recuperassem em um ambiente aquecido, antes de serem devolvidos à sua gaiola caseira.

[00183] Os animais desenvolvem uma resposta inflamatória pós-MIA e podem proteger e lamber a área afetada. Os ratos foram, portanto, cuidadosamente monitorizados quanto a sinais inesperados de sofrimento ou dor severa, tal que qualquer animal exibindo tais sinais poderia ser sacrificado imediatamente.

[00184] Os animais foram pesados diariamente durante a primeira semana e dois a cada dos dias depois. O suporte de peso foi avaliado nos Dias 3, 7, 10 & 14, após injeção de MIA, quanto ao desenvolvimento de dor crônica. No dia 18 foram realizadas medições de suporte de peso e os animais foram classificados e randomizados para grupos de tratamento de acordo com sua janela de MIA em um desenho quadrado latino.

[00185] *Regime de dosagem de anticorpos:* Os animais foram tratados com Par0067 (PAR2+ve) 10 mg/kg ou controle de isotipo (PAR2-ve) 10 mg/kg i.v. no dia 18 e medições de suporte de peso adicionais foram realizadas 4 horas e 1, 2, 6, 8, 10 & 14 dias pós-dosagem de anticorpos.

[00186] *Regime de dosagem de Pregabalina & Celecoxib:* Os animais foram doseados com PGB (30 mg/kg p.o; 2 mL/kg) ou Celecoxib (50 mg/kg p.o; 2 mL/kg) diariamente nos dias 24, 25, 26, 27 e 28 pós-injeção de MIA. As avaliações de suporte de peso foram realizadas 1 hr pós-dosagem nos dias 24, 26 e 28 e uma leitura adicional foi realizada pós-cessação do tratamento com fármaco no dia 32.

[00187] No dia 1, 2, 6, 10 e 14 pós-dosagem, após avaliação de suporte de peso, 400 µL de sangue foram retirados através da veia da cauda para análise pk de grupos tratados com Anticorpo e Controle de Isotipo (n = 5/grupo).

[00188] *Avaliação do Estudo:* As leituras de suporte de peso (g) foram realizadas para ambas as patas posteriores direitas e esquerdas e a diferença calculada. Os dados são expressos como de % de razão ipsilateral/contralateral $((WB\ esquerda/WB\ direita)*100)$ (média \pm s.e.m.).

[00189] *Cálculo:* Leitura ipsilateral/leitura contralateral x 100. A diferença de WB sem tratamento – diferença de WB pré-dose foi definida como a janela de MIA.

[00190] *Análise estatística:* ANOVA com medições repetidas seguida por teste de comparação planeada usando InVivoStat (invivostat.co.uk), (p<0,05 considerado significativo). Os dados foram analisados por comparação de grupos de tratamento com grupo de controle com veículo em cada ponto temporal.

[00191] A injeção de 2 mg de MIA na articulação do joelho causou uma resposta de inflamação e hipersensibilidade marcada aparente a partir do dia 3 como detectada por um desvio no suporte de peso entre patas posteriores lesionadas e não lesionadas. Esta resposta de hiperatividade induzida por MIA era ainda evidente em todos os grupos até ao dia 18 (e para além para animais de controle tratados com veículo), momento em que os primeiros agentes de teste foram administrados.

A injeção de solução salina não teve efeito no suporte de peso.

[00192] Como demonstrado na Figura 7A, uma reversão significativa e marcada da hipersensibilidade foi vista após administração diária de Pregabalina (30 mg/kg) a partir do dia 24-28 com um efeito residual fraco ainda aparente após cessação prévia de tratamento no dia 32. Em contraste, a administração diária de Celecoxib (50 mg/kg) a partir do dia 24-28 mostrou no máximo uma reversão somente fraca de hipersensibilidade. Este perfil farmacológico sugere que a hiperatividade observada durante esta fase da resposta a MIA tem natureza predominantemente neuropática, ao invés de inflamatória.

[00193] Como também demonstrado na Figura 7A, uma reversão significativa de hipersensibilidade foi vista com Par0067 a partir das 4 horas pós-dose, até ao dia 28 (10 dias pós-dose). Não foi visto nenhum efeito com Controle de Isótipo durante o mesmo período de tempo. A Figura 7B ilustra o efeito de tratamento com diferentes concentrações de Par0067.

Exemplo 4: O Efeito do anticorpo contra PAR2, PaB670129, na Reversão da Ligação Parcial de Nervos - Hiperalgesia Mecânica Induzida em Camundongos C57BL/6 Fêmeas

Introdução

[00194] A ligação parcial do nervo ciático (PNL) como descrito por Seltzer (1990) é um de um número de modelos de ligação de nervos que são relatados como servindo como modelos pré-clínicos de dor neuropática. Produz uma hiperalgesia mecânica profunda que pode ser medida usando um analgesímetro como descrito por Randall e Selitto (1957). Este exemplo descreve os efeitos da administração do anticorpo anti-PAR2, PaB670129, na hiperalgesia em este modelo de lesão nervosa/dor neuropática.

Procedimento

[00195] Sessenta camundongos C57BL/6 fêmeas foram submetidos

a inserção de transpondedores para propósitos de identificação pelo menos 5 dias antes do início do estudo. A hiperalgesia mecânica foi determinada usando um analgesímetro (Randall & Selitto 1957) (Ugo Basile). Foi aplicada uma força crescente à superfície dorsal de cada pata traseira de cada vez até ter sido observada uma resposta de retirada. A aplicação de força foi parada em este momento e o peso em gramas registrado. Os dados foram expressos como limiar de exclusão de retirada em gramas para as patas ipsilaterais e contralaterais. Após o estabelecimento de leituras de linha de base, os camundongos foram divididos em 2 grupos com razões ipsilateral/contralateral aproximadamente iguais que foram submetidas a cirurgia para ligar parcialmente o nervo ciático ou serviram como controles pseudo-operados. Os camundongos operados foram anestesiados com isoflurano. Após isto, aproximadamente 1 cm do nervo ciático esquerdo foi exposto por disseção mitigada através de uma incisão ao nível do meio da coxa. Uma sutura (8/0 Virgin Silk: Ethicon) foi depois passada através da terceira dorsal do nervo e apertada firmemente. A incisão foi depois fechada usando cola e foi permitido que os camundongos recuperassem durante pelo menos seis dias antes do início do teste. Os camundongos pseudo-operados foram submetidos ao mesmo protocolo mas, após exposição do nervo, os camundongos foram suturados e foi permitido que recuperassem.

[00196] Os camundongos foram testados quanto ao início da hiperalgesia aos dias 7 e 10 pós-cirurgia. Quaisquer camundongos mostrando uma razão ipsilateral/contralateral de mais do que 80% foram classificados como não respondedores e removidos do estudo. Após teste ao dia 10, os camundongos foram adicionalmente subdivididos em grupos dando os grupos de tratamento finais:

A. Grupo 1: Pseudo-operados + Controle de isotipo 10 mg/kg s.c (N = 10)

B. Grupo 2: Com ligação de nervos + Controle de isotipo 10 mg/kg s.c (N = 9)

C. Grupo 3: Com ligação de nervos + Etanercept 0,3 mg/kg s.c. (N = 9)

D. Grupo 4: Com ligação de nervos + PaB670129 3 mg/kg s.c. (N = 9)

E. Grupo 5: Com ligação de nervos + PaB670129 10 mg/kg s.c. (N = 9)

F. Grupo 6: Com ligação de nervos + PaB670129 50 mg/kg s.c. (N = 9)

[00197] Foi administrado aos camundongos controle ou moléculas de teste diluídas em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) no dia 13 e estes foram retestados quanto a mudanças na hiperalgesia mecânica às 4 horas pós-dose e também aos 1, 2, 4 e 7 dias pós-dose.

Análise de Dados

[00198] Leituras ipsilaterais e contralaterais foram realizadas para cada animal em cada momento de teste. O suporte de peso através dos membros posteriores ipsilaterais e contralaterais foi expressa como uma razão e os dados de grupo foram analisados (PRISM) usando ANOVA de 2 vias e comparações par a par, onde apropriado, foram feitas usando teste de Tukey.

Resultados

[00199] A ligação parcial do nervo ciático causou uma hiperalgesia mecânica que se manifestou como uma redução significativa na razão ipsilateral/contralateral no dia 7 e 10 quando comparada com controles pseudo-operados. Após tratamento com controle de isotipo, os camundongos operados não mostraram qualquer mudança no nível de hiperalgesia mecânica a partir dos níveis pré-dose indicando uma ausência de efeito. A administração do padrão de ouro interno, etaner-

cept (0,3 mg/kg s.c.), causou uma reversão significativa da hiperalgesia a partir das 4 horas até 7 dias pós-dose de acordo com os resultados vistos em estudos prévios. PaB670129 causou uma reversão da razão ipsilateral/contralateral de um modo relacionado com a dose com efeitos de pico sendo vistos tanto a 10 mg/kg como a 50 mg/kg. A dose mais baixa de 3 mg/kg, embora significativa aos 1, 2 e 7 dias pós-dose, mostrou um efeito menor (ver Figura 8).

[00200] A ligação parcial do nervo ciático induziu uma hiperalgesia mecânica duradoura consistente com resultados previamente relatados. Sem desejar estar limitado pela teoria se acredita que isto sirva como uma correlação pré-clínica da dor observada na dor neuropática. A administração de PaB670129 mostrou uma reversão significativa e relacionada com a dose desta hiperalgesia indicando um uso potencial de anticorpos contra PAR2 no tratamento da dor neuropática.

Bibliografia:

- Persic, L. et al. *An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries.* Gene 187, 9-18 (1997).
- Reikofski J e Tao BY (1992) *Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis.* Biotechnol Adv, 10 (4): 535-547.
- Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, et al. *Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis.* Osteoarthritis Cartilage 2003; 11 (11): 821-30. eng.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, et al. *Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee.* Pain 2004; 112 (1-2): 83-93. eng.
- Kalbhen DA. *Chemical model of osteoarthritis--a phar-*

macological evaluation. *J Rheumatol* 1987; 14 Spec No: 130-1. eng.

- Clark RA, Shoaib M, Hewitt KN, Stanford SC, Bate ST (2012), *A comparison of InVivoStat with other statistical software packages for analysis of data generated from animal experiments*, *J Psychopharmacol*, 26 (8), 1136-1142.
- Myska *Improving Biosensor Analysis*. *Journal of Molecular Recognition*. 1999
- D.G. Myska *Improving Biosensor Analysis*. *Journal of Molecular Recognition*. 1999; 12: 279-284.
- Myska DG, *Improving Biosensor Analysis*. *Journal of Molecular Recognition*. 1999; 12: 279-284.
- A.W. Drake, M.L. Tang, G.A. Papalia, G. Landes, M. Haak-Frendscho, S.L. Klakamp, *Biacore surface matrix effects on the binding kinetics and affinity of an antigen/antibody complex*, *Anal. Biochem.* 429 (2012) 58-69
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grisley G e Grey T, *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*, *Protein Sci.* 1995; 4: 2411-2423.
- Spooner J, Keen J, Nayyar K, Birkett N, Bond N, Bannister D, Tigue N, Higazi D, Kemp B, Vaughan T, Kippen A, Buchanan A. (2015) *Evaluation of strategies to control Fab light chain dimer during mammalian expression and purification: A universal one-step process for purification of correctly assembled Fab*. *Biotechnol Bioeng*. 112: 1472-7.
- Daramola O, Stevenson J, Dean G, Hatton D, Pettman G, Holmes W, Field R (2014) *A high yielding CHO transient system: co-expression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression*. *Biotechnol Prog*. 30 (1): 132-41.
- Mach H, Middaugh CR, Lewis RV (1992) *Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryp-*

tophan and tyrosine in native proteins. Anal. Biochem. 200 (1): 74-80.

• Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). *A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain* 43: 205-218

• Randall LO, Selitto JJ (1957). *A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther.* 111 (4): 409-419

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

PRT = sequência de aminoácidos

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
1	ZZ15D2-D02 (Par0067)	DNA VH
2	ZZ15D2-D02 (Par0067)	VH PRT
3	ZZ15D2-D02 (Par0067)	CDR1 PRT
4	ZZ15D2-D02 (Par0067)	CDR2 PRT
5	ZZ15D2-D02 (Par0067)	CDR3 PRT
6	ZZ15D2-D02 (Par0067)	DNA VL
7	ZZ15D2-D02 (Par0067)	VL PRT
8	ZZ15D2-D02 (Par0067)	CDR1 PRT
9	ZZ15D2-D02 (Par0067)	CDR2 PRT
10	ZZ15D2-D02 (Par0067)	CDR3 PRT
11	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	DNA VH
12	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	VH PRT
13	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	CDR1 PRT
14	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	CDR2 PRT
15	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	CDR3 PRT
16	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	DNA VL
17	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	VL PRT
18	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	CDR1 PRT
19	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	CDR2 PRT
20	ZZ1RUE-F02 (PaB670129)	CDR3 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
21	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	DNA VH
22	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	VH PRT
23	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	CDR1 PRT
24	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	CDR2 PRT
25	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	CDR3 PRT
26	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	DNA VL
27	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	VL PRT
28	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	CDR1 PRT
29	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	CDR2 PRT
30	ZZ1DRB-B08 (PaB670010)	CDR3 PRT
31	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	DNA VH
32	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	VH PRT
33	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	CDR1 PRT
34	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	CDR2 PRT
35	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	CDR3 PRT
36	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	DNA VL
37	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	VL PRT
38	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	CDR1 PRT
39	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	CDR2 PRT
40	ZZ1IGD-D05 (PaB670020)	CDR3 PRT
41	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	DNA VH
42	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	VH PRT
43	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	CDR1 PRT
44	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	CDR2 PRT
45	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	CDR3 PRT
46	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	DNA VL
47	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	VL PRT
48	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	CDR1 PRT
49	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	CDR2 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
50	ZZ1IGF-B11 (PaB670034)	CDR3 PRT
51	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	DNA VH
52	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	VH PRT
53	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	CDR1 PRT
54	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	CDR2 PRT
55	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	CDR3 PRT
56	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	DNA VL
57	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	VL PRT
58	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	CDR1 PRT
59	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	CDR2 PRT
60	ZZ1KX3-F01 (PaB670045)	CDR3 PRT
61	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	DNA VH
62	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	VH PRT
63	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	CDR1 PRT
64	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	CDR2 PRT
65	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	CDR3 PRT
66	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	DNA VL
67	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	VL PRT
68	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	CDR1 PRT
69	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	CDR2 PRT
70	ZZ1KX4-E11 (PaB670048)	CDR3 PRT
71	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	DNA VH
72	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	VH PRT
73	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	CDR1 PRT
74	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	CDR2 PRT
75	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	CDR3 PRT
76	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	DNA VL
77	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	VL PRT
78	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	CDR1 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
79	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	CDR2 PRT
80	ZZ1KX6-B09 (PaB670064)	CDR3 PRT
81	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	DNA VH
82	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	VH PRT
83	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	CDR1 PRT
84	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	CDR2 PRT
85	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	CDR3 PRT
86	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	DNA VL
87	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	VL PRT
88	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	CDR1 PRT
89	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	CDR2 PRT
90	ZZ1KX6-D05 (PaB670066)	CDR3 PRT
91	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	DNA VH
92	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	VH PRT
93	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	CDR1 PRT
94	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	CDR2 PRT
95	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	CDR3 PRT
96	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	DNA VL
97	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	VL PRT
98	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	CDR1 PRT
99	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	CDR2 PRT
100	ZZ1KXE-A05 (PaB670067)	CDR3 PRT
101	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	DNA VH
102	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	VH PRT
103	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	CDR1 PRT
104	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	CDR2 PRT
105	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	CDR3 PRT
106	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	DNA VL
107	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	VL PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
108	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	CDR1 PRT
109	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	CDR2 PRT
110	ZZ1KXE-B01 (PaB670068)	CDR3 PRT
111	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	DNA VH
112	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	VH PRT
113	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	CDR1 PRT
114	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	CDR2 PRT
115	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	CDR3 PRT
116	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	DNA VL
117	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	VL PRT
118	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	CDR1 PRT
119	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	CDR2 PRT
120	ZZ1KXE-D06 (PaB670070)	CDR3 PRT
121	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	DNA VH
122	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	VH PRT
123	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	CDR1 PRT
124	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	CDR2 PRT
125	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	CDR3 PRT
126	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	DNA VL
127	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	VL PRT
128	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	CDR1 PRT
129	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	CDR2 PRT
130	ZZ1L3F-A02 (PaB670071)	CDR3 PRT
131	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	DNA VH
132	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	VH PRT
133	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	CDR1 PRT
134	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	CDR2 PRT
135	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	CDR3 PRT
136	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	DNA VL

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
137	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	VL PRT
138	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	CDR1 PRT
139	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	CDR2 PRT
140	ZZ1L3F-H03 (PaB670073)	CDR3 PRT
141	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	DNA VH
142	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	VH PRT
143	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	CDR1 PRT
144	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	CDR2 PRT
145	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	CDR3 PRT
146	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	DNA VL
147	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	VL PRT
148	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	CDR1 PRT
149	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	CDR2 PRT
150	ZZ1NHH-A05 (PaB670075)	CDR3 PRT
151	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	DNA VH
152	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	VH PRT
153	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	CDR1 PRT
154	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	CDR2 PRT
155	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	CDR3 PRT
156	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	DNA VL
157	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	VL PRT
158	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	CDR1 PRT
159	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	CDR2 PRT
160	ZZ1NHH-F09 (PaB670076)	CDR3 PRT
161	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	DNA VH
162	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	VH PRT
163	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	CDR1 PRT
164	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	CDR2 PRT
165	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	CDR3 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
166	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	DNA VL
167	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	VL PRT
168	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	CDR1 PRT
169	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	CDR2 PRT
170	ZZ1OZJ-C11 (PaB670077)	CDR3 PRT
171	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	DNA VH
172	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	VH PRT
173	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	CDR1 PRT
174	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	CDR2 PRT
175	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	CDR3 PRT
176	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	DNA VL
177	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	VL PRT
178	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	CDR1 PRT
179	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	CDR2 PRT
180	ZZ1OZJ-G03 (PaB670078)	CDR3 PRT
181	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	DNA VH
182	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	VH PRT
183	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	CDR1 PRT
184	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	CDR2 PRT
185	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	CDR3 PRT
186	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	DNA VL
187	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	VL PRT
188	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	CDR1 PRT
189	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	CDR2 PRT
190	ZZ1OZJ-G05 (PaB670079)	CDR3 PRT
191	PaB670080	DNA VH
192	PaB670080	VH PRT
193	PaB670080	CDR1 PRT
194	PaB670080	CDR2 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
195	PaB670080	CDR3 PRT
196	PaB670080	DNA VL
197	PaB670080	VL PRT
198	PaB670080	CDR1 PRT
199	PaB670080	CDR2 PRT
200	PaB670080	CDR3 PRT
201	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	DNA VH
202	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	VH PRT
203	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	CDR1 PRT
204	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	CDR2 PRT
205	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	CDR3 PRT
206	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	DNA VL
207	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	VL PRT
208	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	CDR1 PRT
209	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	CDR2 PRT
210	ZZ1OZA-C01 (PaB670081)	CDR3 PRT
211	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	DNA VH
212	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	VH PRT
213	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	CDR1 PRT
214	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	CDR2 PRT
215	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	CDR3 PRT
216	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	DNA VL
217	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	VL PRT
218	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	CDR1 PRT
219	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	CDR2 PRT
220	ZZ1OZA-D02 (PaB670082)	CDR3 PRT
221	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	DNA VH
222	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	VH PRT
223	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	CDR1 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
224	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	CDR2 PRT
225	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	CDR3 PRT
226	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	DNA VL
227	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	VL PRT
228	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	CDR1 PRT
229	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	CDR2 PRT
230	ZZ1OZB-H05 (PaB670083)	CDR3 PRT
231	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	DNA VH
232	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	VH PRT
233	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	CDR1 PRT
234	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	CDR2 PRT
235	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	CDR3 PRT
236	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	DNA VL
237	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	VL PRT
238	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	CDR1 PRT
239	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	CDR2 PRT
240	ZZ1PXA-A05 (PaB670084)	CDR3 PRT
241	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	DNA VH
242	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	VH PRT
243	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	CDR1 PRT
244	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	CDR2 PRT
245	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	CDR3 PRT
246	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	DNA VL
247	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	VL PRT
248	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	CDR1 PRT
249	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	CDR2 PRT
250	ZZ1ODR-A02 (PaB670085)	CDR3 PRT
251	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	DNA VH
252	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	VH PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
253	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	CDR1 PRT
254	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	CDR2 PRT
255	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	CDR3 PRT
256	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	DNA VL
257	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	VL PRT
258	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	CDR1 PRT
259	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	CDR2 PRT
260	ZZ1ODR-B05 (PaB670087)	CDR3 PRT
261	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	DNA VH
262	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	VH PRT
263	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	CDR1 PRT
264	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	CDR2 PRT
265	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	CDR3 PRT
266	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	DNA VL
267	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	VL PRT
268	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	CDR1 PRT
269	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	CDR2 PRT
270	ZZ1ODR-B11 (PaB670088)	CDR3 PRT
271	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	DNA VH
272	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	VH PRT
273	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	CDR1 PRT
274	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	CDR2 PRT
275	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	CDR3 PRT
276	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	DNA VL
277	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	VL PRT
278	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	CDR1 PRT
279	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	CDR2 PRT
280	ZZ1ODR-C05 (PaB670089)	CDR3 PRT
281	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	DNA VH

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
282	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	VH PRT
283	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	CDR1 PRT
284	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	CDR2 PRT
285	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	CDR3 PRT
286	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	DNA VL
287	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	VL PRT
288	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	CDR1 PRT
289	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	CDR2 PRT
290	ZZ1ODR-F02 (PaB670090)	CDR3 PRT
291	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	DNA VH
292	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	VH PRT
293	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	CDR1 PRT
294	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	CDR2 PRT
295	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	CDR3 PRT
296	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	DNA VL
297	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	VL PRT
298	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	CDR1 PRT
299	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	CDR2 PRT
300	ZZ1ODR-G02 (PaB670091)	CDR3 PRT
301	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	DNA VH
302	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	VH PRT
303	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	CDR1 PRT
304	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	CDR2 PRT
305	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	CDR3 PRT
306	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	DNA VL
307	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	VL PRT
308	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	CDR1 PRT
309	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	CDR2 PRT
310	ZZ1ODR-G11 (PaB670092)	CDR3 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
311	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	DNA VH
312	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	VH PRT
313	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	CDR1 PRT
314	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	CDR2 PRT
315	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	CDR3 PRT
316	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	DNA VL
317	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	VL PRT
318	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	CDR1 PRT
319	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	CDR2 PRT
320	ZZ1ODR-H04 (PaB670093)	CDR3 PRT
321	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	DNA VH
322	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	VH PRT
323	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	CDR1 PRT
324	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	CDR2 PRT
325	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	CDR3 PRT
326	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	DNA VL
327	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	VL PRT
328	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	CDR1 PRT
329	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	CDR2 PRT
330	ZZ1ODS-B08 (PaB670094)	CDR3 PRT
331	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	DNA VH
332	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	VH PRT
333	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	CDR1 PRT
334	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	CDR2 PRT
335	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	CDR3 PRT
336	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	DNA VL
337	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	VL PRT
338	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	CDR1 PRT
339	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	CDR2 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
340	ZZ1ODS-H05 (PaB670095)	CDR3 PRT
341	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	DNA VH
342	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	VH PRT
343	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	CDR1 PRT
344	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	CDR2 PRT
345	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	CDR3 PRT
346	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	DNA VL
347	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	VL PRT
348	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	CDR1 PRT
349	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	CDR2 PRT
350	ZZ1ODT-E11 (PaB670097)	CDR3 PRT
351	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	DNA VH
352	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	VH PRT
353	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	CDR1 PRT
354	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	CDR2 PRT
355	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	CDR3 PRT
356	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	DNA VL
357	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	VL PRT
358	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	CDR1 PRT
359	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	CDR2 PRT
360	ZZ1ODT-G01 (PaB670098)	CDR3 PRT
361	PaB670099	DNA VH
362	PaB670099	VH PRT
363	PaB670099	CDR1 PRT
364	PaB670099	CDR2 PRT
365	PaB670099	CDR3 PRT
366	PaB670099	DNA VL
367	PaB670099	VL PRT
368	PaB670099	CDR1 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
369	PaB670099	CDR2 PRT
370	PaB670099	CDR3 PRT
371	PaB670100	DNA VH
372	PaB670100	VH PRT
373	PaB670100	CDR1 PRT
374	PaB670100	CDR2 PRT
375	PaB670100	CDR3 PRT
376	PaB670100	DNA VL
377	PaB670100	VL PRT
378	PaB670100	CDR1 PRT
379	PaB670100	CDR2 PRT
380	PaB670100	CDR3 PRT
381	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	DNA VH
382	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	VH PRT
383	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	CDR1 PRT
384	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	CDR2 PRT
385	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	CDR3 PRT
386	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	DNA VL
387	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	VL PRT
388	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	CDR1 PRT
389	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	CDR2 PRT
390	ZZ1ODO-H01 (PaB670101)	CDR3 PRT
391	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	DNA VH
392	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	VH PRT
393	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	CDR1 PRT
394	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	CDR2 PRT
395	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	CDR3 PRT
396	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	DNA VL
397	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	VL PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
398	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	CDR1 PRT
399	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	CDR2 PRT
400	ZZ1PXS-F08 (PaB670102)	CDR3 PRT
401	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	DNA VH
402	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	VH PRT
403	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	CDR1 PRT
404	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	CDR2 PRT
405	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	CDR3 PRT
406	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	DNA VL
407	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	VL PRT
408	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	CDR1 PRT
409	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	CDR2 PRT
410	ZZ1RCX-C09 (PaB670103)	CDR3 PRT
411	PaB670104	DNA VH
412	PaB670104	VH PRT
413	PaB670104	CDR1 PRT
414	PaB670104	CDR2 PRT
415	PaB670104	CDR3 PRT
416	PaB670104	DNA VL
417	PaB670104	VL PRT
418	PaB670104	CDR1 PRT
419	PaB670104	CDR2 PRT
420	PaB670104	CDR3 PRT
421	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	DNA VH
422	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	VH PRT
423	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	CDR1 PRT
424	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	CDR2 PRT
425	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	CDR3 PRT
426	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	DNA VL

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
427	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	VL PRT
428	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	CDR1 PRT
429	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	CDR2 PRT
430	ZZ1RD0-D01 (PaB670105)	CDR3 PRT
431	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	DNA VH
432	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	VH PRT
433	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	CDR1 PRT
434	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	CDR2 PRT
435	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	CDR3 PRT
436	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	DNA VL
437	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	VL PRT
438	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	CDR1 PRT
439	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	CDR2 PRT
440	ZZ1RD0-G02 (PaB670106)	CDR3 PRT
441	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	DNA VH
442	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	VH PRT
443	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	CDR1 PRT
444	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	CDR2 PRT
445	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	CDR3 PRT
446	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	DNA VL
447	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	VL PRT
448	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	CDR1 PRT
449	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	CDR2 PRT
450	ZZ1RD3-D09 (PaB670107)	CDR3 PRT
451	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	DNA VH
452	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	VH PRT
453	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	CDR1 PRT
454	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	CDR2 PRT
455	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	CDR3 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
456	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	DNA VL
457	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	VL PRT
458	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	CDR1 PRT
459	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	CDR2 PRT
460	ZZ1RD3-H03 (PaB670108)	CDR3 PRT
461	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	DNA VH
462	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	VH PRT
463	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	CDR1 PRT
464	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	CDR2 PRT
465	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	CDR3 PRT
466	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	DNA VL
467	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	VL PRT
468	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	CDR1 PRT
469	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	CDR2 PRT
470	ZZ1RUC-C01 (PaB670114)	CDR3 PRT
471	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	DNA VH
472	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	VH PRT
473	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	CDR1 PRT
474	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	CDR2 PRT
475	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	CDR3 PRT
476	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	DNA VL
477	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	VL PRT
478	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	CDR1 PRT
479	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	CDR2 PRT
480	ZZ1RUC-G02 (PaB670115)	CDR3 PRT
481	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	DNA VH
482	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	VH PRT
483	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	CDR1 PRT
484	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	CDR2 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
485	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	CDR3 PRT
486	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	DNA VL
487	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	VL PRT
488	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	CDR1 PRT
489	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	CDR2 PRT
490	ZZ1RUC-B04 (PaB670116)	CDR3 PRT
491	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	DNA VH
492	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	VH PRT
493	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	CDR1 PRT
494	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	CDR2 PRT
495	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	CDR3 PRT
496	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	DNA VL
497	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	VL PRT
498	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	CDR1 PRT
499	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	CDR2 PRT
500	ZZ1RUC-A06 (PaB670117)	CDR3 PRT
501	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	DNA VH
502	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	VH PRT
503	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	CDR1 PRT
504	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	CDR2 PRT
505	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	CDR3 PRT
506	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	DNA VL
507	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	VL PRT
508	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	CDR1 PRT
509	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	CDR2 PRT
510	ZZ1RUC-A07 (PaB670118)	CDR3 PRT
511	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	DNA VH
512	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	VH PRT
513	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	CDR1 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
514	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	CDR2 PRT
515	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	CDR3 PRT
516	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	DNA VL
517	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	VL PRT
518	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	CDR1 PRT
519	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	CDR2 PRT
520	ZZ1RUC-G08 (PaB670119)	CDR3 PRT
521	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	DNA VH
522	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	VH PRT
523	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	CDR1 PRT
524	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	CDR2 PRT
525	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	CDR3 PRT
526	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	DNA VL
527	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	VL PRT
528	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	CDR1 PRT
529	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	CDR2 PRT
530	ZZ1RUC-C11 (PaB670120)	CDR3 PRT
531	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	DNA VH
532	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	VH PRT
533	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	CDR1 PRT
534	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	CDR2 PRT
535	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	CDR3 PRT
536	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	DNA VL
537	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	VL PRT
538	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	CDR1 PRT
539	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	CDR2 PRT
540	ZZ1RUC-H11 (PaB670121)	CDR3 PRT
541	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	DNA VH
542	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	VH PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
543	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	CDR1 PRT
544	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	CDR2 PRT
545	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	CDR3 PRT
546	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	DNA VL
547	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	VL PRT
548	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	CDR1 PRT
549	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	CDR2 PRT
550	ZZ1RUD-A02 (PaB670122)	CDR3 PRT
551	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	DNA VH
552	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	VH PRT
553	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	CDR1 PRT
554	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	CDR2 PRT
555	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	CDR3 PRT
556	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	DNA VL
557	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	VL PRT
558	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	CDR1 PRT
559	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	CDR2 PRT
560	ZZ1RUD-H03 (PaB670123)	CDR3 PRT
561	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	DNA VH
562	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	VH PRT
563	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	CDR1 PRT
564	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	CDR2 PRT
565	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	CDR3 PRT
566	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	DNA VL
567	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	VL PRT
568	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	CDR1 PRT
569	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	CDR2 PRT
570	ZZ1RUD-H06 (PaB670125)	CDR3 PRT
571	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	DNA VH

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
572	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	VH PRT
573	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	CDR1 PRT
574	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	CDR2 PRT
575	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	CDR3 PRT
576	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	DNA VL
577	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	VL PRT
578	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	CDR1 PRT
579	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	CDR2 PRT
580	ZZ1RUD-B08 (PaB670126)	CDR3 PRT
581	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	DNA VH
582	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	VH PRT
583	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	CDR1 PRT
584	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	CDR2 PRT
585	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	CDR3 PRT
586	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	DNA VL
587	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	VL PRT
588	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	CDR1 PRT
589	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	CDR2 PRT
590	ZZ1RUD-H10 (PaB670127)	CDR3 PRT
591	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	DNA VH
592	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	VH PRT
593	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	CDR1 PRT
594	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	CDR2 PRT
595	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	CDR3 PRT
596	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	DNA VL
597	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	VL PRT
598	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	CDR1 PRT
599	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	CDR2 PRT
600	ZZ1RUE-A01 (PaB670128)	CDR3 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
601	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	DNA VH
602	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	VH PRT
603	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	CDR1 PRT
604	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	CDR2 PRT
605	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	CDR3 PRT
606	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	DNA VL
607	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	VL PRT
608	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	CDR1 PRT
609	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	CDR2 PRT
610	ZZ1RUF-A01 (PaB670136)	CDR3 PRT
611	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	DNA VH
612	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	VH PRT
613	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	CDR1 PRT
614	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	CDR2 PRT
615	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	CDR3 PRT
616	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	DNA VL
617	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	VL PRT
618	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	CDR1 PRT
619	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	CDR2 PRT
620	ZZ1RUF-B06 (PaB670137)	CDR3 PRT
621	PaB670141	DNA VH
622	PaB670141	VH PRT
623	PaB670141	CDR1 PRT
624	PaB670141	CDR2 PRT
625	PaB670141	CDR3 PRT
626	PaB670141	DNA VL
627	PaB670141	VL PRT
628	PaB670141	CDR1 PRT
629	PaB670141	CDR2 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
630	PaB670141	CDR3 PRT
631	PaB670142	DNA VH
632	PaB670142	VH PRT
633	PaB670142	CDR1 PRT
634	PaB670142	CDR2 PRT
635	PaB670142	CDR3 PRT
636	PaB670142	DNA VL
637	PaB670142	VL PRT
638	PaB670142	CDR1 PRT
639	PaB670142	CDR2 PRT
640	PaB670142	CDR3 PRT
641	PaB670143	DNA VH
642	PaB670143	VH PRT
643	PaB670143	CDR1 PRT
644	PaB670143	CDR2 PRT
645	PaB670143	CDR3 PRT
646	PaB670143	DNA VL
647	PaB670143	VL PRT
648	PaB670143	CDR1 PRT
649	PaB670143	CDR2 PRT
650	PaB670143	CDR3 PRT
651	PaB670144	DNA VH
652	PaB670144	VH PRT
653	PaB670144	CDR1 PRT
654	PaB670144	CDR2 PRT
655	PaB670144	CDR3 PRT
656	PaB670144	DNA VL
657	PaB670144	VL PRT
658	PaB670144	CDR1 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
659	PaB670144	CDR2 PRT
660	PaB670144	CDR3 PRT
661	PaB670146	DNA VH
662	PaB670146	VH PRT
663	PaB670146	CDR1 PRT
664	PaB670146	CDR2 PRT
665	PaB670146	CDR3 PRT
666	PaB670146	DNA VL
667	PaB670146	VL PRT
668	PaB670146	CDR1 PRT
669	PaB670146	CDR2 PRT
670	PaB670146	CDR3 PRT
671	PaB670148	DNA VH
672	PaB670148	VH PRT
673	PaB670148	CDR1 PRT
674	PaB670148	CDR2 PRT
675	PaB670148	CDR3 PRT
676	PaB670148	DNA VL
677	PaB670148	VL PRT
678	PaB670148	CDR1 PRT
679	PaB670148	CDR2 PRT
680	PaB670148	CDR3 PRT
681	PaB670149	DNA VH
682	PaB670149	VH PRT
683	PaB670149	CDR1 PRT
684	PaB670149	CDR2 PRT
685	PaB670149	CDR3 PRT
686	PaB670149	DNA VL
687	PaB670149	VL PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
688	PaB670149	CDR1 PRT
689	PaB670149	CDR2 PRT
690	PaB670149	CDR3 PRT
691	PaB670151	DNA VH
692	PaB670151	VH PRT
693	PaB670151	CDR1 PRT
694	PaB670151	CDR2 PRT
695	PaB670151	CDR3 PRT
696	PaB670151	DNA VL
697	PaB670151	VL PRT
698	PaB670151	CDR1 PRT
699	PaB670151	CDR2 PRT
700	PaB670151	CDR3 PRT
701	PaB670152	DNA VH
702	PaB670152	VH PRT
703	PaB670152	CDR1 PRT
704	PaB670152	CDR2 PRT
705	PaB670152	CDR3 PRT
706	PaB670152	DNA VL
707	PaB670152	VL PRT
708	PaB670152	CDR1 PRT
709	PaB670152	CDR2 PRT
710	PaB670152	CDR3 PRT
711	PaB670153	DNA VH
712	PaB670153	VH PRT
713	PaB670153	CDR1 PRT
714	PaB670153	CDR2 PRT
715	PaB670153	CDR3 PRT
716	PaB670153	DNA VL

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
717	PaB670153	VL PRT
718	PaB670153	CDR1 PRT
719	PaB670153	CDR2 PRT
720	PaB670153	CDR3 PRT
721	PaB670156	DNA VH
722	PaB670156	VH PRT
723	PaB670156	CDR1 PRT
724	PaB670156	CDR2 PRT
725	PaB670156	CDR3 PRT
726	PaB670156	DNA VL
727	PaB670156	VL PRT
728	PaB670156	CDR1 PRT
729	PaB670156	CDR2 PRT
730	PaB670156	CDR3 PRT
731	PaB670157	DNA VH
732	PaB670157	VH PRT
733	PaB670157	CDR1 PRT
734	PaB670157	CDR2 PRT
735	PaB670157	CDR3 PRT
736	PaB670157	DNA VL
737	PaB670157	VL PRT
738	PaB670157	CDR1 PRT
739	PaB670157	CDR2 PRT
740	PaB670157	CDR3 PRT
741	PaB670158	DNA VH
742	PaB670158	VH PRT
743	PaB670158	CDR1 PRT
744	PaB670158	CDR2 PRT
745	PaB670158	CDR3 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
746	PaB670158	DNA VL
747	PaB670158	VL PRT
748	PaB670158	CDR1 PRT
749	PaB670158	CDR2 PRT
750	PaB670158	CDR3 PRT
751	PaB670159	DNA VH
752	PaB670159	VH PRT
753	PaB670159	CDR1 PRT
754	PaB670159	CDR2 PRT
755	PaB670159	CDR3 PRT
756	PaB670159	DNA VL
757	PaB670159	VL PRT
758	PaB670159	CDR1 PRT
759	PaB670159	CDR2 PRT
760	PaB670159	CDR3 PRT
761	PaB670160	DNA VH
762	PaB670160	VH PRT
763	PaB670160	CDR1 PRT
764	PaB670160	CDR2 PRT
765	PaB670160	CDR3 PRT
766	PaB670160	DNA VL
767	PaB670160	VL PRT
768	PaB670160	CDR1 PRT
769	PaB670160	CDR2 PRT
770	PaB670160	CDR3 PRT
771	PaB670161	DNA VH
772	PaB670161	VH PRT
773	PaB670161	CDR1 PRT
774	PaB670161	CDR2 PRT

SEQ ID NO:	nome de clone	Tipo
775	PaB670161	CDR3 PRT
776	PaB670161	DNA VL
777	PaB670161	VL PRT
778	PaB670161	CDR1 PRT
779	PaB670161	CDR2 PRT
780	PaB670161	CDR3 PRT
781	PaB670162	DNA VH
782	PaB670162	VH PRT
783	PaB670162	CDR1 PRT
784	PaB670162	CDR2 PRT
785	PaB670162	CDR3 PRT
786	PaB670162	DNA VL
787	PaB670162	VL PRT
788	PaB670162	CDR1 PRT
789	PaB670162	CDR2 PRT
790	PaB670162	CDR3 PRT
791	PaB670163	DNA VH
792	PaB670163	VH PRT
793	PaB670163	CDR1 PRT
794	PaB670163	CDR2 PRT
795	PaB670163	CDR3 PRT
796	PaB670163	DNA VL
797	PaB670163	VL PRT
798	PaB670163	CDR1 PRT
799	PaB670163	CDR2 PRT
800	PaB670163	CDR3 PRT

[00201] SEQ ID NO: 801 - Pré-pró-proteína PAR2 Humana (No. de Acesso do GenBank NP_005233.3)

MRSPSAAWLLGAAILLAASLSCSGTIQGTONRSSKGRSLIGKVDGTS

VTGKGVTVETVFSVDEFSASVLTGKLTTVFLPIVYTIVFVVGGLPSNGM
ALWFLFRTRKKKHPAVIYMANLALADLLSVIWFPLKIAHYIHGNNTIYG
EALCNVLIGFFYGNMYCSILFMTCLSVQRYWVIVNPMGHSRKKANIAI
GISLAIWLLILLVTIPLYVVKQTIFPALNITTCHDVLPEQLLVGDMFNYFL
SLAIGVFLFPAFLTASAYVLMIRRSSAMDENSEKKRKRAIKLIVTVL
AMYLICFTPSNLLVVHYFLIKSQGQSHVYALYIVALCLSTLNSCIDPFV
YYFVSHDFRDHAKNALLCRSVRTVKQMQVSLTSKKHSRKSSSYSSS
STTVKTSY

SEQ ID NO: 802 - Ligante Ligado a PAR2 Humana

SLIGKVDGTSHTVGKGVTVETVFSVDEFSASVLTGKLTT

SEQ ID NO: 803 - Região de Arcabouço de VH 1 Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS

SEQ ID NO: 804 - Região de Arcabouço de VH 2 Exemplificativa

WVRQAPGKGLEWVS

SEQ ID NO: 805 - Região de Arcabouço de VH 3 Exemplificativa

RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

SEQ ID NO: 806 - Região de Arcabouço de VH 4 Exemplificativa

WGQGTLTVVSS

SEQ ID NO: 807 - Região de Arcabouço de VL 1 Exemplificativa

SIELTQPPSVSVSPGQTASITC

SEQ ID NO: 808 - Região de Arcabouço de VL 2 Exemplificativa

WYQQKPGQSPVLVIY

SEQ ID NO: 809 - Região de Arcabouço de VL 3 Exemplificativa

GIPERFSGNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

SEQ ID NO: 810 - Região de Arcabouço de VL 4 Exemplificativa

FGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 811 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYSGSHISYHDSVHH

SEQ ID NO: 812 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYHGSLISYHDSVHH

SEQ ID NO: 813 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYHGSHISYADSVHH

SEQ ID NO: 814 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYHGSHISYHDSVKH

SEQ ID NO: 815 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYHGSHISYHDSVHG

SEQ ID NO: 816 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYHGSLISYADSVKG

SEQ ID NO: 817 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYSGSHISYADSVKG

SEQ ID NO: 818 — CD2 de VH Exemplificativa

TISYHGSHISYADSVKG

SEQ ID NO: 819 — CD3 de VH Exemplificativa

IHNDPMDV

SEQ ID NO: 820 — CD3 de VH Exemplificativa

INHDPMDV

SEQ ID NO: 821 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWRQAPGKGL

EWVSTISYHGSHISYHDSVHHRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA

VYYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 822 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWRQAPGKGL

EWVSTISYSGSHISYHDSVHHRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV

YYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 823 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWRQAPGKGL

EWVSTISYHGSLISYHDSVHHRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV

YYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 824 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWRQAPGKGL

EWVSTISYHGSHISYADSVHHRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 825 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGL
EWVSTISYHGSHISYHDSVKHRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 826 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGL
EWVSTISYHGSHISYHDSVHGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 827 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGL
EWVSTISYHGSHISYHDSVHHRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARINHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 828 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGL
EWVSTISYHGSHISYHDSVHHRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARIHNDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 829 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGL
EWVSTISYHGSLISYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 830 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGL
EWVSTISYSGSHISYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 831 -- VH Exemplificativa

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGL
EWVSTISYHGSHISYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARIHHDPMDVWGQGTLTVSS

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[00202] Todas as publicações e patentes mencionadas aqui são deste modo incorporadas por referência na sua totalidade como se cada publicação ou patente individual fosse especificamente e individualmente indicada como estando incorporada por referência.

[00203] Embora tenham sido discutidas modalidades específicas da presente descrição, o relatório descritivo acima é ilustrativo e não restritivo. Muitas variações da descrição se tornarão aparentes aos peritos na técnica após revisão deste relatório descritivo e das reivindicações em baixo. O escopo total da descrição deve ser determinado por referência às reivindicações, em conjunto com seu escopo total de equivalentes, e ao relatório descritivo, em conjunto com tais variações.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), caracterizado pelo fato de que a VH compreende:

i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 3;

ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 4; e

iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 5;

e em que a VL compreende:

i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 8;

ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 9; e

iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; mas em que 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições, deleções ou inserções de aminoácidos estão opcionalmente presentes na sequência de SEQ ID NO: 10;

em que as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos reduzem a afinidade de ligação do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno por PAR2 humano em não mais do que 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50 ou 10 vezes em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo uma VH com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e VL com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 quando testado a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2.

2. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as substituições, deleções ou inserções de aminoácidos compreendem uma substituição homóloga.

3. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) e um domínio variável de cadeia leve (VL), caracterizado pelo fato de que a VH compreende:

i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-17 de SEQ ID NO: 4; e

iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-8 de SEQ ID NO: 5;

e em que a VL compreende:

i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 9; e

iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; mas em que uma histidina está opcionalmente presente em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos correspondendo às posições 1-14 de SEQ ID NO: 10.

4. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH comprehende:

i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4,

iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,

e em que a VL comprehende:

i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8,

ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9,

iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

5. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH comprehende:

i) uma VH-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13,

ii) uma VH-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14,

iii) uma VH-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15,

e em que a VL comprehende:

- i) uma VL-CDR1 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18,
- ii) uma VL-CDR2 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19,
- iii) uma VL-CDR3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

6. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5, 8, 12, 16 e 17 de SEQ ID NO: 4; e em que uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 2 e 3 de SEQ ID NO: 5.

7. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 5 de SEQ ID NO: 4.

8. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 7 de SEQ ID NO: 4.

9. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 8 de SEQ ID NO: 4.

10. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 12 de SEQ ID NO: 4.

11. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de

acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 15 de SEQ ID NO: 4.

12. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 16 de SEQ ID NO: 4.

13. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 17 de SEQ ID NO: 4.

14. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5 e 8 de SEQ ID NO: 4.

15. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5, 8, 12 e 16 de SEQ ID NO: 4.

16. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 5, 8, 12, 16 e 17 de SEQ ID NO: 4.

17. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 2 de

SEQ ID NO: 5.

18. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 3 de SEQ ID NO: 5.

19. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente nas posições de aminoácidos correspondendo às posições 2 e 3 de SEQ ID NO: 5.

20. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 1 de SEQ ID NO: 10.

21. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 5 de SEQ ID NO: 10.

22. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido correspondendo à posição 6 de SEQ ID NO: 10.

23. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 5, 14, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que uma histidina está presente na posição de aminoácido corres-

pondendo à posição 14 de SEQ ID NO: 10.

24. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR2 comprehende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 384, 394, 404, 414, 424, 434, 444, 454, 464, 474, 484, 494, 504, 514, 524, 534, 544, 554, 564, 574, 584, 594, 604, 614, 624, 634, 644, 654, 664, 674, 684, 694, 704, 714, 724, 734, 744, 754, 764, 774, 784, 794, e 811-818.

25. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 24, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR3 comprehende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 415, 425, 435, 445, 455, 465, 475, 485, 495, 505, 515, 525, 535, 545, 555, 565, 575, 585, 595, 605, 615, 625, 635, 645, 655, 665, 675, 685, 695, 705, 715, 725, 735, 745, 755, 765, 775, 785, 795, e 819-820.

26. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 24 ou 25, caracterizado pelo fato de que a VL-CDR3 comprehende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740,

750, 760, 770, 780, 790 e 800.

27. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 14; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15, e em que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 20.

28. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 811; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 819, e em que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20.

29. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 814; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 820, e em que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20.

30. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 816; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15, e em que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20.

31. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de

acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 818; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 15, e em que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 10 ou 20.

32. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que a VH compreende regiões de arcabouço que são, pelo menos, 90% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 803-806.

33. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que a VH compreende regiões de arcabouço que são, pelo menos, 95% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 803-806.

34. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que a VH compreende regiões de arcabouço correspondendo a SEQ ID NOs: 803-806.

35. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que a VL compreende regiões de arcabouço que são, pelo menos, 90% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 807-810.

36. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de

acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que a VL compreende regiões de arcabouço que são, pelo menos, 95% idênticas a cada uma de SEQ ID NOs: 807-810.

37. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que a VL compreende regiões de arcabouço correspondendo a SEQ ID NOs: 807-810.

38. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522, 532, 542, 552, 562, 572, 582, 592, 602, 612, 622, 632, 642, 652, 662, 672, 682, 692, 702, 712, 722, 732, 742, 752, 762, 772, 782, 792, e 821-831.

39. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VL compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517, 527, 537, 547, 557, 567, 577, 587, 597,

607, 617, 627, 637, 647, 657, 667, 677, 687, 697, 707, 717, 727, 737, 747, 757, 767, 777, 787, e 797.

40. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 821 e em que a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17.

41. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 824 e em que a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17.

42. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 827 e em que a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17.

43. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 831 e em que a VL compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo a SEQ ID NO: 7 ou 17.

44. Anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 12 em que a VL compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% ou

100% idêntica a SEQ ID NO: 17.

45. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é um fragmento de ligação ao antígeno.

46. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um scFv.

47. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é um Fab'.

48. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é um anticorpo.

49. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

50. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo IgG.

51. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento

de ligação ao antígeno é humanizado.

52. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno é humano.

53. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 90% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841.

54. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 95% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841.

55. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841.

56. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 ou 55, caracterizado pelo fato de que a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 90% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796.

57. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 95% de identidade com qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396,

406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796.

58. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796.

59. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 ou 58, caracterizado pelo fato de que a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 90% de identidade com SEQ ID NO: 11.

60. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 95% de identidade com SEQ ID NO: 11.

61. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que a VH é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 11.

62. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 ou 61, caracterizado pelo fato de que a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 90% de identidade com SEQ ID NO: 16.

63. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem, pelo menos, 95% de identidade com SEQ ID NO: 16.

64. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a VL é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 16.

65. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 ou 64, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2.

66. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 ou 65, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao

antígeno previne a interação de tripsina, triptase e/ou matriptase com PAR2.

67. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 ou 66, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno previne a clivagem de tripsina, triptase e/ou matriptase de PAR2.

68. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66 ou 67, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno previne a clivagem do domínio extracelular de PAR2.

69. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 ou 68, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno inibe a exposição do ligante ligado.

70. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66,

67, 68 ou 69, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno previne a interação do ligante ligado com a segunda alça transmembranar de PAR2.

71. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 com uma maior afinidade a um pH de 7,4 do que a um pH de 6,0.

72. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 a pH 7,4 com uma K_D de menos do que cerca de 5 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 500 pM, 200 pM, 100 pM ou 50 pM.

73. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 a pH 7,4 com uma K_D de menos do que cerca de 700 pM.

74. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou frag-

mento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 a pH 6,0 com uma K_D de mais do que cerca de 1 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 80 nM ou 100 nM.

75. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno se liga a PAR2 a pH 6,0 com uma K_D de mais do que cerca de 30 nM.

76. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 ou 75, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 100 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2.

77. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que 50 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um

pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2.

78. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC₅₀ de menos do que 40 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2.

79. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 ou 78, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC₅₀ de mais do que 500 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 a um pH de 6,0 em um ensaio de ligação a PAR2.

80. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 ou 79, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC₅₀ de mais do que 1000 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5

e 8-10 a um pH de 6,0 em um ensaio de ligação a PAR2.

81. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 ou 80, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de mais do que 1100 nM quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOS: 3-5 e 8-10 a um pH de 6,0 em um ensaio de ligação a PAR2.

82. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 ou 81, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} mais do que 20 vezes mais baixa a um pH de 7,4 do que a um pH de 6,0 quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOS: 3-5 e 8-10 em um ensaio de ligação a PAR2.

83. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81 ou 82, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} mais do que 25 vezes mais baixa a um pH de 7,4 do

que a um pH de 6,0 quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 em um ensaio de ligação a PAR2.

84. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 ou 83, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} mais do que 30 vezes mais baixa a um pH de 7,4 do que a um pH de 6,0 quando compete com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo as CDRs de SEQ ID NOs: 3-5 e 8-10 em um ensaio de ligação a PAR2.

85. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 ou 84, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $3,0 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células A549 humanas.

86. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação

ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $1,5 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células A549 humanas.

87. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $7,0 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células KNRK de rato.

88. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 ou 87, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $5,5 \times 10^{-10}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células KNRK de rato.

89. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $7,0 \times 10^{-11}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células CYNOM-K1 de macaco cinomolgo.

90. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 ou 89, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $5,0 \times 10^{-11}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células CYNOM-K1 de macaco cinomolgo.

91. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 ou 90, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $6,0 \times 10^{-11}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células LL/2 de murino.

92. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 ou 91, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma IC_{50} de menos do que $4,0 \times 10^{-11}$ M em um ensaio de influxo de cálcio em células LL/2 de murino.

93. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que o anti-

corpo ou fragmento de ligação ao antígeno é eliminado mais lentamente a partir de soro de um paciente tratado do que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno não tendo modificações de histidina.

94. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 e 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 ou 93, caracterizado pelo fato de que a histidina ou histidinas opcionalmente presentes reduzem a afinidade de ligação do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno por PAR2 humano em não mais do que 1000, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50 ou 10 vezes em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tendo uma VH com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e VL com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 quando testado a um pH de 7,4 em um ensaio de ligação a PAR2.

95. Ácido nucleico capaz de expressar o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94.

96. Ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é, pelo menos, 90% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421,

431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841.

97. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é, pelo menos, 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841.

98. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, 391, 401, 411, 421, 431, 441, 451, 461, 471, 481, 491, 501, 511, 521, 531, 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 611, 621, 631, 641, 651, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 751, 761, 771, 781, 791, e 833-841.

99. Ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é, pelo menos, 90% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796.

100. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 99, ca-

racterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é, pelo menos, 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796.

101. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 386, 396, 406, 416, 426, 436, 446, 456, 466, 476, 486, 496, 506, 516, 526, 536, 546, 556, 566, 576, 586, 596, 606, 616, 626, 636, 646, 656, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 756, 766, 776, 786, e 796.

102. Ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é, pelo menos, 90% idêntica a SEQ ID NO: 11.

103. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que é, pelo menos, 95% idêntica a SEQ ID NO: 11.

104. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 11.

105. Ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é, pelo menos, 90% idêntica a SEQ ID NO: 16.

106. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende uma se-

quência de nucleotídeos que é, pelo menos, 95% idêntica a SEQ ID NO: 16.

107. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico compreende a sequênciade nucleotídeos de SEQ ID NO: 16.

108. Vetor compreendendo o ácido nucleico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 ou 107.

109. Conjunto de vetores compreendendo: a) o ácido nucleico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 96, 97, 98, 102, 103 ou 104; e b) o ácido nucleico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 99, 100, 101, 105, 106 ou 107.

110. Célula hospedeira compreendendo um ou mais dos vetores, conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 108 ou 109.

111. Composição compreendendo um transportador farmacologicamente aceitável e o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94.

112. Composição liofilizada compreendendo o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,

91, 92, 93 ou 94.

113. Composição liofilizada reconstituída compreendendo o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94.

114. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 111, 112 ou 113, caracterizado pelo fato de que a composição é formulada para administração por pastilha, pulverização, administração oral, liberação retardada ou liberação sustentada, administração transmucosal, xarope, mucoadesiva, formulação bucal, comprimido mucoadesivo, administração tópica, administração parenteral, injeção, administração transdérmica, solução oral, administração retal, administração bucal ou administração transdérmica.

115. Estojo compreendendo o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94, ou a composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 111, 112, 113 ou 114.

116. Método para tratamento da dor em um sujeito com sua necessidade, compreendendo administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindica-

ções 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94.

117. Método para tratamento da dor em um sujeito com sua necessidade, compreendendo administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 111, 112, 113 ou 114.

118. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 ou 117, caracterizado pelo fato de que a dor é selecionada do grupo consistindo em: dor nociceptiva, neuropática e do tipo misto.

119. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 ou 117, caracterizado pelo fato de que a dor está associada a uma dor de cabeça, dor de cabeça crônica, uma enxaqueca, um câncer, uma infecção viral, artrite reumatoide, osteoartrite, doença de Crohn, doença hepática, esclerose múltipla, lesão da medula espinhal, neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética, dor da parte inferior das costas, doença cardíaca inflamatória, doença renal, gastrite, gengivite, doença periodontal, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença autoimune, síndrome do intestino irritável, fibromialgia, dores nas pernas, síndrome das pernas inquietas, neuropatia diabética, uma condição alérgica, um procedimento cirúrgico, lesão física aguda ou crônica, fratura óssea ou uma lesão por esmagamento, lesão da medula espinal, uma doença inflamatória, uma condição de dor neuropática ou disfuncional não inflamatória ou uma sua combinação.

120. Método, de acordo com a reivindicação 119, caracterizado pelo fato de que a dor é dor de osteoartrite.

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116, 117, 118, 119 ou 120, caracterizado pelo fato de que o sujei-

to é um humano.

122. Método de produção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94, compreendendo os passos de:

expressão do ácido nucleico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105 ou 106, purificação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno.

Figura 1A

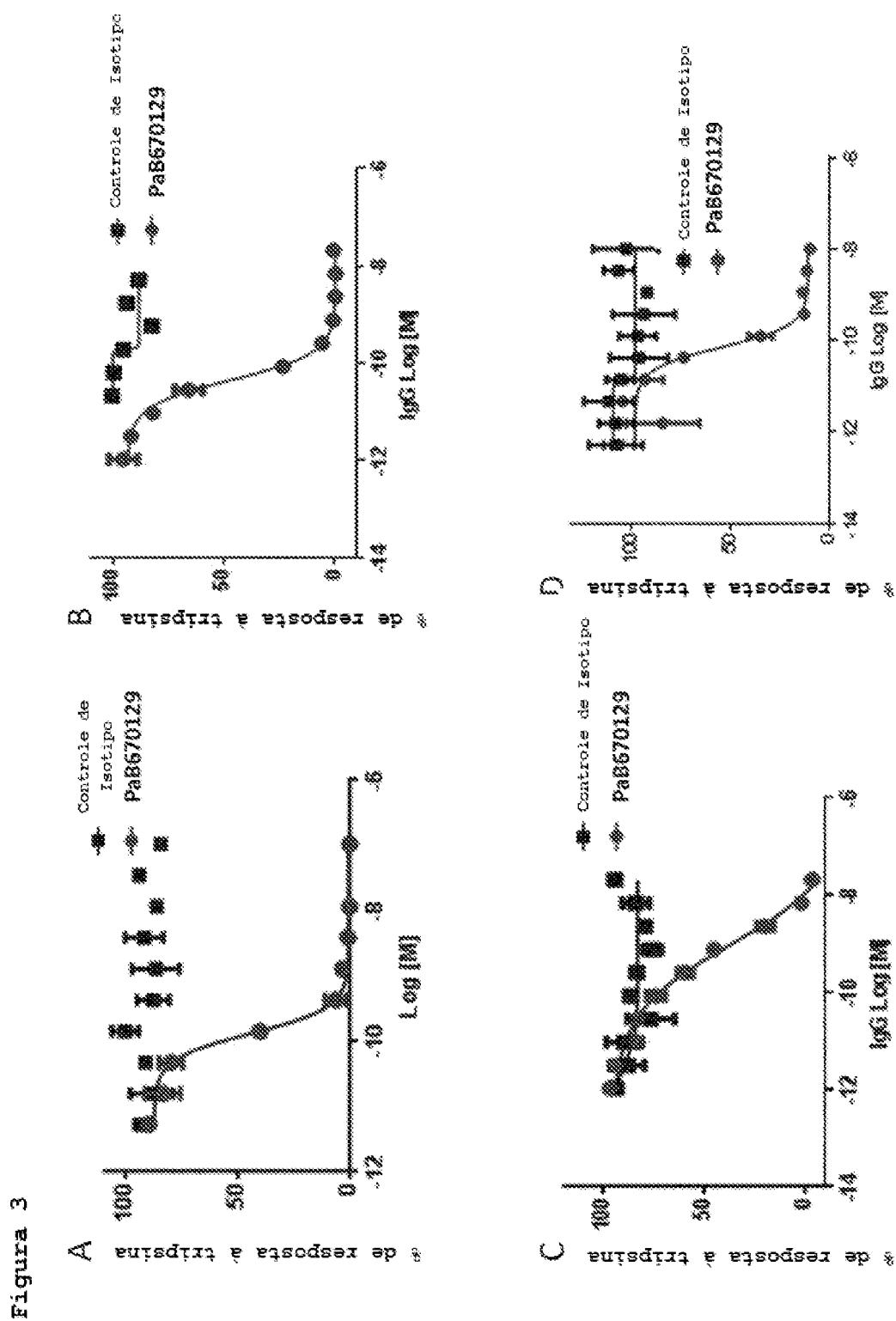
Figura 18

Numeração de Kabat	Sequências de VL												
	CDR 3												
	95	96	97	98	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Par83887	Q	T	W	S	G	W	F	T	T	G	E	T	N
Pa8670029													
Pa8670030													
Pa8670030													
Pa8670034													
Pa8670045													
Pa8670048													
Pa8670054	H			H	H			H					H
Pa8670068	H	H		H			H	H					H
Pa8670067	H		H	H	H			H					H
Pa8670068					H	H		H					H
Pa8670070						H		H	H				H
Pa8670071	H		H	H	H	H	H	H					H
Pa8670073	H		H		H		H	H					H
Pa8670075	G						H	H	H				H
Pa8670076	H				H	H	H						H
Pa8670077	H	H		H		H	H						H
Pa8670078	H	H		H		H	H						H
Pa8670079	H					H	H						H
Pa8670080						H	H	H					H
Pa8670081													
Pa8670082													
Pa8670083													
Pa8670084													
Pa8670085													
Pa8670087													
Pa8670088													
Pa8670089													
Pa8670091													
Pa8670092													
Pa8670093													
Pa8670094													
Pa8670095													
Pa8670097													
Pa8670098													
Pa8670099													
Pa8670100													
Pa8670101													
Pa8670102													
Pa8670103	H				H	H							H

Figura 2A

Numeração da Kabat	Sequências de VL														
	CDR 3														
	S	C	G	N	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Pa8670107	Q	T	W	D	G	N	P	T	T	G	E	T	N	V	
Pa8670104		N					N	N	N						
Pa8670105		N		N				N				N		N	
Pa8670106		N			N			N	N	N	N				N
Pa8670107	N	N		N	N				N	N					
Pa8670108		N		N		N	N	N							
Pa8670114															
Pa8670115															
Pa8670116															
Pa8670117															
Pa8670118															
Pa8670119															
Pa8670120															
Pa8670121															
Pa8670122															
Pa8670123															
Pa8670125															
Pa8670126															
Pa8670127															
Pa8670128															
Pa8670136															
Pa8670137															
Pa8670141										N					
Pa8670143										N					
Pa8670145										N					
Pa8670144										N					
Pa8670148	N			N	N	N			N		N				
Pa8670149	N			N	N	N			N		N				
Pa8670143	N			N	N	N			N		N				
Pa8670151	N			N	N	N			N		N				
Pa8670152	N			N	N	N					N				
Pa8670153	N			N	N	N					N				
Pa8670156							N	N	N						N
Pa8670157							N	N	N						N
Pa8670158							N	N	N						N
Pa8670159							N	N	N						N
Pa8670160	N						N	N							N
Pa8670161	N						N	N							N
Pa8670162	N						N	N							N
Pa8670163	N						N	N							N

Figura 2B



DAOS DE POTÊNCIA DE ENSAIO TIPO DE PARZ 169

DADOS DE POTÊNCIA DE ENSAIO FLIPIR DE PANZ N.º 80											
Id. de FLIPIR A549	Setor	n	Id. de FLIPIR KBRK de SEME	n	Id. de FLIPIR CPRM-K1 de Cino (nº)	n	Id. de FLIPIR L1/2 de Cazimorango (nº)	n	Id. de FLIPIR L1/2 de Cazimorango (nº)		
Par5670563	1.38E-10	1.675E11	5	7.38E12	1.485E12	6	5.87E11	1	2.38E11	2.38E11	
Par5670634	2.06E-16		1	7.08E12							
Par5670635	1.415E-10		1	1.225E11							
Par5670648	3.61E-10	6.155E12	3	14.75E11	2.44E12	4					
Par5670663	16		1	86							
Par5670664	2.36E-10		1	7.49E12							
Par5670666	7.12E-16		1	5.89E12							
Par567075	9.69E-10		1	36							
Par5670756	1.52E-10	3.1275E12	7	14.92E12	3.81E12	7					
Par567077	9.38E-10		1	1.59E12							
Par567078	5.285E-10		1	1.32E12							
Par567079	2.61E-10		1	6.69E11							
Par567085	2.61E-10		1	1.44E11							
Par567094	1.22E-10	3.6165E12	2	3.22E12	3.75E12	2					
Par567095	6.38E-10		1	1.48E11							
Par567097	3.52E-10		1	1.32E10							
Par567099	1.12E-10		1	3.89E10							
Par567115	3.48E-10		1	2.69E10							
Par567116	3.48E-10		1	5.37E10							
Par567117	3.48E-10		1	1.04E10							
Par567118	1.41E-10		1	3.48E11							
Par567119	1.078E-10		1	9.48E11							
Par567120	3.25E-10	8.3615E11	2	9.09E11	2.63E11	2					
Par567121	1.133E-10		1	1.41E10							
Par567122	2.318E-10		3	80							
Par567123	1.585E-10		1	3.545E10							
Par567124	16		1	36							
Par567125	2.257E-10		1	1.34E10							
Par567126	1.66E-10		1	3.88E10							
Par567127	5.129E-10		1	66							
Par567128	1.125E-10		3	20.28E10							
Par567129	1.595E-10		1	2.69E11	8.33E11	3	2.71E11	3			
Par567130	1.455E-10	1.455E11	4	5.37E10	7.47E11	6	4.63E11	3.23E12	3	4.33E11	2.53E12
Par567131	16		1	96							
Par567132	36		1	86							
Par567133	36		1	96							
Par567134	36		1	3.59E10							
Par567135	36		1	4.33E10							
Par567136	3.37E-10	7.43E11	2	4.47E10	3.13E11	2					
Par567137	1.87E-10		1	1.34E10							
Par567138	9.51E-11	7.77E12	2	3.08E11	7.38E12	2					
Par567139	16		1	146							
Par567140	3.45E-10		1	5.45E10							

FIGURA 3E

Figura 4

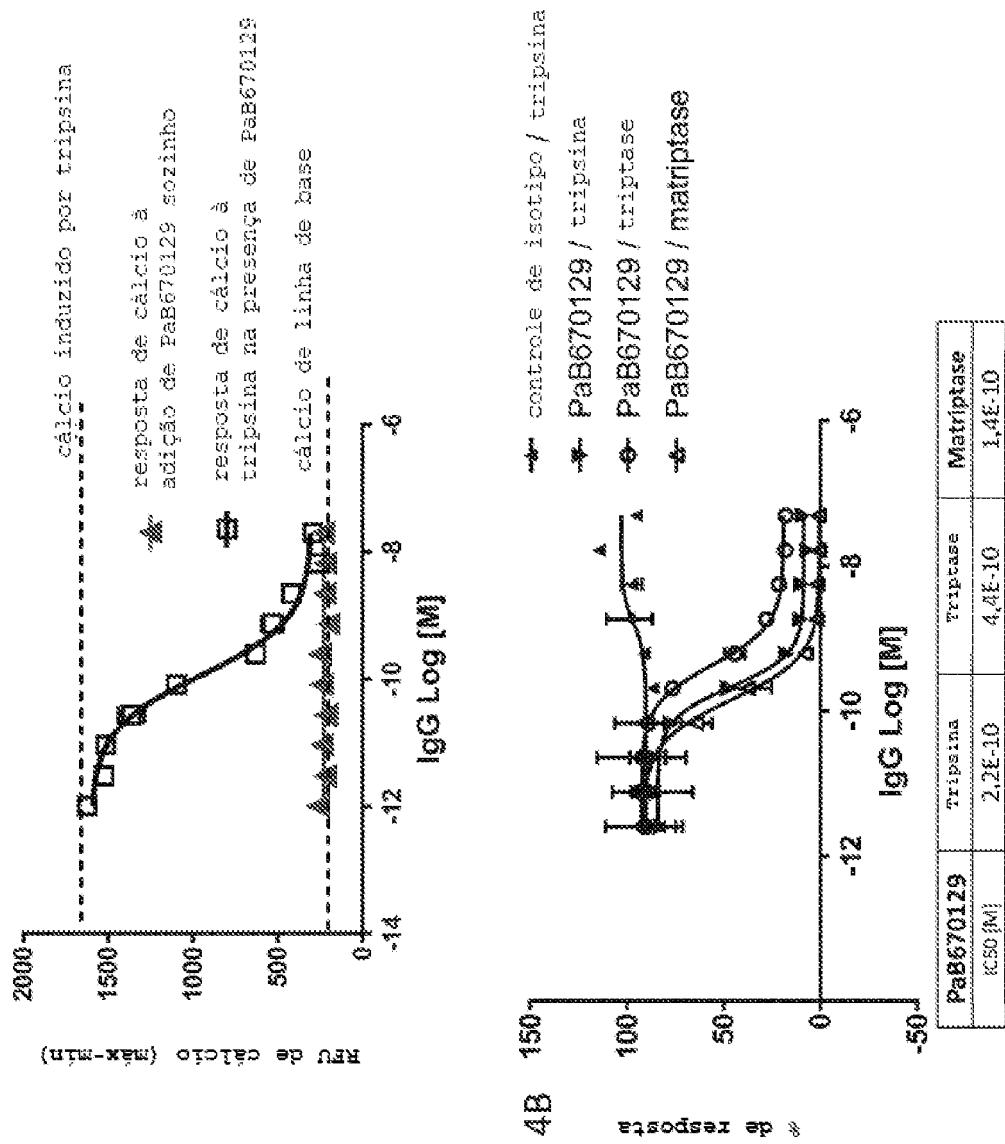


FIGURE 5

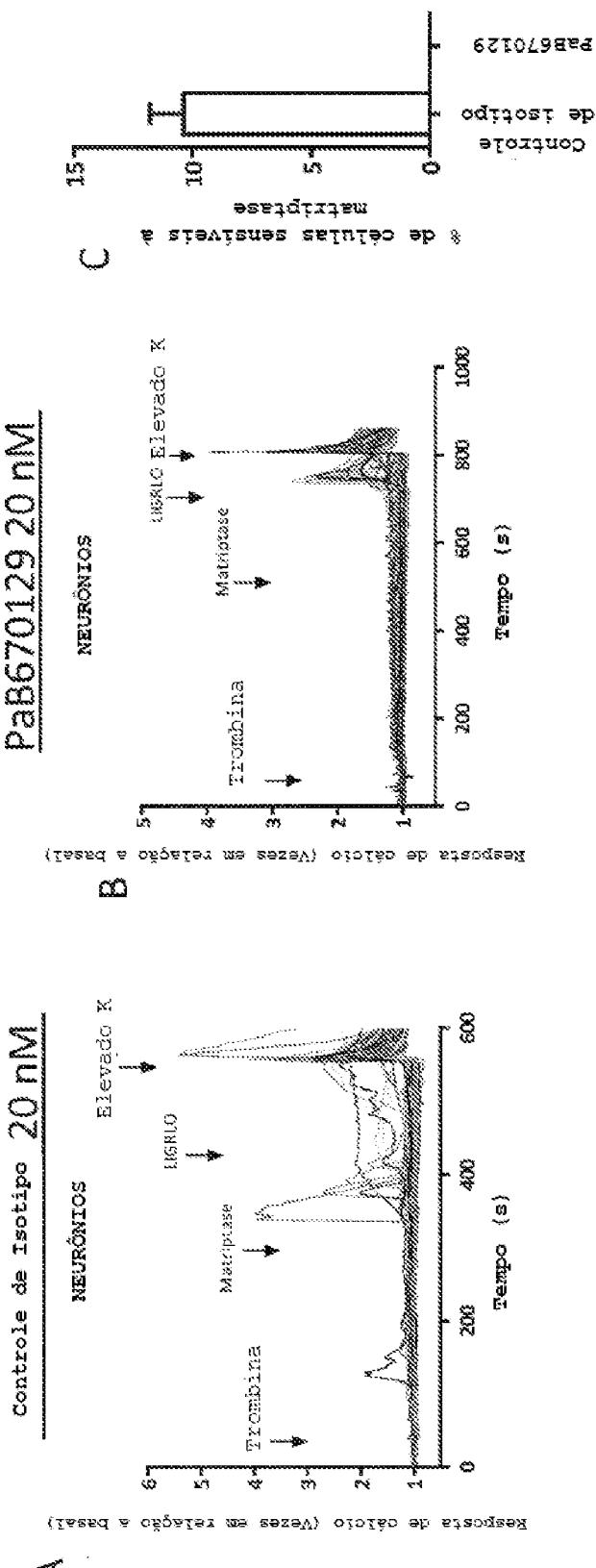


Figura 5

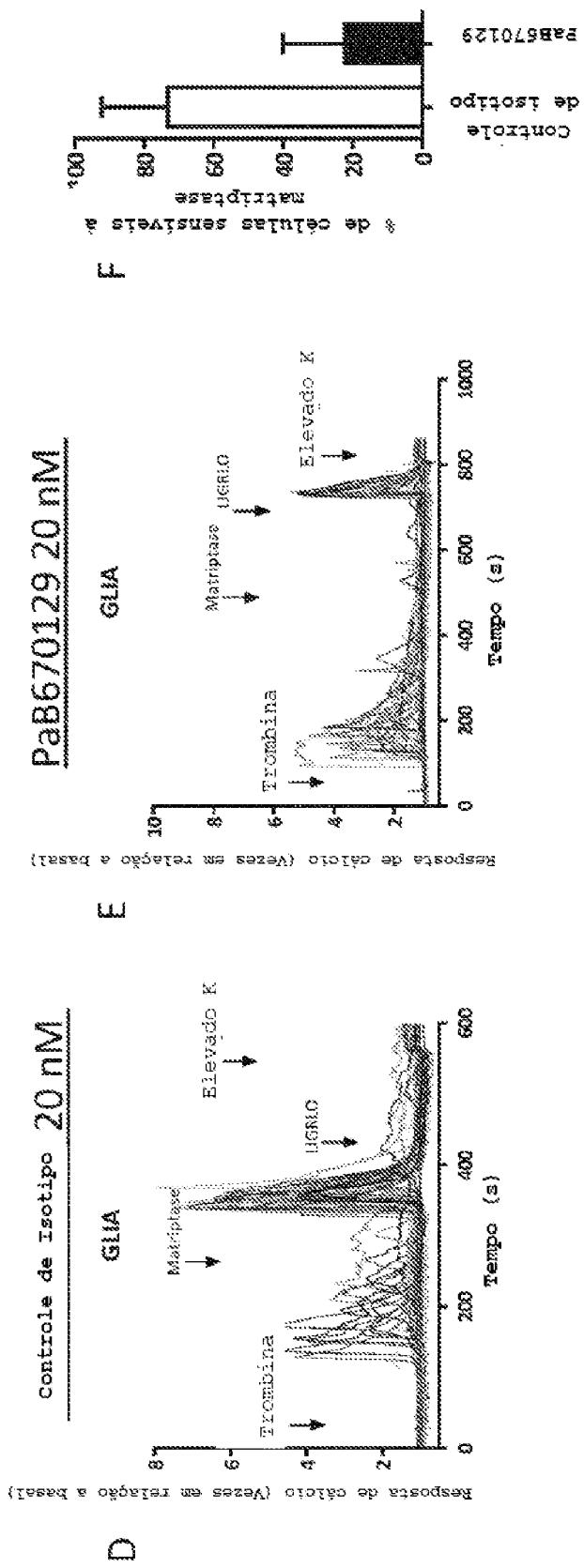
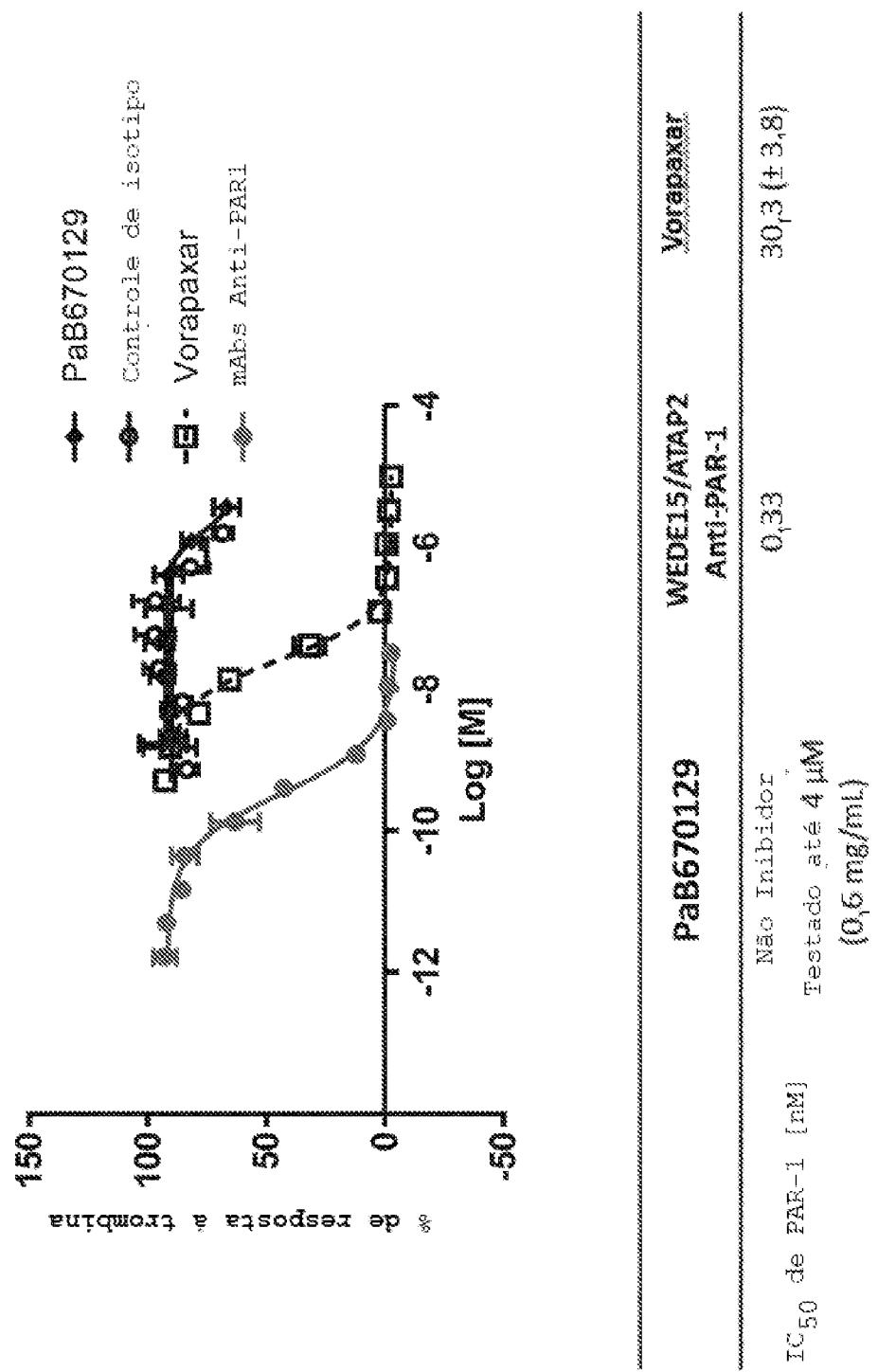


Figura 6



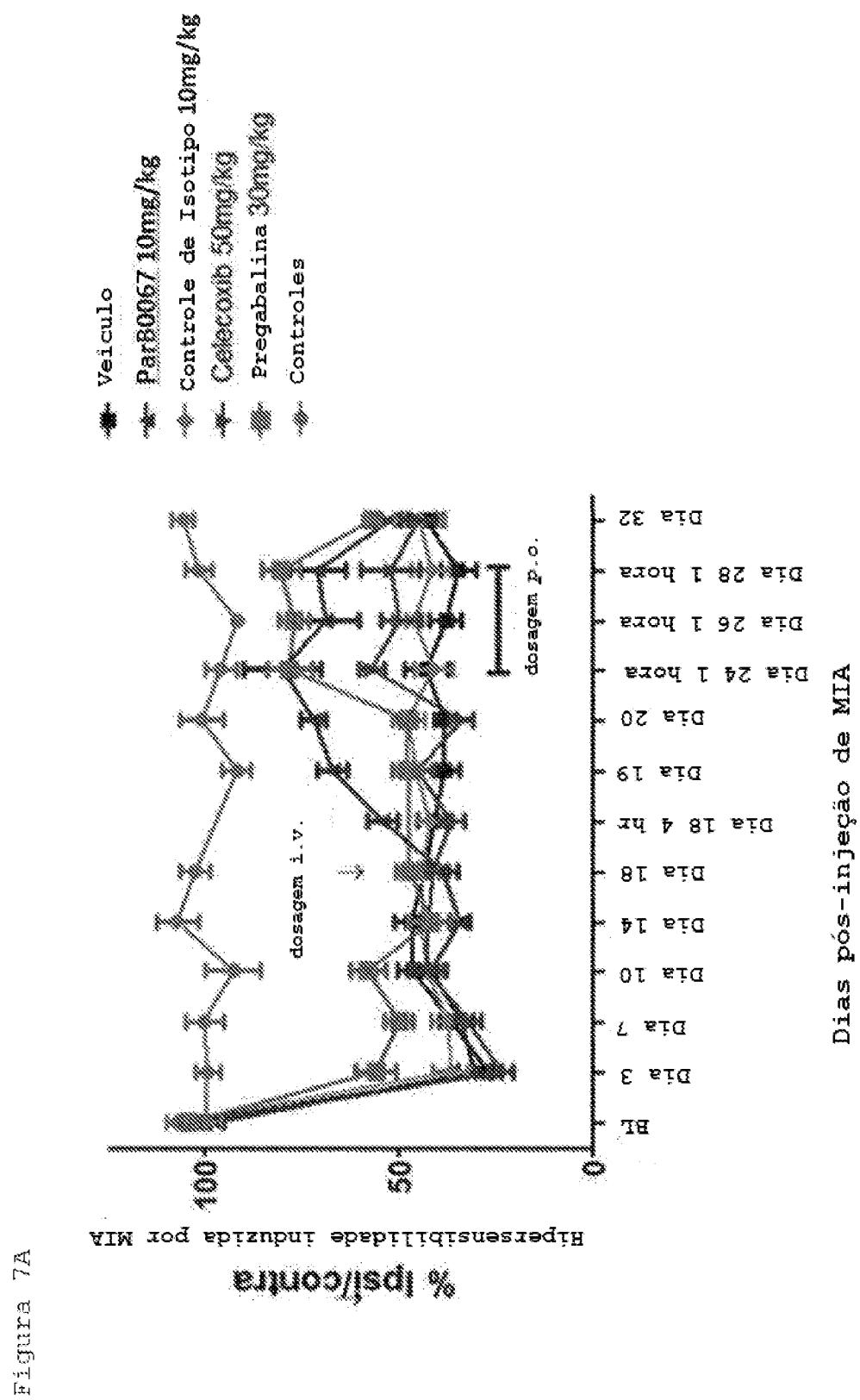
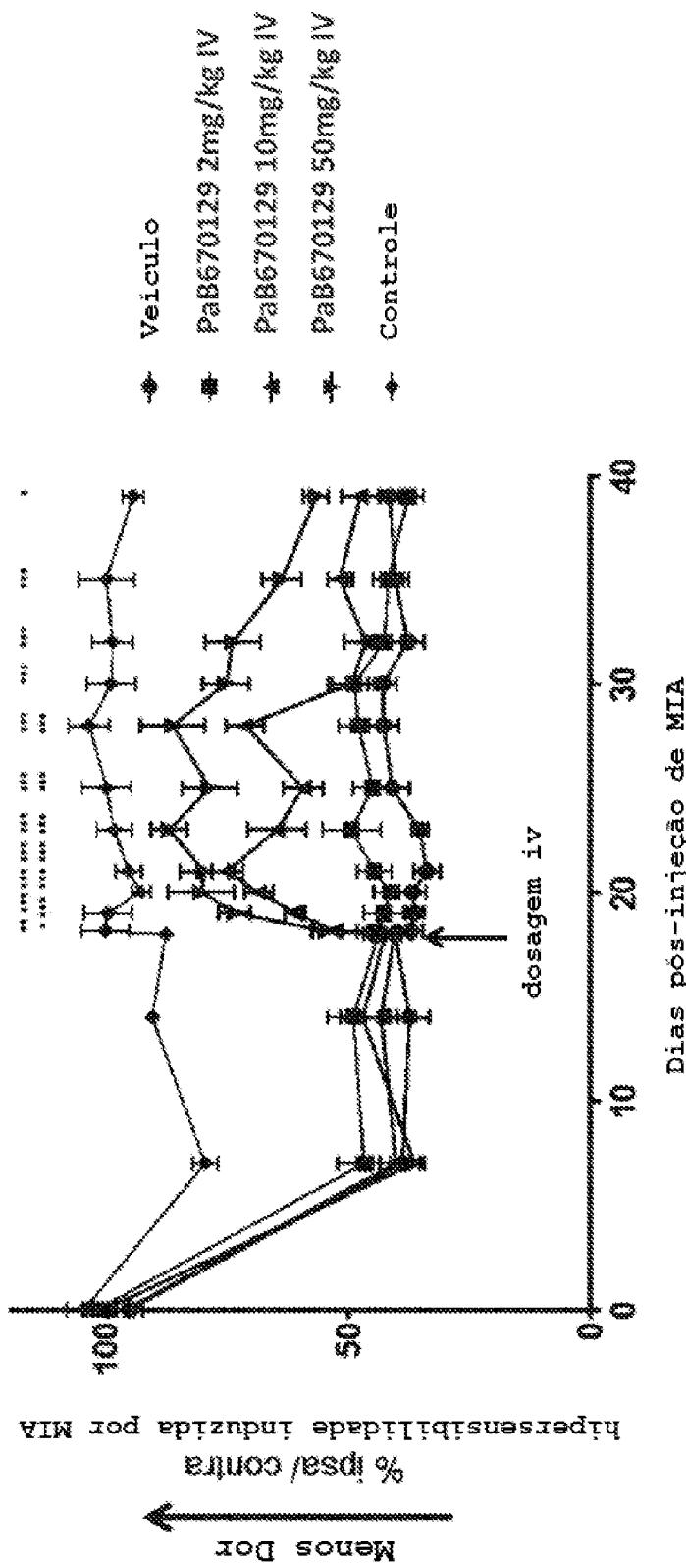
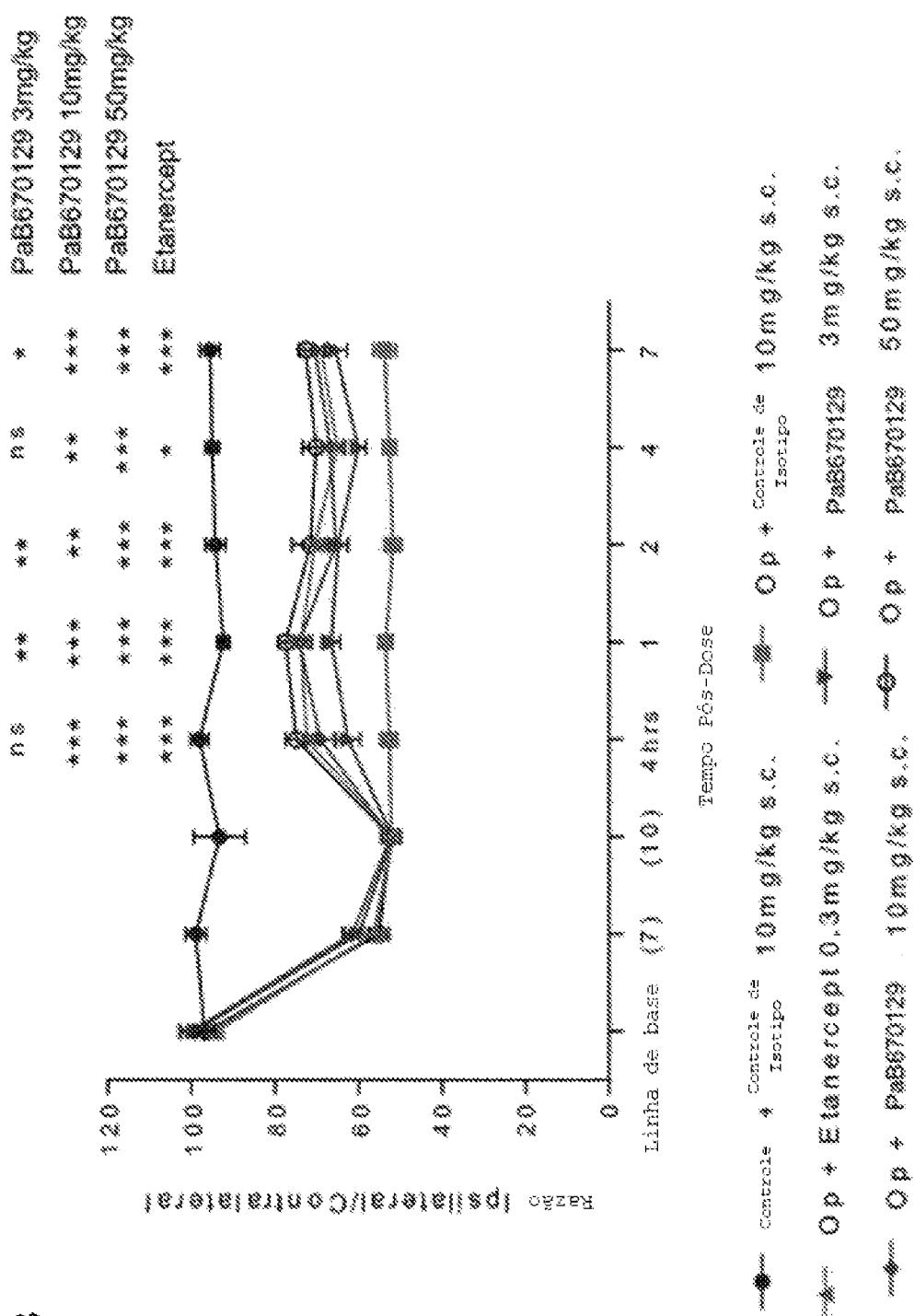


Fig 7B



Análise estatística - ANOVA de medidas repetidas, seguida por um teste de comparação planeado, usando Invivostat. Hiperalgesia significativa ($*** P<0,001$) pós-injeção de MIA com veículo a partir do dia 7 até ao dia quando comparado com linha de base e controle. $* P<0,05$, $** P<0,01$, $*** P<0,001$ Reversão significativa de hiperalgesia quando comparada com veículo em cada ponto temporal.

Fig 8



RESUMO

Patente de Invenção: "ANTICORPOS ANTI-PAR2 E SEUS USOS".

A presente descrição proporciona anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno capazes de se ligarem a PAR2. Em algumas modalidades, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno anti-PAR2 se ligam a PAR2 de uma maneira dependente do pH. A descrição proporciona adicionalmente métodos para fabricação e uso dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P241932.TXT
- Data de Geração do Código: 10/09/2019
- Hora de Geração do Código: 14:06:53
- Código de Controle:
 - Campo 1: 3339C6404CEBCAA7
 - Campo 2: 290C14C594D93D0B