

REIVINDICACIONES

1. Un péptido mutante de SPINK2 caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 61 e inhibe la actividad proteasa de KLK5 humana activa.

2. El péptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque inhibe selectivamente KLK5 humana y, opcionalmente, KLK7 o KLK14 humana.

3. El péptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque inhibe KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14.

4. El péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque Xaa16 (X_1) es Ala, Asp, Gly, Gln, Leu, Ser, o Thr; y/o caracterizado porque Xaa17 (X_2) es Arg, Glu, Asn, Gln o Ser; y/o caracterizado porque Xaa18 (X_3) es Asp, Gln, Ile, Thr, Trp o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa19 (X_4) es Arg, Gly, Met, Gln o Thr; y/o caracterizado porque Xaa20 (X_5) es Asp, Glu, Leu, Lys, Thr o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa21 (X_6) es Glu, Gly, His, Leu, Ser, Gln o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa22 (X_7) es Asp, Gly, Gln, Ser o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa24 (X_8) es Ala, Asp, Glu, Gly, Asn, Ser o Thr; y/o caracterizado porque Xaa25 (X_9) es Arg o Lys; y/o caracterizado porque Xaa26 (X_{10}) es Asp, Glu, Gln, Ser o Val; y/o caracterizado porque Xaa27 (X_{11}) es Phe o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa28 (X_{12}) es Asp o Glu.

5. El péptido de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, caracterizado porque comprende

- (i) los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20;
- (ii) los aminoácidos en las posiciones 4 a 66 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 40 y 48;

- (iii) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90% o más a la secuencia de aminoácidos de (i) o (ii); o
- (iv) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 80% o más a la secuencia de aminoácidos de (i).

6. El péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque Xaa16 (X_1) es Gly, Met, o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa17 (X_2) es Glu, Gln o Thr; y/o caracterizado porque Xaa18 (X_3) es His, Met o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa19 (X_4) es Ala, Arg, Lys o Gln; y/o, caracterizado porque Xaa20 (X_5) es Gly, Arg o Ser; y/o caracterizado porque Xaa21 (X_6) es Arg, Lys, Gln o Ser; y/o caracterizado porque Xaa22 (X_7) es Gly; y/o caracterizado porque Xaa24 (X_8) es His, Thr o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa25 (X_9) es His o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa26 (X_{10}) es Asp, Glu o His.; y/o caracterizado porque Xaa27 (X_{11}) es Tyr; y/o caracterizado porque Xaa28 (X_{12}) es Asp o Glu.

7. El péptido de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y 6, caracterizado porque el péptido comprende

- (i) los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 22, 24, 26 y 28; o
- (ii) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90% o más a la secuencia de aminoácidos de (i).

8. El péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,, caracterizado porque Xaa16 (X_1) es Gly, Ser o Tyr; y/o caracterizado porque Xaa17 (X_2) es Asp o Gln; y/o caracterizado porque Xaa18 (X_3) es Thr o Val; y/o caracterizado porque Xaa19 (X_4) es Thr o Val; y/o caracterizado porque Xaa20 (X_5) es Glu o Thr; y/o, caracterizado porque Xaa21 (X_6) es His o Thr; y/o caracterizado porque Xaa22 (X_7) es Tyr; y/o caracterizado porque Xaa24 (X_8) es Asn o Ser; y/o caracterizado porque Xaa25 (X_9) es Arg; y/o caracterizado porque Xaa26 (X_{10}) es Asp o Glu; y/o caracterizado porque Xaa27 (X_{11}) es Tyr;

y/o caracterizado porque Xaa28 (X₁₂) es Asp.

9. El péptido de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y 8, caracterizado porque comprende:

- (i) los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOs: 30 y 32;
- (ii) los aminoácidos en las posiciones 4 a 66 en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 58;
- (iii) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90% o más a la secuencia de aminoácidos de (i) o (ii); o
- (iv) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 80% o más a la secuencia de aminoácidos de (i).

10. El péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque tiene tres enlaces disulfuro y tiene una estructura tridimensional que se distingue por incluir una estructura de bucle, una hélice α y una lámina β .

11. Un polinucleótido caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos comprendida en el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Un vector caracterizado porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 11.

13. Una célula caracterizada porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 12 o el vector de conformidad con la reivindicación 12 o produce el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

14. Un método para producir un péptido mutante de SPINK2, caracterizado porque comprende los pasos (i) y (ii) a continuación:

- (i) cultivar la célula de conformidad con la reivindicación 13; y
- (ii) recolectar el péptido mutante de SPINK2 del cultivo.

15. Un método para producir el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende un paso de preparación del péptido mediante síntesis química o traducción *in vitro*.

16. Un péptido mutante de SPINK2 caracterizado porque es obtenido por el método de conformidad con la reivindicación 14 o 15.

17. Un conjugado caracterizado porque comprende el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 16, en donde el péptido está unido por uno y opcionalmente más de un resto.

18. El conjugado de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el uno o más restos opcionales comprenden un segundo péptido que no es el mutante de SPINK2.

19. El conjugado de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el segundo péptido está ubicado en el lado amino-terminal del mutante de SPINK2.o caracterizado porque el segundo péptido está ubicado en el lado carboxi-terminal del mutante de SPINK2.

20. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, caracterizado porque el segundo péptido es un anticuerpo o un fragmento del mismo y comprende una o más regiones Fc.

21. El conjugado de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la o cada región Fc es:

- (a) una región Fc de inmunoglobulina humana, o un fragmento de la misma; y/o
- (b) una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD y/o

IgE, o un fragmento de las mismas; y/o

(c) una región Fc de IgG1 humana, o un fragmento de la misma; y/o

(d) una región Fc de tipo silvestre o mutante.

22. El conjugado de conformidad con la reivindicación 21, parte (c), caracterizado porque la o cada región Fc de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 87.

23. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, caracterizado porque comprende de uno a varios ácidos aspárticos y/o ácidos glutámicos añadidos al extremo amino-terminal del mismo.

24. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos descrita en (i), (ii) o (iii) a continuación:

(i) la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOs: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 96;

(ii) la secuencia de aminoácidos comprendida en un conjugado que es 90% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (i) anteriormente e inhibe la actividad proteasa de KLK5; o

(iii) una secuencia de aminoácidos formada por la delección de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos descrita en (i) y en la que el conjugado inhibe la actividad proteasa de KLK5.

25. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, caracterizado porque el mutante de SPINK2 y el segundo péptido están unidos entre sí mediante un enlazador, preferiblemente en donde el enlazador es un tercer péptido que no es el mutante de SPINK2 ni el segundo péptido.

26. Un método para producir el conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, caracterizado porque comprende los pasos (i) y (ii) siguientes:

- (i) cultivar una célula que comprenda un polinucleótido que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique para una secuencia de aminoácidos comprendida en el conjugado o un vector en el que se inserte el polinucleótido; y
- (ii) recolectar un conjugado de péptido mutante de SPINK2 o un resto de péptido comprendido en el conjugado del cultivo.

27. Un método para producir el conjugado de péptido mutante de SPINK2 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, caracterizado porque comprende un paso de preparación del conjugado o un resto peptídico comprendido en el conjugado mediante síntesis química o traducción *in vitro*.

28. Un conjugado de péptido mutante de SPINK2, caracterizado porque es obtenido por el método de conformidad con la reivindicación 26 o 27.

29. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 y 28, en el que uno, o el único, aminoácido se elimina de un resto comprendido dentro del conjugado, y en el que el conjugado inhibe la actividad proteasa de la KLK5 humana activa.

30. Un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo caracterizado porque se une al péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 16.

31. Una composición caracterizada porque comprende el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 16, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 11, el vector de conformidad con la reivindicación 12, la célula de conformidad con la reivindicación 13, el conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, 28 y 29, y/o el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de conformidad con la reivindicación 30.

32. Una composición farmacéutica caracterizado porque comprende el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 16, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 11, el vector de conformidad con la reivindicación 12, la célula de conformidad con la reivindicación 13 y/o el conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, 28 y 29.

33. Una composición para ensayo o diagnóstico caracterizada porque comprende el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 16, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 11, el vector de conformidad con la reivindicación 12, la célula de conformidad con la reivindicación 13, el conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, 28 y 29, y/o el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de conformidad con la reivindicación 30.

34. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14, 15, 26 y 27, caracterizado porque comprende un paso de llevar a cabo purificación por afinidad usando el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de conformidad con la reivindicación 30.

35. Un método para identificar un péptido mutante de SPINK2 inhibidor de KLK5, caracterizado porque comprende los pasos (i) a (iii) a continuación:

(i) incubar una proteasa KLK5 y un sustrato en presencia y ausencia de un péptido mutante de SPINK2 de prueba;

(ii) medir la actividad proteasa de KLK5 en presencia y ausencia del péptido mutante de SPINK2 de prueba; y

(iii) determinar que el péptido sea positivo cuando la actividad proteasa de KLK5 en presencia del péptido sea menor que la actividad proteasa de KLK5 en ausencia del péptido.

36. Un método para identificar un compuesto inhibidor de KLK5,

caracterizado porque comprende los pasos (i) a (iii) a continuación, usando un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 o conjugado que comprenda el péptido como compuesto de referencia:

- (i) incubar una proteasa KLK5 y un sustrato en presencia y ausencia de un compuesto de prueba;
- (ii) medir la actividad proteasa de KLK5 en presencia y ausencia del compuesto de prueba; y
- (iii) determinar que el compuesto de prueba sea positivo cuando la actividad de proteasa de KLK5 en presencia del compuesto de prueba sea menor que la actividad de proteasa de KLK5 en ausencia del compuesto de prueba.

37. Un método para identificar un compuesto inhibidor de KLK5, caracterizado porque comprende los pasos (i) a (iii) siguientes:

- (i) medir una actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 de un compuesto de prueba;
- (ii) medir una actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 de un compuesto de referencia que sea un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 o un conjugado que comprenda el péptido; y
- (iii) determinar que el compuesto de prueba sea positivo cuando la actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 del compuesto de prueba sea equivalente o superior a la actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 del compuesto de referencia.

38. Un método para medir la actividad de la proteasa KLK5, caracterizado porque comprende los pasos (i) y (ii) a continuación, usando un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 o conjugado que comprenda el péptido como compuesto de referencia:

- (i) incubar una proteasa KLK5 con un sustrato y, opcionalmente, otro componente; y

(ii) medir una cantidad de sustrato y/o una cantidad de un producto después del paso (i).

39. Un péptido mutante de SPINK2 inhibidor de KLK5 o un péptido conjugado de péptido mutante de SPINK2, caracterizado porque tiene una constante de disociación (K_D) para KLK5, medida por análisis de resonancia de plasmón de superficie inmovilizando el péptido o el conjugado y agregando KLK5, de 1×10^{-9} M o menos.

40. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34.

41. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36.

42. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 38 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 38.

43. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40.

44. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 42 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos

expuesta en SEQ ID NO: 42.

45. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 44 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 44.

46. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46.

47. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48.

48. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 50 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 50.

49. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 52 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 52.

50. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54.

51. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 56 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 56.

52. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58.

53. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 60 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 60.

54. Un conjugado caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 96 o una secuencia de aminoácidos formada por la eliminación de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 96.

55. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 54, en el que un aminoácido se elimina de la secuencia de aminoácidos del conjugado, preferiblemente en el que el aminoácido se elimina de un resto comprendido dentro del conjugado, y en el que el conjugado inhibe la actividad proteasa de la KLK5 humana activa.

56. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 40 a 55.