

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 712**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08156593 .9**
96 Fecha de presentación: **17.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1961767**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Diagnóstico y tratamiento de cánceres y otras afecciones**

30 Prioridad:
17.01.2001 AU PR257901
22.06.2001 AU PR589001
22.06.2001 AU PR589101
03.09.2001 AU PR743001
03.09.2001 AU PR743101

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

73 Titular/es:
Biosceptre International Limited
Suite 3.08 56 Delhi Road
North Ryde, NSW 2113 , AU

72 Inventor/es:
Gidley-Baird, Angus y
Barden, Julian Alexander

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

ES 2 383 712 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y tratamiento de cánceres y otras afecciones.

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere al diagnóstico y tratamiento de enfermedades, incluyendo cánceres. Los tipos de enfermedades con los que está relacionada esta invención incluyen cánceres derivados de células epiteliales y linfoma maligno. La memoria también describe otras afecciones, tales como estados preneoplásicos, síndrome de intestino irritable e infecciones víricas y otras. Es muy posible que la invención también sea aplicable a otras enfermedades y afecciones.

ANTECEDENTES

15 La adenosina trifosfato (ATP) puede activar receptores purinérgicos regulados por ligando conocidos como receptores P2X. Se han identificado los subtipos de receptor P2X₁ a P2X₇. Se sabe que diferentes subtipos de receptor P2X están presentes en muchas células, incluyendo células epiteliales y leucocitos, que incluyen linfocitos, timocitos, macrófagos y células dendríticas.

20 Los receptores P2X son permeables a iones de calcio así como a algunos otros cationes, tales como potasio y sodio. Un flujo de entrada de iones de calcio en una célula a través de un receptor P2X puede asociarse con muerte celular.

25 Se piensa que el subtipo P2X₇ está implicado en la apoptosis o muerte celular programada en muchos tipos celulares. En presencia de ATP, el receptor P2X₇ expresado en la superficie de una célula es capaz, en un segundo, de abrir canales de calcio a través de la membrana celular. La exposición continua a ATP puede conducir a la formación de grandes poros, en un intervalo de unos pocos segundos a diez segundos, que permiten que la célula se sature con un exceso de calcio, induciendo la apoptosis.

30 Las secuencias de aminoácidos de los receptores P2X₇ humano y de rata se conocen, por ejemplo, de la patente US N° 6.133.434 (Buell et al.). Remítase también a la Figura 1 en este documento.

35 Generalmente, la exposición a ATP no da como resultado una apoptosis en el caso de células cancerosas epiteliales, por ejemplo. Se ha descubierto que dichas células expresan receptores P2X₇ que son incapaces de formar poros. Éstos se consideran receptores no funcionales.

40 En líneas celulares de cáncer humano, tales como PC3 de próstata y MCF7 de mama, así como en líneas celulares animales que incluyen hibridomas de roedores, el receptor P2X₇ se encuentra en la superficie celular en una conformación no funcional.

Las células B de pacientes con linfoma maligno expresan receptores P2X₇ no funcionales. El linfoma se desarrolla a partir de clones malignos que escapan a la destrucción citolítica. Este proceso conduce a la acumulación progresiva de linfocitos B malignos y, por lo tanto, a linfadenopatía y/o esplenomegalia.

45 La memoria describe una sonda para la detección de una enfermedad o afección, estando la sonda adaptada para distinguir entre receptores P2X₇ funcionales y receptores P2X₇ no funcionales. Preferiblemente, la sonda distingue entre receptores P2X₇ funcionales y no funcionales mediante detección de un cambio en relación con la unión de adenosina trifosfato (ATP) a los receptores, o por detección de un cambio en la unión de una o más proteínas necesarias para la formación de poros en receptores P2X₇. En una realización alternativa, la sonda detecta una o más partes del receptor P2X₇ expuestas en ausencia de ATP unido. Dicha parte de receptor puede incluir un monómero de P2X₇.

50 La memoria también describe un método para detectar una enfermedad o afección, incluyendo el método las etapas de usar la sonda de la invención para distinguir entre receptores P2X₇ funcionales y receptores P2X₇ no funcionales, proporcionar un perfil de expresión de receptor, y comparar el perfil de expresión de receptor con el de un perfil normal. El cambio puede detectarse, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente en relación con la propia sonda.

55 La sonda puede ser natural o artificial. Preferiblemente, la sonda es un anticuerpo que puede ser policlonal, monoclonal, recombinante, un anticuerpo humanizado o un fragmento apropiado del mismo. El anticuerpo se dirige preferiblemente contra un epítipo localizado en un dominio extracelular adyacente a un sitio para la unión a ATP. En el caso de receptores P2X₇ humanos, la sonda está preferiblemente adaptada para distinguir entre receptores funcionales que tienen una secuencia en la que la prolina del aminoácido 210 está en la conformación trans y receptores no funcionales que tienen una secuencia en la que la prolina del aminoácido 210 está en la conformación cis.

60 La sonda puede prepararse usando cualquier técnica adecuada, como será fácilmente evidente para un experto en

la materia.

5 La sonda puede distinguir entre receptores funcionales y no funcionales mediante la detección de otros cambios conformacionales que ocurren en un sitio para unión a ATP. Por ejemplo, el cambio detectado puede ser en un aminoácido distinto de la prolina mencionada anteriormente. Un ejemplo de dicho aminoácido es Pro 199. Como otro ejemplo, el cambio detectado puede ser en algún otro sentido.

10 La sonda también puede estar adaptada para detectar otras regiones del receptor P2X₇ no modificadas por el estado funcional. La conformación de las subunidades monoméricas que carecen de ATP unido puede ser detectable usando la sonda, puesto que el epítipo seleccionado puede detectar específicamente la forma de una región de la superficie del receptor accesible solamente cuando no está unido el ATP. La sonda puede detectar un cambio en la unión de una o más proteínas, tales como proteínas accesorias u otras, necesarias para la formación de poros. Ejemplos no limitativos de dichas proteínas son la laminina, la integrina, la beta-actina, la alfa-actinina y la supervilina.

15 En la presente invención, puede usarse un anticuerpo específico de subtipo P2X₇ para detectar específicamente o unirse a receptores P2X₇ no funcionales expresados en o sobre células que forman parte de tejido preneoplásico, tejido neoplásico muy temprano, tejido neoplásico avanzado y sobre cualquier célula neoplásica que exprese receptores P2X₇ no funcionales. Por lo tanto, el receptor P2X₇ se detecta o se une solamente cuando está en la conformación regulada cerrada o no funcional, aun cuando puede expresarse normalmente en las membranas celulares y de otro modo puede ser parcialmente capaz de funcionar como un canal.

20 Además, la conformación de las subunidades monoméricas que carecen de ATP unido también es detectable con el anticuerpo, porque el epítipo seleccionado detecta específicamente la forma de una región de la superficie accesible solamente cuando no está unido el ATP.

25 Los receptores P2X₇ no funcionales pueden detectarse o unirse mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra un epítipo que experimenta un cambio conformacional a partir de la estructura presente en receptores funcionales. Se ha descubierto que la secuencia de aminoácidos de los receptores no funcionales puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de receptores funcionales, de modo que la causa del cambio conformacional en los receptores está relacionada con la interacción de los receptores con ATP. Como se ha expuesto anteriormente, las moléculas de ATP actúan como agonistas del receptor, de modo que cuando se une ATP a los receptores, estos son capaces de abrir un canal a través de la membrana celular para el flujo de entrada de iones de calcio. Por lo tanto, la no funcionalidad está causada por una ausencia de unión apropiada de los agonistas de ATP a los receptores, por razones que pueden incluir un déficit en la disponibilidad local de ATP por un déficit de producción o un aumento en la velocidad de degradación. Si se interrumpe altera la unión de ATP a los receptores, se altera la conformación del receptor. Esto puede detectarse mediante el uso de un anticuerpo especialmente diseñado para unirse a la región de la proteína afectada por la unión del ATP.

30 En el caso de receptores P2X₇ humanos, la secuencia específica implicada en el cambio conformacional puede incluir la Pro210, que experimenta un cambio en la conformación de la forma trans a la forma cis en ausencia de ATP unido. Por lo tanto, en el caso de receptores humanos, una secuencia de epítipo apropiada contra la que debe generarse un anticuerpo puede incluir la Pro210, y puede abarcar cualquier lado de este residuo, en un grado apropiado necesario para inducir una respuesta de anticuerpos.

35 A modo de ejemplo no limitativo, ésta puede incluir un segmento que abarque desde la Gly200 al Thr215. Además, puede usarse un segmento homólogo de otros mamíferos, tal como rata, en el que éste presenta reactividad cruzada con tejido humano. Como ejemplo, puede usarse el mismo segmento Gly200 a Thr215 de rata, aunque existen dos sustituciones de aminoácidos en la secuencia de rata en comparación con la secuencia humana (remítase a la patente US N° 6.133.434, por ejemplo).

40 En el caso de receptores no humanos, la secuencia específica puede determinarse mediante un experimento adecuado.

45 La detección de receptores P2X₇ no funcionales de acuerdo con la invención puede mostrar un patrón de distribución en el que los receptores funcionales (y, por lo tanto, las células normales) pueden quedar esencialmente sin marcar. Sin embargo, pueden detectarse conformaciones no funcionales de receptores P2X₇, inicialmente en los núcleos y citoplasmas de las células, en una fase muy temprana en preneoplasia. Por ejemplo, en el caso de cáncer de células epiteliales, usando el método de la invención puede ser posible detectar una preneoplasia varios años antes de la aparición patológica normal de cáncer como se detecta mediante portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina ("H y E") de tejidos biopsiados. Por lo tanto, pueden detectarse cánceres tales como el de próstata, piel y mama mucho antes de lo que actualmente es el caso, con las ventajas de la introducción de una terapia temprana.

50 El alcance completo de las enfermedades y afecciones que pueden detectarse mediante la sonda y el método descritos en el presente documento no se ha determinado todavía. Sin embargo, se piensa que éstas incluyen cánceres de células epiteliales, tales como cánceres de próstata, mama, piel, pulmón, cuello uterino, útero, estómago, esófago, vejiga, colon y vagina, así como cánceres sanguíneos incluyendo linfoma maligno, síndrome de

intestino irritable e infección por virus, tal como VIH, u otros organismos patológicos, tales como Mycobacterium tuberculosis. Una infección puede provocar que se expresen receptores no funcionales directamente por inhibición de los cofactores necesarios para la funcionalidad, o mediante la regulación positiva de los cofactores que actúan inhibiendo la función de P2X₇ en células epiteliales u otras, volviendo de este modo a la célula infectada menos susceptible a la destrucción por apoptosis.

A menos que se indique otra cosa, la expresión “enfermedad o afección”, como se usa en este documento, pretende incluir todas las enfermedades y afecciones específicas expuestas en el párrafo anterior.

En el caso específico de síndromes de intestino irritable (“IBS”), se ha descubierto ahora que, en pacientes con esta afección, la mucosa intestinal, que normalmente expresa receptores P2X₇ en los linfocitos ampliamente distribuidos presentes en el estroma bajo el epitelio, se vuelve regulada positivamente (en inglés “*up-regulated*”). En pacientes afectados, esta expresión aumentada puede observarse desde el duodeno hasta la mucosa rectal. La expresión aumentada puede encontrarse en regiones aisladas o puede estar aumentada en general a lo largo de la longitud completa del tracto intestinal en casos más extremos.

En los casos menos afectados, los receptores P2X₇ totales están regulados positivamente, pero todos éstos son funcionales y no penetran en el epitelio. En casos más graves, la expresión total del receptor P2X₇ es incluso mayor y las áreas más afectadas del intestino presentan receptores que no son funcionales. Éstos pueden localizarse en la mucosa del ciego, por ejemplo, y pueden penetrar en el epitelio. Los casos más graves son aquellos en los que la expresión total del receptor P2X₇ está adicionalmente aumentada y la mayoría de los receptores son no funcionales con una penetración celular epitelial aumentada.

Como se ha analizado anteriormente, la no funcionalidad de receptores P2X₇ está causada por la ausencia de una unión apropiada del agonista de ATP a los receptores. Las razones para esto pueden incluir un déficit en la disponibilidad local de ATP por un déficit de producción o un aumento en la velocidad de degradación por la degradación enzimática de ATP por ecto-ATPasa. Si se interrumpe la unión de ATP a los receptores, se altera la conformación del receptor, como ya se ha analizado, y esto puede detectarse usando la sonda de la invención. Sin embargo, la detección de la distribución total de receptor P2X₇ se consigue mejor usando un epítipo contra otras regiones del dominio extracelular del receptor P2X₇ que no estén afectadas por la unión de ATP.

Como ya se ha descrito en el presente documento, se pueden usar uno o dos anticuerpos específicos de subtipo P2X₇ para distinguir específicamente entre distribución total de P2X₇ y la proporción de receptores que no son funcionales y se expresan en la mucosa intestinal. Por lo tanto, los dos anticuerpos usados juntos pueden detectar tanto el recuento total de receptor como aquellos canales de receptores presentes solamente en una conformación regulada cerrada o no funcional. El primer anticuerpo está adaptado para detectar expresión total de receptor P2X₇. La sonda que comprende o está unida al anticuerpo de la invención puede proporcionar el segundo anticuerpo para la detección de IBS, no sólo distinguiendo entre receptores P2X₇ funcionales y no funcionales, sino también permitiendo la detección de otras regiones en las que el receptor no cambie por el estado funcional. Los anticuerpos pueden usarse por separado o juntos. Preferiblemente, se usan en combinación.

La detección de todos los receptores P2X₇, por separado de receptores P2X₇ no funcionales, determina la gravedad de la afección. La expresión de receptores P2X₇ no funcionales en la mucosa gastrointestinal se produce en un patrón en el que las células normales quedan esencialmente sin marcar. Por lo tanto, la conformación no funcional de P2X₇ se detecta primero en el estroma bajo el epitelio, variando de parches aislados en casos leves del síndrome a expresión considerable a lo largo de toda la longitud del tracto gastrointestinal con parches aislados de infiltración de receptores no funcionales en el epitelio.

La memoria describe un método de diagnóstico del síndrome de intestino irritable, que comprende detectar el perfil de expresión de P2X₇ de células y/o tejido y comparar el perfil con un perfil de expresión predeterminado de células y/o tejido normal. Preferiblemente, la detección del perfil de expresión de P2X₇ incluye el uso de uno o más anticuerpos. Además, se prefiere que dicho anticuerpo o anticuerpos sean diferentes de la sonda de la invención, en el sentido de que no detecten cambios en relación con la unión de ATP a los receptores P2X₇. La preparación de dichos anticuerpos será fácilmente evidente para un experto en la materia.

La memoria describe el uso de uno o más anticuerpos para diagnosticar el síndrome de intestino irritable.

El diagnóstico puede usarse en microscopia convencional empleando técnicas inmunohistoquímicas convencionales.

El tratamiento terapéutico para esta afección se analiza a continuación, en relación con el tercer aspecto de esta invención.

El diagnóstico usando la sonda y el método descritos en el presente documento puede llevarse a cabo usando técnicas de formación de imágenes in situ para detectar la distribución en tejidos corporales. Además, puede usarse microscopia convencional, microscopia confocal y separación de células activadas por fluorescencia. Pueden usarse técnicas inmunohistoquímicas normales para ensayar biopsias de linfa, próstata, mama, piel, pulmón, útero, vejiga, cuello uterino, estómago, esófago y similares, también aspiraciones con aguja fina de mama y otros tejidos y frotis

de células, tales como las tomadas para la detección de cáncer cervical. Pueden usarse otras técnicas con la sonda y el método descritos en el presente documento.

5 Esta memoria describe un anticuerpo para tratar una enfermedad o afección, estando el anticuerpo adaptado para distinguir entre receptores P2X₇ funcionales y receptores P2X₇ no funcionales, y estando adaptado para unirse solamente a receptores no funcionales. Preferiblemente, el anticuerpo distingue entre los receptores funcionales y no
10 funcionales mediante detección de un cambio en relación con la unión de adenosina trifosfato (ATP) a los receptores, o mediante detección de un cambio en la unión de una o más proteínas necesarias para la formación de poros en receptores P2X₇, y estando adaptado para unirse solamente a receptores no funcionales. En otra
realización, el anticuerpo distingue entre receptores funcionales y no funcionales mediante detección de partes del receptor expuestas en ausencia de ATP unido.

15 El anticuerpo para tratar enfermedades y afecciones puede ser el mismo que el anticuerpo que puede usarse como la sonda para diagnosticar enfermedades y afecciones. Dicho anticuerpo podría usarse para tratar tópicamente cánceres de piel, por ejemplo. Para el tratamiento sistémico del cáncer, el anticuerpo o sus fragmentos activos deberían humanizarse para minimizar los efectos secundarios por respuestas inmunes indeseables.

20 El anticuerpo descrito en el presente documento puede usarse para tratar enfermedades o afecciones en mamíferos, incluyendo seres humanos. Ejemplos de enfermedades o afecciones en relación con la sonda descrita en el presente documento han sido indicadas arriba.

25 La memoria describe un epítipo capaz de causar la generación del anticuerpo de la invención. El epítipo incluye preferiblemente la Pro210 y abarca el segmento Gly200 a Thr215 (en la secuencia de P2X₇ del receptor humano). Preferiblemente, el epítipo debería tener unido en el extremo C-terminal un residuo de Cys que se entrecruza con la
toxina diftérica mediante el reticulador químico maleimidocaproyl-N-hidroxisuccinimida (MCS), de modo que la conformación adoptada por el péptido epitópico unido ocupa una configuración de prolina en cis estable.

30 Esta conformación peptídica específica está destinada a presentarse a seres humanos o animales con una o más enfermedades o afecciones, especialmente cánceres de células epiteliales, tales como cánceres de próstata, mama, piel, pulmón, cuello uterino, útero, estómago, esófago; vejiga, colon y vagina, así como linfoma maligno, síndrome de
intestino irritable e infecciones por virus, tales como el VIH, u otros organismos patológicos, tales como Mycobacterium tuberculosis. Preferiblemente, el paciente montará una respuesta inmune contra el epítipo conjugado aplicado y, de este modo, generará anticuerpos que reconocen los receptores P2X₇ no funcionales
35 presentes sobre la superficie de las células afectadas, uniéndose por lo tanto a los mismos y alertando a la célula inmune apropiada para destruir las células que estén formando complejos. También pueden afectarse otras células sensibilizadas para muerte celular.

40 Debe entenderse que la secuencia a la que se ha hecho referencia anteriormente no es limitante del alcance de la invención, que incluye secuencias alternativas y portadores y reticuladores que producen de forma similar una respuesta inmune específica, preferiblemente sólo contra receptores P2X₇ no funcionales, ignorando preferiblemente todos los receptores funcionales expresados en superficies celulares y, de este modo, evitando efectos secundarios.

45 La invención también describe el uso del anticuerpo descrito en el presente documento como un vehículo terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o afección en un paciente para regular la muerte celular programada, mediante direccionamiento de receptores P2X₇ anormales o no funcionales expresados en la superficie de células, al tiempo que deja sin tocar todas las células que expresan receptores normales (funcionales). La memoria describe el uso del epítipo de la invención para causar la generación del anticuerpo, como arriba.

50 La memoria describe una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección en un paciente, incluyendo la composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo, o un epítipo para causar la generación de dicha cantidad, capaz de regular la muerte celular programada de células que expresan en su superficie receptores P2X₇ anormales o no funcionales.

55 La cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo o epítipo variará de acuerdo con el paciente y la naturaleza de la enfermedad o afección. Estas variables pueden ser determinadas por un experto en la materia.

60 La composición farmacéutica puede administrarse junto con un portador farmacéuticamente aceptable, que puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica o concebidos a continuación, y adecuados para el uso deseado. Además de portadores, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir otros ingredientes incluyendo colorantes, conservantes, tampones y antioxidantes, por ejemplo.

La composición farmacéutica puede adoptar cualquier forma deseada y puede administrarse, por ejemplo, en forma de una pomada, crema, solución, suspensión, polvo, comprimido, cápsula, supositorio u óvulo vaginal.

65 La composición farmacéutica puede administrarse en cualquier forma adecuada, que puede incluir administración oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea o tópica.

La memoria describe el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un paciente, que incluye la administrar al paciente una composición farmacéutica de acuerdo con lo descrito en el presente documento.

5 Tal y como se define en las reivindicaciones, la invención también proporciona el uso de la composición farmacéutica de la invención en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un paciente.

10 Será evidente para un experto en la materia que puede ser necesario alterar el patrón de uso de la composición farmacéutica de la invención para un efecto óptimo. Puede ser necesario tener en cuenta la naturaleza de la enfermedad o afección, así como su gravedad.

15 La memoria describe la expresión de ATPasas (enzimas) que controlan el suministro de ATP a receptores P2X₇, por ejemplo en las células B de un paciente de que tiene un linfoma maligno. La apertura del canal de receptores P₂X₇ en leucocitos finaliza mediante la hidrólisis rápida de un agonista de ATP por ecto-ATPasas y ecto-ATPdifosfohidrolasas (ecto-ATPDasas). Estas enzimas regulan numerosos procesos fisiológicos que son dependientes de ATP. La especificidad de sustrato de la actividad ATPasa y ATPDasa en linfocitos indica la presencia en los linfocitos de más de un tipo sobre la superficie celular, incluyendo CD39. La proliferación de una o más de estas ATPasas o ATPDasas podría limitar el suministro del ATP necesario para controlar la formación de poros de P2X₇ y la posterior muerte celular programada necesaria para regular el número de células B.

20 De forma similar, se piensa que en el caso de IBS, la proliferación de ATPasas puede contribuir a una ausencia de unión apropiada del ATP agonista a los receptores P2X₇.

25 Por consiguiente, en este tercer aspecto, la memoria describe una preparación para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección en un paciente, incluyendo la preparación una o más sustancias adaptadas para regular la expresión de ATPasas que controlan el suministro de ATP a receptores P2X₇ en células o tejidos del paciente. La memoria describe el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un paciente, que incluye la etapa de administrar al paciente una preparación que incluye una o más sustancias adaptadas para regular la expresión de ATPasas que controlan el suministro de ATP a receptores P2X₇ en las células o tejido del paciente.

30 Ejemplos de dichas ATPasas pueden ser CD39 o CD73.

35 Dicha sustancia puede adoptar la forma de un análogo de ATP, preferiblemente no hidrolizable y específico de P2X₇ u otra sustancia que inhibe la acción de ATPasas locales que reducen la disponibilidad de ATP para el sitio de unión de P2X₇. La preparación puede estar en forma de un anticuerpo humanizado dirigido específicamente contra receptores P2X₇ no funcionales.

40 La enfermedad o afección es preferiblemente un linfoma maligno o IBS, pero la invención también puede abarcar otras enfermedades o afecciones, incluyendo otros cánceres de células epiteliales o sanguíneos o infecciones víricas y otras patológicas.

45 En el caso de un linfoma maligno, las ATPasas controlan el suministro local de ATP a los receptores P2X₇ para reducir la concentración de ATP disponible para unirse a los receptores P2X₇ y, de este modo, desactivarlos conduciendo a una reducción significativa de la muerte programada de células B. Estas ATPasas pueden expresarse específicamente en la superficie de las células B y parecen estar reguladas positivamente en el linfoma maligno. Preferiblemente, puede usarse la aplicación de un inhibidor de ATPasa específico para regular la disponibilidad de ATP en los receptores P2X₇, regulando de este modo la muerte programada de células B.

50 Para el tratamiento del linfoma maligno, la sustancia puede incluir un agonista sintético capaz de bloquear ATPasas o ATPDasas de la forma de un agonista de P2X₇ no hidrolizable.

55 En relación con el síndrome de intestino irritable, la administración de la preparación de la invención pretende restaurar la función del receptor que puede estar reducida por la hiperactividad del músculo subyacente a la región de mucosa afectada. La preparación descrita en el presente documento puede actuar sobre la mucosa directamente para eliminar estos receptores no funcionales y, por lo tanto, restaurar los mecanismos secretores gastrointestinales locales normales. El tratamiento terapéutico va dirigido a restaurar el suministro local de ATP a los receptores no funcionales, de modo que se restaure la función del receptor normal. Las consecuencias del control de la función del receptor incluyen la restauración del control normal de las secreciones gastrointestinales y la peristalsis. Esto puede conseguirse por aplicación de suministro enteral o sistémico de un agonista sintético específico de P2X₇, preferiblemente no hidrolizable por ATPasas, mediante aplicación sistémica de un anticuerpo dirigido contra receptores P2X₇ no funcionales, preferiblemente un anticuerpo específico humanizado pequeño para eliminar los receptores no funcionales, dejando solamente receptores funcionales.

65 Si las anomalías de la peristalsis en el músculo liso subyacente son responsables de la reducción de la disponibilidad local de ATP para unirse a los receptores P2X₇ normales, el tratamiento puede implicar la restauración de este suministro natural de agonista por medio de un límite en la captación o uso de ATP por el músculo liso mediante aplicación de un tratamiento para limitar temporalmente la motilidad intestinal.

La memoria también describe una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o afección, incluyendo la composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de una o más sustancias adaptadas para regular la expresión de ATPasas (enzimas) que controlan el suministro de ATP a receptores de P2X₇

La memoria describe tales aplicaciones similares que podrían llevarse a cabo en otras afecciones médicas en las que están implicados receptores P2X₇ anormales, como resultado de una infección vírica en la que el virus está protegido en la célula infectada por regulación positiva de un receptor P2X₇ no funcional, o cuando dichos receptores estén regulados positivamente a partir de la condición celular normal.

La memoria describe el tratamiento del síndrome de intestino irritable que comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente.

La memoria describe el uso de dicha composición farmacéutica en el tratamiento del síndrome de intestino irritable.

Puede ser necesario alterar el patrón de uso de uno o más de los agentes farmacéuticamente eficaces anteriores para un efecto óptimo.

Expresado de otra forma, la memoria describe el tratamiento del síndrome de intestino irritable, que incluye administrar una composición adaptada para restaurar la función del receptor P2X₇. La función del receptor puede haberse reducido por hiperactividad del músculo subyacente a la región de mucosa afectada. La composición puede ser igual que la indicada anteriormente para la sustancia incluida en la preparación de la invención.

En un aspecto adicional, la memoria describe un procedimiento para distinguir entre diferentes conformaciones de proteínas mediante el uso de un epítipo capaz de causar la generación de un anticuerpo, o el propio anticuerpo, para lograr efectos farmacéuticos específicos (inmunización activa así como pasiva) a partir de la unión a todos los miembros de las proteínas con una conformación seleccionada. Un ejemplo de esto serían proteínas priónicas en la conformación que conduce a la afección vCJD. La forma anormal de la proteína podría fijarse como objetivo de un anticuerpo específico, o epítipo que cause la generación del anticuerpo, preferiblemente humanizado y reducido en tamaño para un efecto farmacológico óptimo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos del receptor P2X₇ humano (técnica anterior). Las secuencias 65 a 81 y 200 a 216 están resaltadas y se hace referencia a las mismas a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para generar el anticuerpo contra P2X₇ no funcional, el epítipo usado fue la secuencia 200 a 216 de la Figura 1, que contiene una Cys en la posición 216.

Para generar el anticuerpo contra P2X₇ tanto funcional como no funcional, el epítipo usado fue la secuencia 65 a 81 de la Figura 1, a la que se añadió una Cys N-terminal.

Los residuos de Cys sobre los epítopos se acoplaron mediante un reticulador maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS) a un portador de toxina diftérica (DT) con diez epítopos peptídicos unidos a cada portador de DT para mantener la estabilidad conformacional y proporcionar una estructura antigénica mayor. Estos epítopos conjugados se usaron como antígenos para inyección en varias especies animales (oveja, conejo y ratón) para generar anticuerpos específicos contra los epítopos de la forma habitual.

El procedimiento para generar anticuerpos está bien documentado en la técnica anterior mediante el uso de mezclas de antígeno/adyuvante inyectadas en animales en momentos particulares. Se exponen a continuación ejemplos específicos para generar los anticuerpos:

Ejemplo 1

Anticuerpos de oveja anti-P2X₇

Se diluyeron 500 µg de conjugado (aproximadamente 100 µg de epítipo de P2X₇) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta 0,8 ml y se emulsionaron con 1,2 ml de adyuvante completo de Freund. La emulsión de antígeno/adyuvante se inyectó a ovejas en múltiples sitios tanto por vía subcutánea como intramuscular. Ocho semanas después, a las ovejas se les inyectó de nuevo la misma cantidad de conjugado emulsionado con adyuvante incompleto de Freund en múltiples sitios. Esto se repitió 4 semanas después y a los animales se les extrajo sangre de la vena yugular. Se ensayó en el suero recogido la especificidad a anticuerpo. Después, las ovejas recibieron inyecciones y se les extrajo sangre de forma rutinaria a intervalos de ocho semanas para proporcionar una combinación de suero que contenía los anticuerpos específicos.

A otras ovejas se les inyectó la misma dosis de antígeno conjugado similar al programa anterior pero se usó un adyuvante diferente. En estos animales, se mezclaron 0,7 ml del antígeno diluido con 0,1 ml de una solución Quill A/DEAE dextrano (2,5 mg de Quill A + 25 mg de DEAE dextrano por ml de PBS) y 1,2 ml de ISA50 Montanide. La emulsión se inyectó en múltiples sitios tanto por vía subcutánea como intramuscular. Los anticuerpos producidos usando este adyuvante produjeron las mismas especificidades que los producidos usando el adyuvante de Freund.

Ejemplo 2

Anticuerpos de conejo anti-P2X₇

Se generaron anticuerpos en conejos usando los mismos dos adyuvantes que con la oveja y los mismos programas de inyección, siendo la única diferencia que se usaron cantidades de 300 µg del conjugado para la inyección. Los anticuerpos generados tenían las mismas especificidades que los producidos en la oveja y podían discriminar fácilmente entre los epítomos contra los que se generaron.

Ejemplo 3

Anticuerpos de ratón anti-P2X₇

Se generaron anticuerpos en ratón contra los epítomos conjugados y también contra el epítomo no conjugado del epítomo P2X₇ no funcional (que es capaz de discriminar receptores que no pueden formar poros y, por lo tanto, no logran ser apoptóticos).

En estos experimentos, el adyuvante usado fue el producto QIAGEN Pty Ltd, IMMUNEASY™, que contiene el producto inmunoestimulador CpG DNA (marca registrada de Coley Pharmaceutical Group Inc.).

Se diluyeron 5 µg de epítomo o epítomo conjugado en 70 µl de PBS y 30 µl de adyuvante IMMUNEASY™. A los ratones se les inyectó en múltiples sitios por vía subcutánea e intramuscular. Este régimen se repitió dos semanas después y de nuevo dos semanas más tarde. Se les extrajo sangre a los ratones ocho días después de la tercera inyección. Los anticuerpos generados en ratones por este procedimiento eran de nuevo capaces de discriminar entre los diferentes epítomos de P2X₇ y los anticuerpos contra el epítomo no funcional de P2X₇ dieron los mismos resultados que los generados en ovejas y conejos. Además, los anticuerpos generados contra el epítomo no funcional no conjugado también fueron capaces de reconocer este epítomo en tejido tumoral.

Como ilustran los Ejemplos anteriores, pueden generarse sistemáticamente anticuerpos contra diversos epítomos del receptor P2X₇ en especies diferentes y usando adyuvantes diferentes. En particular, pueden generarse de forma rutinaria anticuerpos contra un epítomo del receptor P2X₇ que identifiquen el receptor en el estado no funcional, en el que no puede formar un poro y llevar a cabo su función apoptótica en condiciones fisiológicas normales.

Ejemplo 4

El anticuerpo que detecta P2X₇ no funcional se ensayó por unión del anticuerpo a células que expresan P2X₇ (humano) con función conocida, como reveló la capacidad de P2X₇ para captar etidio o rubidio. Estos canales de proteína P2X₇ pueden haberse mutado en el par de bases 1513, de modo que los canales no formaran poros apoptóticos. Éstos y receptores P2X₇ no funcionales similares expresados en linfocitos B malignos también se unían al anticuerpo en citometría de flujo y en inmunohistoquímica convencional, mientras que las células que expresaban P2X₇ funcional normal (capaz de captar calcio, etidio y rubidio con grandes flujos) fueron incapaces de unirse al anticuerpo, porque el epítomo seleccionado para detectar los receptores no funcionales no estaba disponible en receptores funcionales. La Pro210 adoptaba una conformación cis en los receptores no funcionales y fue específicamente esta conformación la que se estabilizaba en el epítomo conjugado usado para generar el anticuerpo. La Pro210 estaba en la configuración trans en los receptores que se demostró que eran funcionales. Esto era un resultado de la unión de ATP (adenosina trifosfato) al receptor P2X₇. Cuando se unía ATP, la Pro210 en un segmento inmediatamente adyacente al sitio de unión a ATP adoptaba una configuración trans.

Esto se verificó usando mutagénesis dirigida para cambiar la Pro210 a una Ala que se fijó en la configuración trans y se descubrió que esta proteína mutante era completamente funcional e incapaz de unirse al anticuerpo generado para detectar el receptor no funcional.

Ejemplo 5

Una verificación adicional de la especificidad del anticuerpo para detectar el receptor no funcional venía de experimentos que marcaban macrófagos que expresaban P2X₇. Los macrófagos unían anticuerpo a los receptores P2X₇ usando el anticuerpo universal de P2X₇, pero no unían el anticuerpo a P2X₇ no funcional hasta que se hubieron expuesto a células cancerosas tales como células de hibridoma de ratón. El contacto entre los macrófagos y las células de hibridoma indujo la expresión en los macrófagos de P2X₇ no funcional, que fue detectado por el anticuerpo contra P2X₇ no funcional, así como por el anticuerpo P2X₇ universal.

Se ensayaron los macrófagos y linfocitos de células B extraídos de pacientes con linfoma maligno se ensayaron y todas estas células se unieron al anticuerpo contra P2X₇ universal, así como al anticuerpo contra los receptores P2X₇ no funcionales, verificando que P2X₇ era no funcional en todas las células cancerosas detectadas, siendo el poro apoptótico formado por P2X₇ funcional incapaz de formarse y, por lo tanto, de inducir apoptosis en células cancerosas.

Todas dichas células cancerosas de todos los cánceres de células epiteliales en seres humanos tales como próstata, mama, intestino, piel, estómago, cuello uterino y otros, así como de linfoma maligno, leucemia linfocítica crónica y tumores cerebrales, así como de los mismos tumores en otros mamíferos que se ensayaron, incluyendo mama y próstata en perro y de piel en gato, así como todas las células de hibridoma de ratón, todas expresan el mismo P2X₇ no funcional. La similitud de secuencia entre seres humanos, rata, gato, perro y ratón en los epítomos seleccionados es suficiente para que se realice una identificación positiva en todos los casos anteriores. Esto demuestra que el mecanismo del cáncer en estos mamíferos es idéntico en el sentido de que las células cancerosas expresan receptores P2X₇ no funcionales incapaces de formar poros apoptóticos que normalmente destruirían la célula cuando se activan. De esta forma, las células cancerosas se vuelven inmortales, interrumpiéndose la apoptosis.

Ejemplo 6

Como una verificación adicional de que las células cancerosas, tales como linfocitos de células B afectados, son incapaces de inducir apoptosis a través de la función de P2X₇, se incubaron células B de pacientes con leucemia que contenían receptores P2X₇ no funcionales con ATP 5 mM durante 2 horas en cultivo. Los resultados fueron que el exceso de ATP forzó a todos los receptores no funcionales a abrirse e inducir apoptosis que destruyó las células afectadas.

Ejemplo 7

Como una verificación adicional de que el anticuerpo se une selectivamente a células cancerosas, se trató la piel de pacientes con carcinomas de células basales (BCC) con el anticuerpo contra los receptores P2X₇ no funcionales, suspendido en una base de crema inerte y aplicado a la lesión y a la piel circundante (remítase al Ejemplo 10 a continuación). En 1 semana de aplicación tópica diaria del anticuerpo, había desaparecido todo rastro de las BCC sin efectos sobre la piel circundante puesto que la piel normal estaba desprovista de los receptores.

35 APLICACIONES DE DIAGNÓSTICO

En este documento se proporcionan descripciones a modo de ejemplo que usan el anticuerpo de P2X₇ no funcional específico en animales y que demuestran la aplicación universal de la sonda y el método descritos en el presente documento para el diagnóstico de la mayoría de cánceres en seres humanos y otros mamíferos.

En tejido de próstata de seres humanos y mamíferos, tales como gatos y perros, cuando se usa el anticuerpo para diagnóstico, no se obtiene marcaje en ausencia de lesiones cancerosas o precancerosas. Sin embargo, el método de diagnóstico pone de manifiesto los primeros signos de cambio neoplásico cuando todavía no existen cambios morfológicos que lo acompañen detectables mediante tinción con H y E.

En esta fase, es necesario teñir las unidades de receptor que aparecen primero en los núcleos de células epiteliales. Éstas migran al citoplasma en fases tardías de la enfermedad, actuando como un efecto de campo por la próstata, de modo que es necesario biopsiar menos tejido para estar seguro de la existencia de un tumor. En fases tardías de la enfermedad, la tinción se hace más limitada al epitelio apical.

De forma similar, otros cánceres de células epiteliales, como de mama, pulmón, colon y piel en seres humanos y otros mamíferos, tales como gatos y perros, pueden detectarse con márgenes puesto que ya no existe un efecto de campo claro en estos otros tejidos.

El mismo desarrollo de fase se observa en estos otros tejidos, como mama y cuello uterino, precediendo la tinción nuclear a la tinción citoplasmática, mientras que el tejido normal no se tiñe. Los conductos y lóbulos afectados en el tejido mamario se detectan fácilmente debido al efecto de campo local dentro del sistema de conducto afectado individual en la mama, incluso cuando una morfología normal sugiere que no existe cáncer. Los conductos sin afectar adyacentes aparecen sin teñir. De forma similar, los ganglios linfáticos afectados, que drenan directamente el tejido que contiene un tumor, muestran signos del tumor por el efecto de campo de linfocitos afectados. Por lo tanto, pueden detectarse ganglios centinela sin que exista ninguna propagación celular metastásica al ganglio.

Los cánceres de piel, tales como carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, así como melanomas malignos, muestran una tinción positiva para componentes de canales (monómeros) y receptores no funcionales en capas de melanocitos y queratinocitos con márgenes claros, más allá de los cuales la piel normal está sin marcar tanto en la epidermis como profundamente en el interior de la dermis.

Todas las líneas celulares de cáncer de mamíferos ensayadas, tales como de próstata humana (PC3) y de mama

(MCF7) e hibridomas de roedores, son positivas para los receptores no funcionales en la superficie celular de modo que se inhibe la apoptosis en estas células cancerosas. La aplicación general de este diagnóstico se observa por medio del mismo marcador en células de hibridoma de ratón que demuestra la naturaleza ubicua del receptor en otros tipos animales aparte de seres humanos. Los linfocitos de células B humanos normales muestran que se expresan receptores P2X₇ funcionales en la superficie celular, permitiendo de este modo la apoptosis cuando sea necesario, mientras que los linfocitos de células B humanos de pacientes con linfoma maligno muestran que los receptores P2X₇ no funcionales se expresan en la superficie celular, reduciendo por lo tanto la apoptosis.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Fijar como objetivo este confórmero no funcional de P2X₇ aparentemente ubicuo expresado en la superficie celular de células cancerosas que intentan experimentar apoptosis puede usarse para tratar la mayoría de los cánceres en seres humanos y otros mamíferos. Se exponen ejemplos a continuación:

Ejemplo 8

Se cultivaron células de hibridoma de ratón sobre una base de macrófagos tanto en presencia como en ausencia de anticuerpo purificado por afinidad contra P2X₇ no funcional. Los recuentos celulares pusieron de manifiesto que, por encima de 4 días, mientras las células coincubadas con IgG normal purificada, crecían de 1×10^4 a 7×10^4 , la coincubación con anticuerpo de P2X₇ no funcional mantenía el recuento celular en sólo $1,5 \times 10^4$.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra que anticuerpos generados contra el epítipo no funcional del receptor P2X₇ pueden inhibir la formación de tumores *in vivo*.

Como se ha mostrado anteriormente, los anticuerpos generados en oveja contra el epítipo de P2X₇ no funcional identificaban este receptor apoptótico P2X₇ no funcional en la superficie de células de hibridoma de ratón. La adición de este anticuerpo a cultivos de células de hibridoma retrasaba el crecimiento de las células. Cuando se inyecten células de hibridoma de ratón en cepas de ratón endogámicas preparadas, causarán formación de tumores.

En este experimento, tres grupos de 10 ratones hembra Balb-c recibieron cada uno los siguientes tratamientos:

Grupo 1: 10 ratones recibieron cada uno una inyección por vía intraperitoneal (IP) con 1×10^6 células de hibridoma en 0,5 ml de medio de cultivo de células el Día 1. Los Días 2 y 3 recibieron una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de medio de cultivo de células.

Grupo 2: 10 ratones recibieron cada uno una inyección por vía intraperitoneal (IP) con 1×10^6 células de hibridoma en 0,5 ml de medio de cultivo de células que contenía 1 mg de IgG de oveja purificada el Día 1. Los Días 2 y 3 se les inyectaron 0,5 ml de medio de cultivo de células que contenía 1 mg de IgG de oveja purificada.

Grupo 3: 10 ratones recibieron cada uno una inyección por vía intraperitoneal (IP) con 1×10^6 células de hibridoma en 0,5 ml de medio de cultivo de células que contenía 1 mg de IgG purificada de oveja de un epítipo no funcional anti-P2X₇ el Día 1. Los Días 2 y 3 recibieron una inyección adicional de 0,5 ml de medio de cultivo de células que contenía 1 mg de IgG purificada de oveja anti-P2X₇.

Los ratones de todos los grupos se sacrificaron el Día 11 y se examinaron para determinar la presencia de tumor. Los tumores se extirparon y se pesaron.

Los resultados fueron los siguientes:

Grupos	Observaciones	Peso medio del tumor por ratón (\pm DT) (g)
1: Control 1	9 de 10 ratones tenían tumores	$3,98 \pm 1,1$
2: Control 2	10 de 10 ratones tenían tumores	$2,93 \pm 0,9$
3: Control 3	9 de 10 ratones tenían tumores	$1,13 \pm 0,4$

Un análisis de la varianza mostró una diferencia significativa en el peso del tumor entre los grupos (probabilidad $<0,01$). El grupo experimental tratado con los anticuerpos anti-P2X₇ no funcional era significativamente diferente ($p < 0,01$) de los dos grupos de control. Es decir, el tratamiento con anticuerpos contra el epítipo no funcional de P2X₇ redujo significativamente la cantidad de tumor en los animales de experimentación.

Ejemplo 10

Se aplicó un anticuerpo específico purificado por afinidad (para aumentar enormemente la especificidad) a 3

carcinomas de células basales humanos ("BCC") como un líquido mantenido en su lugar durante 7 días o suspendido en una base de crema de dimeticona. No eran detectables rastros de las lesiones de BCC después del tratamiento, mientras que la piel de control estaba en su totalidad sin afectar debido a la ausencia de la diana proteica.

5 Se piensa que la aplicación a pacientes en general implicaría la producción de un anticuerpo monoclonal humanizado (tal como herceptina) de modo que los cánceres internos pudieran tratarse con la misma eficacia que se puso de manifiesto con la aplicación tópica. Todos los P2X₇ funcional normales expresados en la superficie celular de células tales como linfocitos deberían permanecer sin afectar por la presencia del anticuerpo para evitar efectos secundarios. Por lo tanto, el anticuerpo debería unirse solamente a proteínas expresadas sobre la superficie celular de células que estén intentando pero sean incapaces de iniciar la apoptosis. Por lo tanto, todas las células diana serían únicamente las que estuvieran intentando autodestruirse por muerte celular programada, incluyendo células cancerosas. Los receptores P2X₇ en estas células, particularmente células cancerosas, estarían en un estado no funcional o de ATP agotado.

15 INMUNIZACIÓN ACTIVA

También puede usarse la inmunización activa con fines terapéuticos. En este caso, los seres humanos u otros mamíferos deben inmunizarse contra un epítipo o epítipos específicos que estén en una conformación que mimetice la conformación adoptada solamente por los receptores en su forma no funcional (de ATP agotado) en la superficie celular. Debería evitarse una flexibilidad conformacional que incluya la exposición parcial de una forma de epítipo que esté presente en receptores funcionales. La configuración en cis del epítipo Gly200-Thr215, como ejemplo, debería fijarse antes del uso por medios apropiados. Como prueba añadida de que este concepto es válido está la observación de que numerosos animales, incluyendo ratones, conejos y ovejas, usados para generar los anticuerpos no se han visto inmunocomprometidos. Ninguno de estos animales ha desarrollado nunca ningún tumor.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

30 La invención en todos sus aspectos tiene aplicación en los campos de la medicina y la salud humana y veterinaria, con el potencial de permitir un diagnóstico temprano y preciso de enfermedades y un tratamiento eficaz, que en muchos casos es mucho menos invasivo o traumático que los disponibles en la técnica anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Intreat Pty Limited
- <120> Anticuerpos contra receptores P2X7 no funcionales para el diagnóstico y tratamiento de cánceres y otras afecciones
- 40 <130> P31170EP-D1-PCT-MRM/PJG
- <140> EP 02715313.9
- <141> 2002-01-17
- <150> PR2579AU
- 45 <151> 2001-01-17
- <150> PR5890AU
- <151> 2001-06-22
- 50 <150> PR5891 AU
- <151> 2001-06-22
- <150> PR7430AU
- 55 <151> 2001-09-03
- <150> PR7431 AU
- <151> 2001-09-03
- <160>3
- 60 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211>595
- 65 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 383 712 T3

<400> 1

Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn
 1 5 10 15

Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
 20 25 30

Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp
 35 40 45

Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys
 50 55 60

Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
 65 70 75 80

Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
 85 90 95

ES 2 383 712 T3

Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
 100 105 110
 Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
 115 120 125
 Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
 130 135 140
 Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160
 Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175
 Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190
 Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys His Pro Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335

ES 2 383 712 T3

Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350

Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg His His Ile Tyr
 355 360 365

Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380

Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400

Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415

Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430

Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445

Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460

Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480

Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
 485 490 495

Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
 500 505 510

Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525

Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540

Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560

Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575

Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys

ES 2 383 712 T3

580

585

590

Ser Pro Tyr
595

5

<210>2
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
1 5 10 15

10

Lys

15

<210>3
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr
1 5 10 15

20

Cys

REIVINDICACIONES

1. Un receptor P2X7 aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1, a condición de que la secuencia de aminoácidos del receptor P2X7 aislado contiene una prolina correspondiente a la prolina 210 mostrada en la Figura 1, estando dicha prolina en una conformación cis.
2. Un receptor P2X7 aislado, de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1, en la que la prolina en la posición 210 está en una conformación cis.
3. Un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un fragmento del receptor de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende los residuos 200 (Gly) a 215 (Thr) mostrados en la Figura 1, incluyendo dicha secuencia la prolina en la posición 210 en una conformación cis, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección.
4. Un péptido para su uso, de acuerdo con la reivindicación 3, que incluye adicionalmente un adyuvante.
5. Un péptido para su uso, de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en la que dicha enfermedad es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, de mama, de piel, de pulmón, de cuello uterino, de útero, de estómago, de esófago, de vejiga, de colón, de vagina y de sangre, y linfoma maligno.
6. Un anticuerpo de oveja, de conejo o de ratón, que se une a un fragmento peptídico de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en los residuos 200-216 de la Figura 1 en la que la prolina en la posición 210 está en una conformación cis, en el que la Cys en la posición 216 del fragmento peptídico está acoplado a una toxina diftérica mediante el reticulador químico maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS); en el que el anticuerpo no se une a un dominio extracelular de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 en la que la prolina en la posición 210 está en una conformación trans.
7. Una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección, en la que dicha composición se formula para administración tópica y comprende un anticuerpo, en el que dicho anticuerpo se une a un dominio extracelular de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 en el que la prolina en la posición 210 está en una conformación cis y en el que el anticuerpo no se une a un dominio extracelular de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 en el que la prolina en la posición 210 está en una conformación trans.
8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la composición se formula como una crema, solución, pomada, suspensión, polvo, comprimido, cápsula, supositorio o pesario.
9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la enfermedad o afección es cáncer de piel.
10. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que el anticuerpo está purificado por afinidad, en la que la composición se formula en una base de crema de dimeticona y en la que la enfermedad o afección es carcinoma de células basales humanas.
11. Un reactivo adecuado para detectar una enfermedad o afección por una técnica de formación de imágenes *in vivo*, comprendiendo dicho reactivo un anticuerpo que se une a un dominio extracelular de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 con la condición de que la prolina en la posición 210 está en una conformación cis, en el que el anticuerpo no se une a un dominio extracelular de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 en la que la prolina en la posición 210 está en una conformación trans.
12. Un método *in vitro* para determinar si un individuo padece una enfermedad o afección, comprendiendo dicho método:
- (i) poner en contacto una muestra de células o de tejido de un individuo con un anticuerpo que se une a un dominio extracelular de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 con la condición de que la prolina en la posición 210 está en una conformación cis, en el que el anticuerpo no se une a un dominio extracelular de un receptor P2X7 que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1 en la que la prolina en la posición 210 está en una conformación trans; y
- (ii) determinar si la célula o el tejido están unidos al anticuerpo;
- en el que la muestra de células o de tejido es una muestra de linfa, de próstata, de mama, de piel, de pulmón, de útero, de vejiga, de cuello uterino, de estómago o de esófago.
13. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad o afección es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, de mama, de piel, de pulmón, de cuello uterino, de colon y de sangre y linfoma maligno.

1 MET-PRO-ALA-CYS-CYS-SER-CYS-SER-ASP-VAL-PHE-GLN-TYR-GLU-THR-ASN-LYS-VAL-THR-ARG
 2 ILE-GLN-SER-MET-ASN-TYR-GLY-THR-ILE-LYS-TRP-PHE-PHE-HIS-VAL-ILE-ILE-PHE-SER-TYR
 41 VAL-CYS-PHE-ALA-LEU-VAL-SER-ASP-LYS-LEU-TYR-GLN-ARG-LYS-GLU-PRO-VAL-ILE-SER-SER
 61 VAL-HIS-THR-LYS-VAL-LYS-GLY-ILE-ALA-GLU-VAL-LYS-GLU-GLU-ILE-VAL-GLU-ASN-GLY-VAL
 81 LYS-LYS-LEU-VAL-HIS-SER-VAL-PHE-ASP-THR-ALA-ASP-TYR-THR-PHE-PRO-LEU-GLN-GLY-ASN
 101 SER-PHE-PHE-VAL-MET-THR-ASN-PHE-LEU-LYS-THR-GLU-GLY-GLN-GLU-GLN-ARG-LEU-CYS-PRO
 121 GLU-TYR-PRO-THR-ARG-ARG-THR-LEU-CYS-SER-SER-ASP-ARG-GLY-CYS-LYS-LYS-GLY-TRP-MET
 141 ASP-PRO-GLN-SER-LYS-GLY-ILE-GLN-THR-GLY-ARG-CYS-VAL-VAL-HIS-GLU-GLY-ASN-GLN-LYS
 161 THR-CYS-GLU-VAL-SER-ALA-TRP-CYS-PRO-ILE-GLU-ALA-VAL-GLU-GLU-ALA-PRO-ARG-PRO-ALA
 181 LEU-LEU-ASN-SER-ALA-GLU-ASN-PHE-THR-VAL-LEU-ILE-LYS-ASN-ASN-ILE-ASP-PHE-PRO-GLY
 201 HIS-ASN-TYR-THR-THR-ARG-ASN-ILE-LEU-PRO-GLY-LEU-ASN-ILE-THR-CYS-THR-PHE-HIS-LYS
 221 THR-GLN-ASN-PRO-GLN-CYS-PRO-ILE-PHE-ARG-LEU-GLY-ASP-ILE-PHE-ARG-GLU-THR-GLY-ASP
 241 ASN-PHE-SER-ASP-VAL-ALA-ILE-GLN-GLY-GLY-ILE-MET-GLY-ILE-GLU-ILE-TYR-TRP-ASP-CYS
 261 ASN-LEU-ASP-ARG-TRP-PHE-HIS-HIS-CYS-HIS-PRO-LYS-TYR-SER-PHE-ARG-ARG-LEU-ASP-ASP
 281 LYS-THR-THR-ASN-VAL-SER-LEU-TYR-PRO-GLY-TYR-ASN-PHE-ARG-TYR-ALA-LYS-TYR-TYR-LYS
 301 GLU-ASN-ASN-VAL-GLU-LYS-ARG-THR-LEU-ILE-LYS-VAL-PHE-GLY-ILE-ARG-PHE-ASP-ILE-LEU
 321 VAL-PHE-GLY-THR-GLY-GLY-LYS-PHE-ASP-ILE-ILE-GLN-LEU-VAL-VAL-TYR-ILE-GLY-SER-THR
 341 LEU-SER-TYR-PHE-GLY-LEU-ALA-ALA-VAL-PHE-ILE-ASP-PHE-LEU-ILE-ASP-THR-TYR-SER-SER
 361 ASN-CYS-CYS-ARG-HIS-HIS-ILE-TYR-PRO-TRP-CYS-LYS-CYS-CYS-GLN-PRO-CYS-VAL-VAL-ASN
 381 GLU-TYR-TYR-TYR-ARG-LYS-LYS-CYS-GLU-SER-ILE-VAL-GLU-PRO-LYS-PRO-THR-LEU-LYS-TYR
 401 VAL-SER-PHE-VAL-ASP-GLU-SER-HIS-ILE-ARG-MET-VAL-ASN-GLN-GLN-LEU-LEU-GLY-ARG-SER
 421 LEU-GLN-ASP-VAL-LYS-GLY-GLN-GLU-VAL-PRO-ARG-PRO-ALA-MET-ASP-PHE-THR-ASP-LEU-SER
 441 ARG-LEU-PRO-LEU-ALA-LEU-HIS-ASP-THR-PRO-PRO-ILE-PRO-GLY-GLN-PRO-GLU-GLU-ILE-GLN
 461 LEU-LEU-ARG-LYS-GLU-ALA-THR-PRO-ARG-SER-ARG-ASP-SER-PRO-VAL-TRP-CYS-GLN-CYS-GLY
 481 SER-CYS-LEU-PRO-SER-GLN-LEU-PRO-GLU-SER-HIS-ARG-CYS-LEU-GLU-GLU-LEU-CYS-CYS-ARG
 501 LYS-LYS-PRO-GLY-ALA-CYS-ILE-THR-THR-SER-GLU-LEU-PHE-ARG-LYS-LEU-VAL-LEU-SER-ARG
 521 HIS-VAL-LEU-GLN-PHE-LEU-LEU-LEU-TYR-GLN-GLU-PRO-LEU-LEU-ALA-LEU-ASP-VAL-ASP-SER
 541 THR-ASN-SER-ARG-LEU-ARG-HIS-CYS-ALA-TYR-ARG-CYS-TYR-ALA-THR-TRP-ARG-PHE-GLY-SER
 561 GLN-ASP-MET-ALA-ASP-PHE-ALA-ILE-LEU-PRO-SER-CYS-CYS-ARG-TRP-ARG-ILE-ARG-LYS-GLU
 581 PHE-PRO-LYS-SER-GLU-GLY-GLN-TYR-SER-GLY-PHE-LYS-SER-PRO-TYR

FIGURA 1
Secuencia de receptor P2X₇ humano

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 6133434 A, Buell [0005] [0018]
- EP 02715313 A [0103]