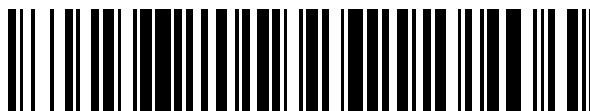


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 456**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C40B 40/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C40B 40/08 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2010 E 10809371 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2467404**

54 Título: **Anticuerpos anti-receptor P2X7 y fragmentos de los mismos**

30 Prioridad:

20.08.2009 AU 2009903928

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

26.01.2016

73 Titular/es:

BIOSCEPTRE (AUST) PTY LTD (100.0%)

11 Julius Avenue

North Ryde NSW 2113, AU

72 Inventor/es:

BARDEN, JULIAN ALEXANDER;

BREWIS, NEIL;

JONES, PHILIP y

GRANT, STEVEN

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 557 456 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-receptor P2X₇ y fragmentos de los mismos

5 Campo de la invención

[0001] La invención desvela receptores purinérgicos, anticuerpos y fragmentos relacionados de los mismos para unión con dichos receptores, producción de dichos anticuerpos y fragmentos y uso de dichos anticuerpos y fragmentos para detección y terapia de cáncer.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es, y no debería interpretarse como, un reconocimiento de ninguna forma de sugerencia de que esa técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o cualquier otra jurisdicción o que podría esperarse razonablemente que esta técnica anterior se determinara, entendiera y considerara relevante por un experto en la materia.

[0003] Los receptores purinérgicos (P2X) son canales selectivos de cationes abiertos por ATP. Cada receptor se compone de tres subunidades proteicas o monómeros. Hasta la fecha se han identificado siete genes separados que codifican monómeros de P2X: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇.

[0004] Los receptores P2X₇ son de interés particular ya que se entiende que la expresión de estos receptores está limitada a células que tienen el potencial de experimentar muerte celular programada, tales como timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos y monocitos. Hay algo de expresión de receptores P2X₇ en homeostasis normal, tal como en eritrocitos.

[0005] Resulta interesante que se ha encontrado un receptor P2X₇ que contiene uno o más monómeros que tienen una isomerización *cis* en Pro210 (de acuerdo con SEC ID N°: 1) y que está desprovisto de función de unión a ATP en células que se entiende que son incapaces de experimentar muerte celular programada, tales como células preneoplásicas y células neoplásicas. Esta isoforma del receptor se ha denominado receptor "no funcional".

[0006] Los anticuerpos generados a partir de inmunización con un péptido que incluye Pro210 en *cis* se unen con receptores P2X₇ no funcionales. Sin embargo, no se unen con receptores P2X₇ capaces de unirse con ATP. En consecuencia, estos anticuerpos son útiles para detectar de forma selectiva muchas formas de carcinoma y cánceres hemopoyéticos y para el tratamiento de algunas de estas afecciones.

[0007] Los documentos WO02/057306A1, WO 2008/043 145 y WO03/020762A1 analizan una sonda para distinguir entre receptores P2X₇ funcionales y receptores P2X₇ no funcionales en forma de un anticuerpo monoclonal.

40

[0008] El documento WO2009/033233 analiza un epítipo presente en receptores no funcionales pero no receptores funcionales y anticuerpos para unión con los mismos.

[0009] Hasta la fecha ha sido muy difícil obtener reactivos serológicos que se unen con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas con afinidad deseable. Son deseables en general reactivos de mayor afinidad en aplicaciones para la detección y el tratamiento de cáncer.

[0010] Existe la necesidad de reactivos mejorados para unión con receptores P2X₇, particularmente para nuevos anticuerpos y fragmentos de los mismos que son capaces de diferenciar entre receptores P2X₇ que se unen a ATP y que no se unen ATP en células vivas.

Sumario de la invención

[0011] En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 1:

55

$$FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4$$

en la que

60

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;

CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad:

65 en las que:

CDR1 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: DNEPMG, RNHDMG, SGYAMA, GMYNMS, PASNMS, GSYAMA, GAYAMS, DGYNMS, TYDMAW, QEYGMG, ARYPMAN, SSYAMA, AKYPMW, SSYAMS, DNVEMS y PMKDMG.

- 5 **[0012]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **2**:

FR1 – CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4

10 en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;

CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

15

en las que:

CDR2 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SIADSGNHTYYADSVKG, AISGSGGSTYYADSVKG, TILSDGSRTYYADSVKG, SINATGGRTYYADSVKG, SITASGYRTYYADSVKG, TISTSGSSTYYADSVKG, TINGSGLATYYADSVKG, SITANGNSTYYADSVKG, SIAAAGSRTYYADSVKG, SITPSGDKTYADSVKG, SIDGGGLQTYADSVKG, TIDGNGLITYADSVKG, SIGPGGARTYYADSVKG, TITSDGLRYYADSVKG, SIGSKGEDTYADSVKG, AISGSGGSTYYANSVKG, AISGSGGGTYADSVKG, SIGTKGEYTYADSVKG, SIGSKGEYTYADSVKG y AISGSGGGTYANSVKG.

- 25 **[0013]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **3**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

30 en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;

CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

35 en las que:

CDR3 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: KQRGLNRYRAQFDY, EPKPMDETFDY, KIKTFRNHVSQFDY, KFNGFSHRQYNFDY, KQGQISNFRFDY, KVRFATSKSINFDY, KCSSCTSLNANFDY, KASYSRPYNFQFDY, KQRSISIRPMFDY, KVRMSYAHFDFDY, KASAPKYFRFDY, KLQRYDRYTLNFDY, KPWRVYSYDRFDY, KVHTFANRSLNFDY, QTVNVPEPAFAY y EPSHFDRPFDY.

- [0014]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **4**:

45 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;

50

CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

55 CDR1 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (P/R)(N/M)(H/K)DMG.

- [0015]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **5**:

60 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;

65

CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

CDR2 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: AISGSGG(S/G)TYYA(D/N)SVKG.

- 5 **[0016]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **6**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

10 en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

15 en las que:

CDR3 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: EP(K/S)(P/H)(M/F)D(T/R)(E/P)FDY.

- [0017]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **7**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

25

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

30

CDR3 tiene una secuencia: EP(K/S)(P/H)(M/F)D(T/R)(E/P)FDY; y
FR4 tiene una secuencia: (W/R/P/G/C)(G/S/F)(Q/P/C)GT(UQ)VTV(S/L)(S/E).

- [0018]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **8**:

35

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

40

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

45

CDR1 tiene una secuencia: (P/R)(N/M)(H/K)DMG;
CDR2 tiene una secuencia: AISGSGG(S/G)TYYA(D/N)SVKG;
CDR3 tiene una secuencia: EP(K/S)(P/H)(M/F)D(T/R)(E/P)FDY; y
FR4 tiene una secuencia: (W/R/P/G/C)(G/S/F)(Q/P/C)GT(L/Q)VTV(S/L)(S/E).

50

- [0019]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la formula general **9**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

55

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

60

en las que:

CDR1 tiene una secuencia: (P/R)(N/M)(H/K)DMG;
CDR2 tiene una secuencia: AISGSGG(S/G)TYYA(D/N)SVKG;
CDR3 tiene una secuencia: EP(K/S)(P/H)(M/F)D(T/R)(E/P)FDY;

65

FR1 tiene una secuencia: EVQLLE(S/P)GGGLVQPGGSLRLSCAASG(Y/F/V)(R7T/N)(I/F/V);
 FR2 tiene una secuencia: W(V/A)RQAPGKGLEW(V/A)S;
 FR3 tiene una secuencia: RFTISRDN(S/R/K)NTLYLQMNS(UM)RAEDTAVYYCA;
 FR4 tiene una secuencia: (W/R/P/G/C)(G/S/F)(Q/P/C)GT(L/Q)VT(V/S/L)(S/E).

[0020] En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general **10**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
 CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

CDR1 tiene una secuencia: PMKDMG;

CDR2 tiene una secuencia: AISGSGGGTYADSVKG;

CDR3 tiene una secuencia: EPKPMDETFDY;

FR1 tiene una secuencia: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF;

FR2 tiene una secuencia: WVRQAPGKGLEWVS;

FR3 tiene una secuencia: RFTISRDN(S/K)NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA;

FR4 tiene una secuencia: PSPGTLVTLE, WGQGLTVTVSS, WGQGLTVTVLS, RSPGTLTVTVSS, PSPGTQVTVSS, PSPGTLTVTVSS, RSQGLTVTVSS, WSQGLTVTVSS, RGQGLTVTVSS, RFQGLTVTVSS, WSPGTLTVTVSS, GSPGTLTVTVSS, WPGGTLTVTVSS, RGPGLTVTVSS, CGPGLTVTVSS, RSCGTLTVTVSS o RSPGTLVTLE.

[0021] En otros aspectos se desvela un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia como se describe en el presente documento, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento y que incluye una o más mutaciones para aumentar la afinidad de dicho sitio por la unión con un receptor P2X₇.

[0022] En otro aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno como se describe en el presente documento en el que una secuencia de aminoácidos que forma una o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR3 es una secuencia humana.

[0023] En otro aspecto se desvela un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv anti-receptor P2X₇ que incluye un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia como se describe en el presente documento, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento.

[0024] En otro aspecto se desvela un diacuerpo o triacuerpo que incluye un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia como se describe en el presente documento, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento.

[0025] En otro aspecto se desvela una proteína de fusión que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo o triacuerpo como se describe en el presente documento.

[0026] En otro aspecto se desvela un conjugado en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo o proteína de fusión como se describe en el presente documento conjugado con un marcador o un agente citotóxico.

[0027] En otro aspecto se desvela un anticuerpo para unión con un sitio de unión a antígeno de un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento.

[0028] En otro aspecto se desvela un ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno, o una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento, o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento.

[0029] En otro aspecto se desvela un vector que incluye un ácido nucleico descrito en el presente documento.

[0030] En otro aspecto se desvela una célula que incluye un vector o ácido nucleico descrito en el presente documento.

5

[0031] En otro aspecto se desvela un animal o tejido derivado del mismo que incluye una célula descrita en el presente documento.

[0032] En otro aspecto se desvela una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento, o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0033] En otro aspecto se desvela una composición de diagnóstico que incluye un sitio de unión a antígeno, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento, o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento, un diluyente y opcionalmente un marcador.

[0034] En otro aspecto se desvela un kit o artículo de fabricación que incluyen un sitio de unión a antígeno, o que incluyen una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento, o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento

[0035] En otro aspecto se desvela un uso de una secuencia de acuerdo con una o más de CDR1, CDR2, FR1, FR2, FR3 y FR4 como se describe en el presente documento para producir un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇.

[0036] En otro aspecto se desvela un uso de un sitio de unión a antígeno o una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento para producir un sitio de unión a antígeno anti-receptor P2X₇ que tiene afinidad aumentada por el receptor P2X₇.

[0037] En otro aspecto se desvela una biblioteca de moléculas de ácido nucleico producidas a partir de la mutación de un sitio de unión a antígeno o una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento, en el que al menos una molécula de ácido nucleico en dicha biblioteca codifica un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇.

[0038] En otro aspecto se desvela un método para producir un sitio de unión a antígeno anti P2X₇ como se describe en el presente documento que incluye expresar un ácido nucleico como se describe en el presente documento en una célula o animal como se describe en el presente documento.

40

[0039] En otro aspecto se desvela un método para el tratamiento de cáncer o una afección o enfermedad asociada con la expresión del receptor P2X₇ no funcional en un individuo que incluye la etapa de proporcionar un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se describe en el presente documento a un individuo que requiere tratamiento para cáncer o dicha afección o enfermedad.

[0040] En otro aspecto se desvela un uso de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o una afección o enfermedad asociada con la expresión de receptor P2X₇ no funcional.

50

[0041] En otro aspecto se desvela un método para el diagnóstico de cáncer o enfermedad o afección asociada con la expresión de receptor P2X₇ no funcional, que incluye la etapa de poner tejidos o células para los que la presencia o ausencia de cáncer debe determinarse con un reactivo en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición de diagnóstico como se describe en el presente documento y detectar la unión del reactivo con los tejidos o células. El método puede realizarse *in vivo* o *in vitro*.

[0042] Típicamente los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la invención se unen con receptores P2X₇ no funcionales, especialmente receptores en los que Pro210 de P2X₇ está en conformación *cis*. En ciertas realizaciones, los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la invención no se unen con receptores P2X₇ funcionales, especialmente receptores en los que Pro210 de P2X₇ está en conformación *trans*.

[0043] Típicamente los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la invención se unen con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas. En otras realizaciones, el sitio de unión a antígeno no se une con receptores en tejidos

celulares muertos o fijos, tales como los que se estudian en histología o citología.

[0044] En una realización, los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la invención se unen con receptores P2X₇ en células vivas con afinidades en el intervalo de 0,1 a 5 nM.

[0045] En una realización, se proporciona un anticuerpo de un único dominio que incluye un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇ no funcional.

Breve descripción de las figuras

[0046]

Figura 1. Positivos de ELISA de dAb de ciclo 2 explorados en Biacore a partir del fago de ciclo 2

Figura 2. PEP2-4 20 nM, sin péptido, cáncer del cuello uterino, objetivo x10

Figura 3. PEP2-4 20 nM, péptido 0,1 mM, cáncer del cuello uterino, sección seriada, unión limitada

Figura 4. PEP2-4 20 nM, péptido 1,0 mM, cáncer del cuello uterino, sección seriada, sin unión

Figura 5. PEP2-4 20 nM, sin péptido, cáncer de cuello uterino, objetivo x10

Figura 6. PEP2-4 20 nM, péptido 0,1 mM, cáncer de cuello uterino, sección seriada, unión limitada

Figura 7. PEP2-4 20 nM, péptido 1,0 mM, cáncer de cuello uterino, sección seriada, sin unión

Figura 8. PEP2-4 20 nM, sin péptido, cáncer de cuello uterino

Figura 9. PEP2-4 20 nM, péptido 10 µM, cáncer de cuello uterino, sección seriada, unión no afectada

Figura 10. PEP2-4 20 nM, melanoma, objetivo x20

Figura 11. dAb-Fc candidato que se expresa a un peso molecular de 75 kDa

Figura 12. Trazas que pueden resolverse fácilmente a partir del fondo incluyen el dAb de control, HEL4-Fc (verde), PEP2-47, PEP2-42, PEP2-42-1, PEP2-2 (azul) con otros agentes de unión de mayor afinidad por encima. El caudal fue de 50 µl/min.

Figura 13. El dominio extracelular de P2X₇ 47-332 con marcador c-Myc C terminal y marcador HA N-terminal unido con anclaje transmembrana PDGFR para su uso en la exploración de agentes de unión a antígeno conformacional E200 expresados en células HEK293.

Figura 14. Transferencia de Western SDS-PAGE de lisado celular y proteínas expresadas en superficie que expresan el ECD1, P2X₇ de tipo silvestre (WT) y los dos mutantes de receptor P2X₇ no funcionales R307Q y E496A. El ECD1 se expresa a 52 kDa, los tres receptores P2X₇ a 75 kDa. Un control anti-cadherina en la sección inferior está a 98 kDa y anti-actina en el lisado celular a 42 kDa.

Figura 15. SDS-PAGE de ECD2 (47-306) y una construcción mutante K193A(47-306) que muestra las fracciones de proteína A 1-5 y el sobrenadante (NB) con patrones de peso molecular a la izquierda.

Figura 16. SDS-PAGE tanto no reducido como reducido de dAb-Fc y ECD2-Fc junto con transferencias de Western correspondientes que reaccionaron con anticuerpo anti-P2X₇.

Figura 17. Una selección de dAb ensayados a 5 µM. La tinción se detectó con Fab anti IgG humano.

Figura 18. Citometría de flujo de la unión de dAb-Fc con el pDisplay-ECD2 en células HEK que muestra unión celular más estrecha por especies de mayor afinidad.

Figura 19. Seguimientos por Biacore de clones de PEP2-42 seleccionados que muestran unión mejorada con el péptido E200.

Figura 20. Secuencias de clones de PEP2-42.

Figura 21. Árbol de rutas de modulación de afinidad desde el agente de unión candidato al dominio extracelular expresado de receptor diana.

Figura 22. Trazas de Biacore del clon PEP2-2-3 Fc a concentraciones crecientes procesadas frente a 10UR de péptido E200.

Figura 23. Trazas de Biacore de clones producidos por exploración de NNS de Trp103 en PEP2-2-1.

Figura 24. Unión por citometría de flujo de PEP2-2-1 con células que expresan ECD1 o ECD2 junto con controles (simulación y pDisplay solamente).

Figura 25. Seguimientos de Biacore que muestran unión competitiva entre PEP2-2-1, péptido E200 y ECD2 (47-306).

Figura 26. dAb candidatos 2-2-1 Fc, 2-2-3 Fc y 2-2-8 Fc que se unen con células PC3 de próstata vivas a 0-20 µg/ml.

Figura 27. dAb candidatos 2-2-1 Fc, 2-2-3 Fc y 2-2-8 Fc que se unen con células MDA MB 231 de mama vivas a 0-20 µg/ml.

Figura 28. dAb candidatos 2-2-1 Fc, 2-2-3 Fc y 2-2-8 Fc que se unen con células SKOV-3 ováricas vivas a 0-20 µg/ml.

Figura 29. dAb candidatos 2-2-1 Fc, 2-2-3 Fc y 2-2-8 Fc que se unen con células 786-O renales vivas a 0-20 µg/ml.

Figura 30. dAb candidatos 2-2-1 Fc, 2-2-3 Fc y 2-2-8 Fc que se unen con células G361 de melanoma vivas a 0-20 µg/ml.

Figura 31. dAb candidatos 2-2-1 Fc, 2-2-3 Fc y 2-2-8 Fc que se unen con células NCI-H596 de pulmón vivas a 0-20 µg/ml.

Figura 32. Citometría de flujo de linfocitos y monocitos humanos de PMBC que no muestran unión con PEP2-2-1 Fc o PEP2-2-3 Fc.

Figura 33. Citometría de flujo de células LNCap de próstata que muestran unión con PEP2-2-1 Fc, PEP2-2-3 Fc y HLA mientras que el control de HEL4 no muestra unión por encima de solamente la secundaria.

Figura 34. Ensayo de CTB que muestra inhibición del crecimiento celular de PC3 durante 5 días en presencia de PEP2-2-1 Fc y PEP2-2-3 Fc aumentados en comparación con HEL4 Fc de control.

Figura 35. Ensayo de CTB que muestra inhibición del crecimiento celular de COLO205 durante 3 y 5 días en presencia de PEP2-2-1 Fc y PEP2-2-3 Fc aumentados en comparación con HEL4 Fc de control.

Figura 36. Ensayo de CTB que muestra inhibición del crecimiento celular de A375 durante 3 y 5 días en presencia de PEP2-2-1 Fc y PEP2-2-3 Fc aumentados en comparación con HEL4 Fc de control.

Figura 37. Trazas de Biacore del dominio de dAb PEP2-2-12 ensayado a 10, 5, 2,5, 1 y 0,5 nM.

Figura 38. Trazas de Biacore del dominio de PEP2-2-12Alexa488 ensayado a 5 y 2,5 nM.

Figura 39. Trazas de Biacore del dominio de PEP2-472-12Alexa488 ensayado a 10 y 5 nM.

Figura 40. Alineamiento de secuencias de dAb.

Figura 41. (SEC ID N°: 1) Secuencia de P2X₇.

Figura 42. (SEC ID N°: 2) Secuencia de ECD2.

Figura 43 (SEC ID N°: 3) Secuencia de ECD1.

Figura 44. Mapa de la construcción pcDNA3.1 PEP2-2-1 dAb-FC.

Figura 45 (SEC ID N°: 198) Secuencia de pcDNA3.1 PEP2-2-1 dAb-FC.

Descripción detallada de las realizaciones

[0047] Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos

en el presente documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. La presente invención no está limitada de ninguna manera a los métodos y materiales descritos.

5 [0048] Como se usa en el presente documento, excepto cuando el contexto requiera otra cosa, no se pretende que el término “comprender” y variaciones del término, tales como “que comprende”, “comprende” y “comprendido”, excluyan aditivos, componentes, números enteros o etapas adicionales.

10 [0049] Para fines de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición expuesta entre en conflicto con cualquier documento incorporado en el presente documento por referencia, la definición expuesta posteriormente prevalecerá.

15 [0050] “*Receptor purinérgico*” se refiere en general a un receptor que usa una purina (tal como ATP) como un ligando.

[0051] “*Receptor P2X₇*” se refiere en general a un receptor purinérgico formado a partir de tres subunidades proteicas o monómeros, teniendo al menos uno de los monómeros una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en SEC ID N°: 1. “*Receptor P2X₇*” puede ser un receptor funcional o no funcional como se describe posteriormente. “*Receptor P2X₇*” abarca variantes de origen natural del receptor P2X₇, por ejemplo, en las que los monómeros de P2X₇ son variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas incluyendo formas truncadas o secretadas de origen natural de los monómeros que forman enlaces P2X₇ (por ejemplo, una forma que consiste en la secuencia de dominio extracelular o forma truncada de la misma), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos monoméricos de P2X₇ de secuencia nativa desvelados en el presente documento son polipéptidos de secuencia nativa de longitud completa o maduros que comprenden la secuencia de aminoácidos de longitud completa mostrada en SEC ID N°: 1. En ciertas realizaciones el receptor P2X₇ puede tener una secuencia de aminoácidos que está modificada, por ejemplo diversos aminoácidos de la secuencia mostrada en SEC ID N°: 1 pueden sustituirse, suprimirse o puede insertarse un resto.

30 [0052] “*Receptor P2X₇ funcional*” se refiere en general a una forma del receptor P2X₇ que tiene un sitio de unión o hendidura para unión con ATP. Cuando se une con ATP, el receptor forma una estructura de tipo poro que permite la entrada de iones de calcio en el citosol, una consecuencia de lo cual puede ser muerte celular programada. En homeostasis normal, la expresión de receptores P2X₇ funcionales está limitada en general a células que experimentan muerte celular programada tales como timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos y monocitos. También puede haber algo de expresión de receptores P2X₇ funcionales en eritrocitos.

40 [0053] “*Receptor P2X₇ no funcional*” se refiere en general a una forma del receptor P2X₇ en la que uno o más de los monómeros tiene una isomerización *cis* en Pro210 (de acuerdo con SEC ID N°: 1). La isomerización puede surgir de cualquier acontecimiento molecular que conduzca a plegamiento erróneo del monómero, incluyendo por ejemplo, mutación de secuencia primaria del monómero o procesamiento postraducciona anómalo. Una consecuencia de la isomerización es que el receptor es incapaz de unirse con ATP, o se une de otro modo con ATP con una menor afinidad que la observada entre ATP y receptores que no contienen una isomerización en Pro210. En las circunstancias, el receptor no puede formar un poro y esto limita el grado en el que los iones de calcio pueden entrar en el citosol. Los receptores P2X₇ no funcionales se expresan en una amplia serie de cánceres epiteliales y hematopoyéticos.

50 [0054] “*Dominio extracelular*” (ECD) usado en el presente documento son receptor P2X₇ (47-306) (SEC ID N°: 2) (ECD2) y receptor P2X₇ (47-332) (SEC ID N°: 3) (ECD1). El receptor P2X₇ (47-306) (SEC ID N°: 2) es los aminoácidos 47 a 306 de SEC ID N°: 1. El receptor P2X₇ (47-332) (SEC ID N°: 3) es los aminoácidos 47 a 332 de SEC ID N°: 1.

55 [0055] “*Anticuerpos*” o “*inmunoglobulinas*” o “*Ig*” son proteínas gamma globulinas que se encuentran en la sangre, u otros fluidos corporales de vertebrados que actúan en el sistema inmunitario para unirse con antígenos, identificando y neutralizando de este modo objetos ajenos.

60 [0056] Los anticuerpos son en general una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena L se une con una cadena H por un enlace disulfuro covalente. Las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L tiene también enlaces disulfuro intracatenarios espaciados regularmente.

[0057] Las cadenas H y L definen dominios Ig específicos. Más particularmente, cada H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}).

[0058] Los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. La

5 cadena L de cualquier especie vertebrada puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0059] El dominio constante incluye la parte F_c que comprende las partes carboxilo-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos tales como ADCC se determinan por

10 secuencias en la región F_c , siendo dicha región también la parte reconocida por receptores de F_c (F_cR) hallados en ciertos tipos de células.

[0060] El emparejamiento de un V_H y V_L juntos forma una “*región variable*” o un “*dominio variable*” que incluye los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada

15 puede denominarse “*VH*”. El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse “*VL*”. El dominio V contiene un sitio de unión a antígeno que afecta a la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Las regiones V abarcan aproximadamente 110 restos de aminoácidos y consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco conservadas (FR) (generalmente aproximadamente 4) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas “*regiones*

20 *hipervariables*” (generalmente aproximadamente 3) que son de 9-12 aminoácidos de longitud cada una. Las FR adoptan en gran medida una configuración en lámina β y las regiones hipervariables forman bucles que conectan con, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β .

[0061] “*Región hipervariable*”, “*HVR*” o “*HV*” se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son

25 de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el V_H ($H1$, $H2$, $H3$) y tres en el V_L ($L1$, $L2$, $L3$). Se usan varias delimitaciones de región hipervariable y están abarcadas en el presente documento. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institute of

30 Health, Bethesda, MD (1991)).

[0062] Los restos de “*marco conservado*” o “*FR*” son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable definidos en el presente documento.

[0063] “*Un péptido para formar un sitio de unión a antígeno*” se refiere en general a un péptido que puede formar una conformación que confiere la especificidad de un anticuerpo para antígeno. Los ejemplos incluyen anticuerpo

35 completo o estructuras relacionadas con anticuerpo completo, fragmentos de anticuerpo completo que incluyen un dominio variable, dominios variables y fragmentos de los mismos, incluyendo cadenas ligeras y pesadas, o fragmentos de cadenas ligeras y pesadas que incluyen algunas pero no todas las regiones hipervariables o regiones

40 constantes.

[0064] Un anticuerpo “*íntacto*” o “*completo*” es uno que comprende un sitio de unión a antígeno así como un C_L y al menos dominios constantes de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de

45 secuencia de aminoácidos de los mismos.

[0065] Las “*estructuras relacionadas con anticuerpo completo*” incluyen formas multimerizadas de anticuerpo completo.

[0066] “*Fragmentos de anticuerpo completo que incluyen un dominio variable*” incluyen fragmentos Fab , Fab' , $F(ab')_2$ y Fv ; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocaténarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

[0067] El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena

55 H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno.

[0068] Un fragmento Fab' difiere de fragmentos Fab por tener pocos restos adicionales en el extremo carboxilo terminal del dominio C_{H1} incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. $Fab' - SH$ es la

60 designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo de tiol libre.

[0069] Un fragmento $F(ab')_2$ corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por enlaces disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún son capaces de entrecruzarse con el antígeno.

65

[0070] Un “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente, estrecha.

5 **[0071]** En una especie Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligeras y pesadas pueden asociarse en una estructura “dimérica” análoga a la de una especie de Fv bicatenaria. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que contribuyen con los restos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren especificidad de unión a
10 antígeno para el anticuerpo.

[0072] “Fv monocatenario” también abreviado como “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados para formar una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido de scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L lo
15 que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno.

[0073] Un “dominio variable individual” es la mitad de un Fv (que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) que tiene la capacidad de reconocer y unirse con antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.
20

[0074] “Diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Los fragmentos de anticuerpo pequeños se preparan construyendo fragmentos sFv (véase párrafo precedente) con enlazadores cortos (de aproximadamente 5-10 restos) entre los
25 dominios V_H y V_L de modo que se consiga emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno.

[0075] Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “de cruce” en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. También se conocen en general en la técnica triacuerpos y tetracuerpos.
30

[0076] Un “anticuerpo aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o se ha recuperado de un componente de su ambiente pre-existente. Los componentes contaminantes son materiales que interferirían con usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos.
35

[0077] Un “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha realizado usando cualquiera de las técnicas para realizar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno
40 no humanos. Pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han deshabilitado.

45 **[0078]** Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se han reemplazado restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad del anticuerpo deseada. En algunos casos, se reemplazan restos de región marco conservada (FR) de la
50 inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o
55 sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

60 **[0079]** “Anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico o determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse no
65 contaminados por otros anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por la metodología de hibridoma,

o pueden realizarse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales. Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos.

[0080] Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas son idénticas a u homólogas de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestran la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.), y secuencias de región constante humana.

[0081] La expresión “anticuerpo anti-receptor P2X₇” o “un anticuerpo que se une con el receptor P2X₇” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con el receptor P2X₇ con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección al receptor P2X₇, típicamente receptor P2X₇ no funcional. Preferentemente, el alcance de la unión de un anticuerpo de receptor P2X₇ con una proteína receptora no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo con el receptor P2X₇ como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas relaciones, un anticuerpo que se une con receptor P2X₇ tiene una constante de disociación (Kd) de < 1 µM, < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM o < 0,1 nM. Un anticuerpo anti-receptor P2X₇ no funcional es generalmente uno que tiene alguna o todas de estas características serológicas y que se une con receptores P2X₇ no funcionales pero no con receptores P2X₇ funcionales.

[0082] Un anticuerpo “con afinidad madurada” es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o esas alteraciones. Los anticuerpos con afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Se producen anticuerpos con afinidad madurada por procedimientos conocidos en la técnica.

[0083] Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0084] Un “anticuerpo agonista”, como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0085] La “afinidad de unión” se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). En general, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen con antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen con el antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conoce en la técnica una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para fines de la presente invención.

[0086] Los inventores han determinado las secuencias de CDR de varios clones de dominio variable que han descubierto que se unen con la diana de ECD. Estas secuencias de CDR se muestran en la Tabla 1 posterior.

[0087] En un aspecto se divulga un péptido que tiene una secuencia como se muestra en la Tabla 1. Estos péptidos son particularmente útiles para construir sitios de unión a antígeno, dominios variables, anticuerpos y fragmentos relacionados.

Tabla 1: Secuencias CDR

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
PEP2-1	SEC ID N°: 4 DNEPMG	SEC ID N°: 5 SIADSGNHTYYADSVKG	SEC ID N°: 6 KQRGLNRYRAQFDY
PEP2-2	SEC ID N°: 7 RNHDMG	SEC ID N°: 8 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 9 EPKPMDFEFDY
PEP2-3	SEC ID N°: 10 SGYAMA	SEC ID N°: 11 TILSDGSRTYYADSVKG	SEC ID N°: 12 KIKTFRNHVSQFDY
PEP2-4	SEC ID N°: 13 GMYNMS	SEC ID N°: 14 SINATGGRTYYADSVKG	SEC ID N°: 15 KFNGFSHRQYNFDY

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
PEP2-5	SEC ID N°: 16 PASNMS	SEC ID N°: 17 SITASGYRTYYADSVKG	SEC ID N°: 18 KQGQISNFPRFDY
PEP2-6	SEC ID N°: 19 GSYAMA	SEC ID N°: 20 TISTSGSSTYYADSVKG	SEC ID N°: 21 KVRFATSKSINFDY
PEP2-7	SEC ID N°: 22 GAYAMS	SEC ID N°: 23 TINGSGLATYYADSVKG	SEC ID N°: 24 KCSSCTSLNANFDY
PEP2-8	SEC ID N°: 25 DGYNMS	SEC ID N°: 26 SITANGNSTYYADSVKG	SEC ID N°: 27 KASYSRPYNFQFDY
PEP2-9	SEC ID N°: 28 TYDMAW	SEC ID N°: 29 SIAAAGSRYYADSVKG	SEC ID N°: 30 KQRSISIRPMFDY
PEP2-10	SEC ID N°: 31 QEYGMG	SEC ID N°: 32 SITPSGDKTYADSVKG	SEC ID N°: 33 KVRSMZYAHFDFDY
PEP2-11	SEC ID N°: 34 ARYPMA	SEC ID N°: 35 SIDGGGLQTYADSVKG	SEC ID N°: 36 KASAPKYFRFDY
PEP2-13	SEC ID N°: 37 SSYAMA	SEC ID N°: 38 TIDGNGLITYADSVKG	SEC ID N°: 39 KLQRYDRYTLNFDY
PEP2-30	SEC ID N°: 40 AKYPMV	SEC ID N°: 41 SIGPGGARTYYADSVKG	SEC ID N°: 42 KPWRVYSYDRFDY
PEP2-34	SEC ID N°: 43 SSYAMS	SEC ID N°: 44 TITSDGLRYYADSVKG	SEC ID N°: 45 KVHTFANRSLNFDY
PEP2-42	SEC ID N°: 46 DNVEMS	SEC ID N°: 47 SIGSKGEDTYADSVKG	SEC ID N°: 48 QTVNVPEPAFAY
PEP2-47	SEC ID N°: 49 PMKDMG	SEC ID N°: 50 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 51 EPSHFDRPFDY
PEP2-2-1	SEC ID N°: 52 RNHDMG	SEC ID N°: 53 AISGSGGSTYYANSVKG	SEC ID N°: 54 EPKPMDETFDY
PEP2-2-1-1	SEC ID N°: 55 RNHDMG	SEC ID N°: 56 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 57 EPKPMDETFDY
PEP2-2-1-2	SEC ID N°: 58 RNHDMG	SEC ID N°: 59 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 60 EPKPMDETFDY
PEP2-2-11	SEC ID N°: 61 RNHDMG	SEC ID N°: 62 AISGSGGSTYYANSVKG	SEC ID N°: 63 EPKPMDETFDY
PEP2-2-12	SEC ID N°: 64 RNHDMG	SEC ID N°: 65 AISGSGGSTYYANSVKG	SEC ID N°: 66 EPKPMDETFDY
PEP2-2-2	SEC ID N°: 67 RNHDMG	SEC ID N°: 68 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 69 EPKPMDETFDY
PEP2-2-4	SEC ID N°: 70 RNHDMG	SEC ID N°: 71 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 72 EPKPMDETFDY
PEP2-2-5	SEC ID N°: 73 RNHDMG	SEC ID N°: 74 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 75 EPKPMDETFDY
PEP2-2-8	SEC ID N°: 76 RNHDMG	SEC ID N°: 77 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 78 EPKPMDETFDY
PEP2-2-9	SEC ID N°: 79 RNHDMG	SEC ID N°: 80 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 81 EPKPMDETFDY
PEP2-2-81	SEC ID N°: 82 RNHDMG	SEC ID N°: 83 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 84 EPKPMDETFDY
PEP2-2-91	SEC ID N°: 85 RNHDMG	SEC ID N°: 86 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 87 EPKPMDETFDY
PEP2-2-3	SEC ID N°: 88 RNHDMG	SEC ID N°: 89 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 90 EPKPMDETFDY
PEP2-2-31	SEC ID N°: 91 RNHDMG	SEC ID N°: 92 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 93 EPKPMDETFDY

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
PEP2-2-32	SEC ID N°: 94 RNHDMG	SEC ID N°: 95 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 96 EPKPMDFEFDY
PEP2-2-33	SEC ID N°: 97 RNHDMG	SEC ID N°: 98 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 99 EPKPMDFEFDY
PEP2-2-10	SEC ID N°: 100 RNHDMG	SEC ID N°: 101 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 102 EPKPMDFEFDY
PEP2-2-101	SEC ID N°: 103 RNHDMG	SEC ID N°: 104 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 105 EPKPMDFEFDY
PEP2-2-102	SEC ID N°: 106 RNHDMG	SEC ID N°: 107 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 108 EPKPMDFEFDY
PEP2-247-1	SEC ID N°: 109 RNHDMG	SEC ID N°: 110 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 111 EPSHFDRPFY
PEP2-247-2	SEC ID N°: 112 RNHDMG	SEC ID N°: 113 AISGSGGSTYYANSVKG	SEC ID N°: 114 EPSHFDRPFY
PEP2-472-1	SEC ID N°: 115 PMKDMG	SEC ID N°: 116 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 117 EPKPMDFEFDY
PEP2-472-11	SEC ID N°: 118 PMKDMG	SEC ID N°: 119 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 120 EPKPMDFEFDY
PEP2-472-12	SEC ID N°: 121 PMKDMG	SEC ID N°: 122 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 123 EPKPMDFEFDY
PEP2-472-121	SEC ID N°: 124 PMKDMG	SEC ID N°: 125 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 126 EPKPMDFEFDY
PEP2-42-1	SEC ID N°: 127 DNVEMS	SEC ID N°: 128 SIGTKGEYTYADSVKG	SEC ID N°: 129 QTVNVPEPAFAY
PEP2-42-2	SEC ID N°: 130 DNVEMS	SEC ID N°: 131 SIGSKGEYTYADSVKG	SEC ID N°: 132 QTVNVPEPAFAY
PEP2-47-1	SEC ID N°: 133 PMKDMG	SEC ID N°: 134 AISGSGGSTYYADSVKG	SEC ID N°: 135 EPSHFDRPFY
PEP2-47-2	SEC ID N°: 136 PMKDMG	SEC ID N°: 137 AISGSGGSTYYANSVKG	SEC ID N°: 138 EPSHFDRPFY

[0088] Los inventores han determinado las secuencias FR de varios clones de dominio variable que han descubierto que se unen con la diana de ECD. Estas secuencias de FR se muestran en la Tabla 2 a continuación. Podrían usarse otras secuencias de FR con las CDR anteriormente descritas para formar un sitio de unión a 5 antígeno para unión con un receptor P2X₇ no funcional.

Tabla 2: Regiones marco conservadas

Clon	FR1
PEP2-1, PEP2-2, PEP2-3, PEP2-4, PEP2-5, PEP2-6, PEP2-7, PEP2-8, PEP2-10, PEP2-11, PEP2-13, PEP2-30, PEP2-34, PEP2-42, PEP2-47, PEP2-2-1, PEP2-2-1-1, PEP2-2-1-2, PEP2-2-11, PEP2-2-12, PEP2-2-2, PEP2-2-8, PEP2-2-9, PEP2-2-81, PEP2-2-91, PEP2-2-3, PEP2-2-31, PEP2-2-32, PEP2-2-33, PEP2-2-10, PEP2-2-101, PEP2-2-102, PEP2-247-1, PEP2-247-2, PEP2-42, PEP2-42-1; PEP2-2-5	SEC ID N°: 139 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF
HEL-4	SEC ID N°: 140 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFRI
PEP2-9	SEC ID N°: 141 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTL
PEP2-47-1, PEP2-47-2, PEP2-472-1, PEP2-472-11, PEP2-472-12; PEP2-472-121	SEC ID N°: 142 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF
PEP2-2-4	SEC ID N°: 143 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLTCAASGFSF-
PEP2-42-2	SEC ID N°: 144 EVQMLESGGGLVQPGESLRLSCAASGFTF

[illegible]

Clon	FR4
PEP2-472-11	SEC ID N°: 167 RSCGTLVTVSS
PEP2-472-12	SEC ID N°: 168 RSPGTLVTVLE
PEP2-472-121	SEC ID N°: 169 PSPGTLVTVLE
PEP2-2-1-2	SEC ID N°: 170 RSQGTLVTVSS

[0089] En ciertas realizaciones se proporciona un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia mostrada en la Tabla 3 a continuación:

5

Tabla 3: Sitios de unión a antígeno

Clon	Secuencia de sitio de unión a antígeno
PEP2-2	SEC ID N°: 171 PEP2-2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRIRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPM DTE - FDYWGQGLTVTVSS
PEP2-42	SEC ID N°: 172 PEP2-42 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDNVE MSVRQAPGKGLEWVSSIGSKGEDTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAQTVNVP EFAFAYWGQGLTVTVSS'
PEP2-47	SEC ID N°: 173 PEP2-47 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPMKDMGVVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEP SHFDRP - FDYWGQGLTVTVSS
PEP2-2-1	SEC ID N°: 174 PEP2-2-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPM DTE - FDYRSPGTLTVTVSS
PEP2-2-1-1	SEC ID N°: 175 PEP2-2-1-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPM DTE-FDYRSPGTLTVTVSS
PEP2-2-1-2	SEC ID N°: 176 PEP2-2-1-2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPM DTE-FDYRSQGLTVTVSS
PEP2-2-11	SEC ID N°: 177 PEP2-2-11 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYANSVKGRFTISRDN SFUTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPM DTE- FDYPSPGTQTVTVSS
PEP2-2-12	SEC ID N°: 178 PEP2-2-12 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPM DTE-FDYPSPGTLTVTVSS
PEP2-2-2	SEC ID N°: 179 PEP2-2-2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPM DTE-FDYRSQGLTVTVSS
PEP2-2-4	SEC ID N°: 180 PEP2-2-4 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLTCAASGF SFRNHDGMGVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEETAV YY CAEPKPM DTE-FDYRSPGTLTVTVSS

Clon	Secuencia de sitio de unión a antígeno
PEP2-2-5	SEC ID N°: 181 PEP2-2-5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYRSPGTLTVSS
PEP2-2-8	SEC ID N°: 182 PEP2-2-8 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYFSQGLTVTVSS
PEP2-2-9	SEC ID N°: 183 PEP2-2-9 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYRFQGLTVTVSS
PEP2-2-3	SEC ID N°: 184 PEP2-2-3 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYWSPGTLTVTVSS
PEP2-2-10	SEC ID N°: 185 PEP2-2-10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYRFPGLTVTVSS
PEP2-2-101	SEC ID N°: 186 PEP2-2-101 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYRGPGTLTVTVSS
PEP2-2-102	SEC ID N°: 187 PEP2-2-102 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYCGPGTLTVTVSS
PEP2-472-1	SEC ID N°: 188 PEP2-472-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFPMKDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYRSQGLTVTVSS
PEP2-472-11	SEC ID N°: 189 P2-472-11 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFPMKDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYRSCGTLTVTVSS
PEP2-472-12	SEC ID N°: 190 P2-472-12 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFPMKDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKHTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYRSPGTLTVTVSS
PEP2-472-121	SEC ID N°: 191 P2-472-121 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFPMKDMGWVRQAPGKLEWWSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEPKPMDE-FDYPSGTLTVTVSS

Clon	Secuencia de sitio de unión a antígeno
PEP2-247-1	SEC ID N°: 192 PEP2-247-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGWRQAPGKGLEWWSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEP SHFDRP-FDYRSQGLTVTVSS
PEP2-247-2	SEC ID N°: 193 PEP2-247-2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNHDGMGWRQAPGKGLEWWSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEP SHFDRP-FDYRSQGLTVTVSS
PEP2-42-1	SEC ID N°: 194 PEP2-42-1 EVQMLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDNEMSWWRQAPGKGLEWWSIGTKGEYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSMRAEDTAV YY CAQT VNVPEPAFA YWGQGLTVTVLS
PEP2-42-2	SEC ID N°: 195 PEP2-42-2 EVQMLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDNEMSWWRQAPGKGLEWWSIGSKGEYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSPRAEDTAV YY CAQT VNVPEPAFA YWGQGLTVTVSS
PEP2-47-1	SEC ID N°: 196 PEP2-47-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFPMKDMGWRQAPGKGLEWWSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEP SHFDRP-FDYRSQGLTVTVSS
PEP2-47-2	SEC ID N°: 197 PEP2-47-2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFPMKDMGWRQAPGKGLEWWSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YY CAEP SHFDRP-FDYRSQGLTVTVSS

[0090] En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general **11**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

CDR1 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (R/P/D)(N/M)(H/K/V)(D/E)M(G/S)

15 [0091] En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general **12**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

CDR2 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
(A/S)(S/G)(G/S/T)(S/K)G(G/E)(S/G/D/Y)TYYA(D/N)SVKG.

30 [0092] En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general **13**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

CDR3 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
(E/Q)(P/T)(K/S/V)(P/H/N)(M/F/V)(D/P)(T/R/E)(E/P)(A¹)F(A/D)Y

en las que A¹ se refiere a ningún aminoácido entre (E/P) y F o alanina.

[0093] En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general **14**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en las que:

CDR3 tiene una secuencia: (E/Q)(P/T)(K/SA/)(P/H/N)(M/FA/)(D/P)(T/R/E)(E/P)(A¹)F(A/D)Y y
FR4 tiene una secuencia: (W/R/P/G/C)(G/S/F)(Q/C/P)GT(UQ)VTV(S/L)(S/E).

[0094] En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general **15**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

5

en las que:

CDR1 tiene una secuencia: (R/P/D)(N/M)(H/K/V)(D/E)M(G/S);

CDR2 tiene una secuencia: (A/S)I(S/G)(G/S/T)(S/K)G(G/E)(S/G/D/Y)TYYA(D/N)SVKG;

10 CDR3 tiene una secuencia: (E/Q)(P/T)(K/SA/)(P/H/N)(M/F/V)(D/P)(T/R/E)(E/P)(A¹)F(A/D)Y; en la que A¹ se refiere a ningún aminoácido entre (E/P) y F o alanina,

y

FR4 tiene una secuencia: (W/R/P/G/C)(G/S/F)(Q/C/P)GT(UQ)VTV(S/L)(S/E).

15 **[0095]** En un aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por la fórmula general **16**:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

20 en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

25 en las que:

CDR1 tiene una secuencia: (R/P/D)(N/M)(H/KA/)(D/E)M(G/S);

CDR2 tiene una secuencia: (A/S)I(S/G)(G/S/T)(S/K)G(G/E)(S/G/D/Y)TYYA(D/N)SVKG;

30

CDR3 tiene una secuencia: (E/Q)(P/T)(K/SA/)(P/H/N)(M/F/V)(D/P)(T/R/E)(E/P)(A¹)F(A/D)Y, en la que A¹ se refiere a ningún aminoácido entre (E/P) y F o alanina;

FR1 tiene una secuencia: EVQLLE(S/P)GGGLVQPGGSLRLSCAASG(Y/F/V)(RT/N)(I/F/V);

35

FR2 tiene una secuencia: WVRQAPGKGLEWVS;

FR3 tiene una secuencia: RFTISRDNSKNTLYLQMNS(L/M)RAEDTAVYYCA;

40 FR4 tiene una secuencia: (W/R/P/G/C)(G/S/F)(Q/C/P)GT(L/A)VTV(S/L)(S/E).

[0096] En ciertos aspectos el sitio de unión a antígeno es uno que tiene al menos 75 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 85 %, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 %, más preferentemente 98 % o 99 % de identidad con un sitio de unión a antígeno mostrado en la Tabla 3.

45

[0097] En ciertos aspectos, la CDR es una que tiene al menos 75 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 85 %, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 %, más preferentemente 98 % o 99 % de identidad con un CDR mostrada en la Tabla 1.

50 **[0098]** El porcentaje de identidad de secuencia se determina por métodos convencionales, por medio de programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Versión 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, Estados Unidos 53711) como se desvela en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Se usa
55 GAP con los siguientes ajustes para comparación de secuencias polipeptídicas: penalización de creación de hueco de 3,0 y penalización de extensión de hueco de 0,1.

[0099] La identidad de secuencia de moléculas polinucleotídicas se determina por métodos similares usando GAP con los siguientes ajustes para comparación de secuencias de ADN: penalización de creación de hueco de 5,0 y
60 penalización de extensión de hueco de 0,3.

[0100] En otros aspectos se desvela un sitio de unión a antígeno o CDR y/o FR que tiene una secuencia como se ha descrito anteriormente y que incluye una o más mutaciones para aumentar la afinidad de dicho sitio para unión con un anti-receptor P2X₇. La mutación puede dar como resultado una sustitución, inserción o delección de un resto
65 en una o más de CDR1, CDR2 o CDR3 o una o más de FR1, FR2, FR3 o FR4.

[0101] Marks *et al.* (1992) BioTechnology 10:779 que describe maduración de afinidad por redistribución de dominios VH y VL; Barbas *et al.* (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809; Schier *et al.* (1995) Gene 169:147-155, Yelton *et al.* (1995) J. Immunol. 155:1994; Jackson *et al.* (1995), J. Immunol. 154(7):3310; y Hawakins *et al.*, (1992) J. Mol. Biol. 226:889, que describen mutagénesis aleatoria de restos de región hipervariable y/o marco conservado, son ejemplos de procedimientos conocidos en la técnica para maduración de afinidad de sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, se muta un ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias mostradas en la Tabla 1 o la Tabla 3 para crear una biblioteca de secuencias diversa. La biblioteca se explora después frente a una diana que incluye un epítipo de un receptor P2X₇ no funcional. Se muestra un método ejemplar en los Ejemplos del presente documento.

[0102] En otro aspecto se desvela un sitio de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente en el que una secuencia de aminoácidos que forma una o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 deriva de una secuencia humana o en forma de una secuencia humana.

[0103] El sitio de unión al antígeno puede presentarse en una forma humanizada que incluye secuencias de inmunoglobulina no humanas (por ejemplo, murinas) y humanas. Típicamente todas excepto las secuencias de CDR del sitio de unión a antígeno son de una especie no humana tal como ratón, rata o conejo. En algunos casos, los restos de marco conservado del sitio de unión a antígeno también pueden ser no humanos. Cuando el sitio de unión a antígeno se proporciona en forma de un anticuerpo completo, típicamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc) es humana, permitiendo por lo tanto diversas funciones efectoras humanas.

[0104] Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar sitios de unión a antígeno no humanos, incluyendo ejemplos de procesos adecuados los de Jones *et al.*, (1986) Nature, 321: 522; Riechmann *et al.*, (1988) Nature, 332: 323; Verhoeven *et al.*, (1988) Science, 239: 1534.

[0105] Los métodos de presentación en fagos descritos en el presente documento usando bibliotecas de anticuerpo derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana son útiles para generar sitios de unión a antígeno humanos y anticuerpos humanos.

[0106] Además, pueden usarse mamíferos transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Estos ratones pueden generarse por inserción aleatoria o dirigida de los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana en células madre embrionarias. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera del hospedador pueden hacerse no funcionales por la inserción o por algún otro acontecimiento de recombinación, por ejemplo por delección homocigota de la región JH del hospedador. Las células madre embrionarias transfectadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos que después se crían para producir descendencia homocigota que expresa sitios de unión a antígeno humanos. Después de la inmunización con un epítipo de P2X₇, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales humanos. Un beneficio de los sistemas de animales transgénicos es que es posible producir isotipos terapéuticamente útiles porque los transgenes de inmunoglobulina humana se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática en los ratones transgénicos.

[0107] Los dominios variables que incluyen CDR y FR de la invención pueden haberse hecho menos inmunogénicos reemplazando restos expuestos en superficie para hacer que el anticuerpo parezca propio para el sistema inmunitario. Padlan, E.A., 1991, Mol. Immunol. 28, 489 proporciona un método ejemplar. En general, la afinidad se conserva porque el empaquetamiento interno de restos de aminoácidos en la cercanía del sitio de unión a antígeno permanece sin cambios y en general los restos de CDR o restos adyacentes que influyen en características de unión no deben sustituirse en estos procesos.

[0108] En otro aspecto se desvela un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab o scFv anti-receptor P2X₇ que incluye un sitio de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente. En otros aspectos, el sitio de unión a antígeno tiene una secuencia como se muestra en la Tabla 3.

[0109] Los fragmentos de anticuerpo de menor peso molecular, en comparación con anticuerpos completos pueden tener acceso mejorado a tumores sólidos y eliminación más rápida lo que puede ser particularmente útil en aplicaciones de diagnóstico terapéuticas e *in vivo*.

[0110] Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo incluyendo digestión proteolítica de anticuerpos intactos y expresión recombinante en células hospedadoras. Con respecto a estos últimos, como se describe posteriormente, los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos y pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂. En otro enfoque, se aíslan fragmentos F(ab')₂ directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes.

[0111] En ciertos aspectos, el sitio de unión a antígeno se proporciona en forma de un fragmento Fv monocatenario (scFv). Fv y scFv son adecuados para unión no específica reducida durante su uso *in vivo* ya que tienen sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes. Pueden construirse proteínas de fusión que incluyen scFv para producir fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo terminal de un scFv.

[0112] En otros aspectos se desvela un diacuerpo o triacuerpo u otro anticuerpo multiespecífico que incluye un sitio de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ensamblarse usando dominios polipeptídicos que permiten la multimerización. Los ejemplos incluyen las regiones CH2 y CH3 de las regiones Fc y las CH1 y Ckappa/lambda. Otros dominios de multimerización de proteínas de origen natural pueden usarse incluyendo dominio de cremallera de leucina (bZIP), motivo de hélice-bucle-hélice, dominio de homología de Src (SH2, SH3), una mano EF, un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), u otros dominios conocidos en la técnica.

[0113] En otro aspecto se desvela un dominio de fusión o una proteína heteróloga que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo o triacuerpo como se ha descrito anteriormente.

[0114] Un polipéptido heterólogo puede fusionarse de forma recombinante o conjugarse de forma química con un extremo N o C terminal de un sitio de unión a antígeno o molécula que lo contiene de la invención.

[0115] El polipéptido heterólogo con el que el anticuerpo o sitio de unión a antígeno se fusiona puede ser útil para dirigir las células que expresan el receptor P2X₇, o útil para alguna otra función tal como purificación, o aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos, o para su uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica.

[0116] En aspectos preferidos, una secuencia de aminoácidos marcadora tal como un péptido de hexa-histidina es útil para purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras incluyen, pero sin limitación, el marcador "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe y el marcador "flag".

Además, el sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo o triacuerpo de la invención puede modificarse por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de bloqueo/protección conocidos, escisión proteolítica, enlace con un ligando celular u otra proteína, etc.

Los sitios de unión a antígeno pueden componerse de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los sitios de unión a antígeno pueden modificarse por procesos naturales, tales como por procesamiento postraducciona, o por técnicas de modificación química que se conocen bien en este campo. Dichas modificaciones se describen bien en textos básicos, así como en la bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte en el sitio de unión a antígeno, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminal, o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o distintos grados en varios sitios en un sitio de unión a antígeno dado. Además, un sitio de unión a antígeno dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Un sitio de unión a antígeno puede ramificarse, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los sitios de unión a antígeno cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales pos-traduccionales o pueden realizarse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación.

En otro aspecto se proporciona un conjugado en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo o proteína de fusión como se ha descrito anteriormente conjugada con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un marcador tal como un isótopo radiactivo (es decir, un conjugado de radio). En otro aspecto, la invención proporciona además métodos para usar los inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los dominios variables anteriores unido covalentemente con un agente citotóxico o un agente detectable.

En otro aspecto se proporciona un anticuerpo para unión con un sitio de unión a antígeno de un dominio

variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo o triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se ha descrito anteriormente.

[0121] En otro aspecto se proporciona un ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo o triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento.

[0122] Puede generarse un polinucleótido que codifica una CDR o FR de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas generales descritas anteriormente, o un sitio de unión a antígeno comprendido por las mismas, a partir de un ácido nucleico de cualquier fuente, por ejemplo por síntesis química o aislamiento de una biblioteca de ADNc o genómica. Por ejemplo puede generarse una biblioteca ADNc a partir de una célula productora de anticuerpos tal como un linfocito B, célula plasmática o célula de hibridoma y el ácido nucleico relevante aislarse por amplificación por PCR usando oligonucleótidos dirigidos al clon de interés particular. Después pueden clonarse ácidos nucleicos aislados en vectores usando cualquier método conocido en la técnica. La secuencia de nucleótidos relevante puede después mutarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar sitios de unión a antígeno que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.

[0123] En otro aspecto se proporciona un vector que incluye un ácido nucleico descrito anteriormente. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector por una diversidad de procedimientos. En general, se inserta ADN en un sitio o en sitios de endonucleasas de restricción apropiados usando técnicas conocidas en este campo. En general los componentes del vector incluyen, pero sin limitación, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contengan uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamento convencionales que se conocen por los expertos en la materia.

[0124] El sitio de unión a antígeno puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína o el polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN que codifica sitios de unión a antígeno que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procarionota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp o líderes de enterotoxina termoestable II. Para secreción de levadura la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, líder de factor alfa o líder de fosfatasa ácida o el líder de glucoamilasa de *C. albicans*. En la expresión de células de mamífero, pueden usarse secuencias señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o una relacionada, así como líderes secretores virales.

[0125] Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del sitio de unión a antígeno usando técnicas recombinantes convencionales como se ha descrito anteriormente. Pueden sintetizarse polinucleótidos usando técnicas sintetizadores de nucleótidos o PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procarionotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo o ambos) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside.

[0126] En general, se usan en relación con estos hospedadores vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora. Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Dichas secuencias se conocen bien para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación de plásmido pBR322, que contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por tanto proporciona medios fáciles para identificar células transformadas, es adecuado para la mayoría de bacterias Gram negativas, el origen de plásmido 2 μ m, es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas.

[0127] Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son

compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, pueden utilizarse bacteriófagos tales como λ .GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

5 **[0128]** El vector de expresión puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón (siendo un cistrón el segmento de ADN que contiene toda la información para la producción de un único polipéptido). Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas típicamente quedan en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la
10 condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

[0129] Se conocen bien un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor de ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la
15 secuencia promotora aislada en el vector. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunos aspectos, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

20 **[0130]** Se conocen bien promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotor de β -galactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o el trc. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente con el ADN que codifica un sitio de unión a antígeno. Sin
25 embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo que un experto en la materia los una operativamente con cistrones que codifican las cadenas ligeras y pesadas diana usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido.

30 **[0131]** En un aspecto cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal debería ser una que se reconoce y procesa (es decir se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen ni procesan
35 las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina termoestable II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

40 **[0132]** En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, se expresan cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas de *E. coli*
45 *trxB*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades proteicas expresadas.

[0133] La presente invención desvela un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de sitios de unión a antígeno secretados
50 y ensamblados de forma apropiada. Dicha modulación se consigue al menos en parte por modulación simultánea de potencias de traducción para los componentes polipeptídicos.

[0134] Con respecto a expresión en células hospedadoras eucariotas, los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más
55 genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0135] Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o el polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y
60 procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamífero así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple, están disponibles.

[0136] El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo.

65 **[0137]** En general, no es necesario un componente de origen de replicación para los vectores de expresión de

mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse típicamente solamente porque contiene el promotor temprano.

- [0138]** Los vectores de expresión y clonación típicamente contendrán un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para Bacilos.
- [0139]** Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.
- [0140]** Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica sitios de unión a antígeno, tales como DHFR o timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096), preparada y propagada. Por ejemplo, se identifican en primer lugar células transformadas con el gen de selección de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen un DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418.
- [0141]** Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor unido operativamente con el sitio de unión a antígeno que codifica la secuencia de ácido nucleico para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales.
- [0142]** Los genes eucariotas tienen en general una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de transcripción de muchos genes es una región CCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.
- [0143]** Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas incluyendo enolasasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.
- [0144]** Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. La transcripción de sitios de unión a antígeno de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.
- [0145]** La transcripción de un ADN que codifica el sitio de unión a antígeno por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Las secuencias potenciadoras incluyen las conocidas de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.
- [0146]** Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles

habitualmente de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un sitio de unión a antígeno.

- 5 **[0147]** En otro aspecto se proporciona una célula que incluye un vector o ácido nucleico descrito anteriormente. La molécula de ácido nucleico o el vector puede estar presente en la célula hospedadora modificada genéticamente o el hospedador bien como una molécula independiente fuera del genoma, preferentemente como una molécula que es capaz de replicación, o bien puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula hospedadora o el hospedador.
- 10 **[0148]** La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota.
- [0149]** Son ejemplos de células procariotas las usadas generalmente para clonación como *E. coli* o *Bacillus subtilis*. Además, las células eucariotas comprenden, por ejemplo, células fúngicas o animales.
- 15 **[0150]** Son ejemplos de células fúngicas adecuadas las células de levadura, preferentemente las del género *Saccharomyces* y más preferentemente las de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
- [0151]** Son ejemplos de células animales, por ejemplo, células de insectos, células de vertebrados, preferentemente células de mamífero, tales como por ejemplo, HEK293, NSO, CHO, MDCK, U2-OS, Hela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A. Estas células hospedadoras, por ejemplo células CHO, pueden proporcionar modificaciones pos-traduccionales a las moléculas de anticuerpo de la invención, incluyendo retirada de péptidos líderes, plegamiento y ensamblaje de cadenas H (pesada) y L (ligera), glucosilación de la molécula en los lados correctos y secreción de la molécula funcional.
- 25 **[0152]** Pueden obtenerse líneas celulares adecuadas adicionales conocidas en la técnica de depósitos de líneas celulares, como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).
- [0153]** En otro aspecto se desvela un animal que incluye una célula descrita anteriormente. En ciertas realizaciones, los animales y tejidos de los mismos que contienen un transgén son útiles en la producción de los sitios de unión a antígeno. La introducción de las moléculas de ácido nucleico como transgenes en hospedadores no humanos y su expresión posterior puede emplearse para la producción de los sitios de unión a antígeno, por ejemplo, la expresión de dicho transgén en la leche del animal transgénico proporciona medios para obtener los sitios de unión a antígeno en cantidades cuantitativas. Los transgenes útiles a este respecto comprenden las moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, secuencias codificantes para los sitios de unión a antígeno descritos en el presente documento, unidos operativamente con estructuras promotoras y/o potenciadoras de un gen específico de glándula mamaria, como caseína o betalactoglobulina. El animal puede ser mamíferos no humanos, más preferentemente ratones, ratas, ovejas, terneros, perros, monos o simios.
- 30 **[0154]** En otro aspecto se desvela una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se ha descrito anteriormente y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- [0155]** Se conocen bien o se determinan fácilmente por los expertos en la materia métodos para preparar y administrar sitios de unión a antígeno de los mismos a un sujeto que lo necesite. La vía de administración del sitio de unión a antígeno puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica.
- 35 **[0156]** El término parenteral como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal.
- 50 **[0157]** Aunque todas estas formas de administración están claramente contempladas, una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc.
- 55 **[0158]** Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. En la invención objeto, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina 0,8 %. Otros vehículos parenterales habituales incluyen soluciones de fosfato sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales

como por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

[0159] Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles, en dichos casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se describen formulaciones adecuadas para uso en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16ª ed. (1980).

[0160] Puede conseguirse prevención de la acción de microorganismos por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0161] Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (por ejemplo, sitio de unión a antígeno) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtrado. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, lo que produce un polvo de un principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se cargan en recipientes tales como ampollas, bolsas, frascos, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de un kit. Dichos artículos de fabricación preferentemente tendrán etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos.

[0162] Las dosis eficaces de las composiciones para el tratamiento de trastornos como se describe en el presente documento varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones del tratamiento pueden valorarse usando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la materia para optimizar la seguridad y eficacia.

[0163] Para el tratamiento de ciertos trastornos con un sitio de unión a antígeno, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedador. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que los intermedios de dosis en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la invención. Puede administrarse a los sujetos dichas dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más sitios de unión a antígeno con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada sitio de unión a antígeno administrado queda dentro de los intervalos indicados.

[0164] Un sitio de unión a antígeno desvelado en el presente documento puede administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre del polipéptido diana o molécula diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración del polipéptido en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Como alternativa, los sitios de unión a antígeno pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del sitio de unión a antígeno en el paciente. La semivida de un sitio de unión a antígeno también puede prolongarse mediante fusión con

un polipéptido estable o resto, por ejemplo, albúmina o PEG. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguido de anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. En una realización, el sitio de unión a antígeno puede administrarse en forma no conjugada. En otra realización, los sitios de unión a antígeno para uso de los métodos desvelados en el presente documento pueden administrarse múltiples veces en forma conjugada. En otra realización más, los sitios de unión a antígeno pueden administrarse en forma no conjugada, después en forma conjugada, o viceversa.

[0165] La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que comprenden anticuerpos o un cóctel de los mismos a un paciente que aún no tiene la patología o antes de la patología para potenciar la resistencia del paciente. Se define que dicha cantidad es una “dosis profilácticamente eficaz”. En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero en general varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente 0,5 a 2,5 mg por dosis. Se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas.

[0166] En aplicaciones terapéuticas, se requiere en ocasiones una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de molécula de unión, por ejemplo, sitio de unión a antígeno por dosis, usándose más habitualmente dosificaciones de 5 a 25 mg para radioinmunoconjugados y dosis mayores para moléculas conjugadas con fármacos de citotoxina) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se ha reducido o terminado, y preferentemente hasta que el paciente muestra alivio parcial o completo de síntomas de la enfermedad. A continuación, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

[0167] En un aspecto, un sujeto puede tratarse una molécula de ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno (por ejemplo, en un vector). La dosis para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. La dosis para vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis. Pueden administrarse agentes terapéuticos por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico, en algunos métodos, se inyectan agentes directamente en un tejido particular donde se han acumulado células de receptor P2X₇ no funcional, por ejemplo, inyección intracraneal. Se prefiere inyección intramuscular o infusión intravenosa para administración del anticuerpo, en algunos métodos, se inyectan anticuerpos terapéuticos particulares directamente en el cráneo. En algunos métodos, se administran anticuerpos como una composición o un dispositivo de liberación sostenida.

[0168] Un sitio de unión a antígeno puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesita tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico).

[0169] En otro aspecto se desvela una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se ha descrito anteriormente, un diluyente y opcionalmente un marcador.

[0170] En ciertas realizaciones, los sitios de unión a antígeno o molécula que los incluye se marcan de forma detectable. Pueden usarse muchos marcadores diferentes incluyendo enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes. Se usan habitualmente fluorocromos (fluoresceína, rodamina, Texas Red, etc.), enzimas (peroxidasa de rábano rusticano, β-galactosidasa, fosfatasa alcalina, etc.), isótopos radiactivos (³²P o ¹²⁵I), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos quimio o bioluminiscentes (dioxetanos, luminol o acridinios).

[0171] Los métodos de detección dependen del tipo de marcador usado e incluyen autorradiografía, microscopía de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas. Los ejemplos incluyen transferencia de Western, ensayos de superposición, RIA (Radioinmunoensayo) e IRMA (Ensayo radioinmunométrico inmunitario), EIA (Inmunoensayo Enzimático), ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas), FIA (Inmunoensayo Fluorescente) y CLIA (Inmunoensayo Quimioluminiscente).

[0172] En otro aspecto se desvela un kit o artículo de fabricación que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

[0173] En otro aspecto se desvela un kit para su uso en una aplicación terapéutica mencionada anteriormente, incluyendo el kit:

- un recipiente que contiene una composición terapéutica en forma de uno o más de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica;

- una etiqueta o un prospecto con instrucciones para su uso.

[0174] En ciertos aspectos el kit puede contener uno o más principios activos o ingredientes adicionales para el tratamiento de un cáncer o para prevenir una complicación relacionada con el cáncer descrita anteriormente, o una afección o enfermedad asociada con la expresión del receptor P2X₇ no funcional.

[0175] El kit o “artículo de fabricación” puede comprender un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, envases de tipo blíster, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición terapéutica que es eficaz para tratar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indican que la composición terapéutica se usa para el tratamiento de la afección elegida. En una realización, la etiqueta o el prospecto incluyen instrucciones para su uso e indican que la composición terapéutica puede usarse para tratar un cáncer o para prevenir una complicación que surge de un cáncer.

[0176] El kit puede comprender (a) una composición terapéutica; y (b) un segundo recipiente con un segundo principio activo o ingrediente contenido en el mismo. El kit puede comprender además un prospecto que indica que el principio activo y otros principios activos pueden usarse para tratar un trastorno o prevenir una complicación que surge de cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el kit puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0177] En ciertos aspectos la composición terapéutica puede proporcionarse en forma de un dispositivo, desechable o reutilizable, que incluye un receptáculo para contener la composición terapéutica. En una realización, el dispositivo es una jeringa. El dispositivo puede contener 1-2 ml de la composición terapéutica. La composición terapéutica puede proporcionarse en el dispositivo en un estado que está listo para su uso o en un estado que requiera mezcla o adición de componentes adicionales.

[0178] En otro aspecto se desvela un kit o artículo de fabricación que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o una composición de diagnóstico como se ha descrito anteriormente.

[0179] En otros aspectos se desvela un kit para su uso en una aplicación de diagnóstico mencionado anteriormente, incluyendo el kit:

- un recipiente que contiene una composición de diagnóstico en forma de uno o más de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado;
- una etiqueta o un prospecto con instrucciones para su uso.

[0180] El kit o “artículo de fabricación” puede comprender un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, paquetes de tipo blíster, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de diagnóstico que es eficaz para la detección de cáncer y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indica que la composición de diagnóstico se usa para detectar la afección elegida. En una realización, la etiqueta o el prospecto incluye instrucciones para su uso e indica que la composición de diagnóstico puede usarse para detectar un cáncer o una enfermedad o afección caracterizada por expresión del receptor P2X₇ no funcional.

[0181] El kit puede comprender (a) una composición de diagnóstico; y (b) un segundo recipiente con un segundo agente de diagnóstico o segunda etiqueta contenida en el mismo. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, etc.

[0182] En otro aspecto se desvela un método para producir un sitio de unión a antígeno anti-P2X₇ como se ha descrito anteriormente incluyendo expresar un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente en una célula o animal no humano como se ha descrito anteriormente.

[0183] La producción de un sitio de unión a antígeno requiere en general un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el sitio de unión a antígeno de la invención. Puede obtenerse un polinucleótido que codifica un sitio de unión a antígeno y subclonarse en un vector para la producción de un sitio de unión a antígeno

por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en este campo, incluyendo técnicas descritas en el presente documento. Se contemplan muchos sistemas de expresión diferentes incluyendo el uso de células de mamífero incluyendo células humanas para la producción y secreción de sitios de unión a antígeno. Los ejemplos de células incluyen 293F, CHO y la línea celular NSO.

5

[0184] Pueden construirse vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de proteínas y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas usando métodos conocidos en la técnica. Estos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. En ciertos aspectos se desvela un vector replicable que tiene un ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno unido operativamente con un promotor. Las células transfectadas con un vector de expresión pueden cultivarse por técnicas convencionales para producir un sitio de unión a antígeno. Por lo tanto, en ciertos aspectos, se desvelan células hospedadoras o transfectantes celulares que contienen un polinucleótido que codifica un sitio de unión a antígeno de la invención unido operativamente con un promotor. El promotor puede ser heterólogo. Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector expresión y en ciertos sistemas la maquinaria de transcripción del sistema de vector está particularmente adaptada a la célula hospedadora. Por ejemplo, pueden transfectarse células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) con un vector que incluye el elemento promotor génico temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano. Adicionalmente o como alternativa, puede usarse una célula hospedadora que modula la expresión de secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico según se requiera, incluyendo diversas formas de modificación post-traduccionales. Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero que tienen procesos de modificación post-traduccionales particulares incluyen células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NSO, CRL7030 y HsS78Bs.

[0185] Dependiendo del uso pretendido para la molécula proteica, pueden seleccionarse provechosamente varios vectores de expresión bacteriana. En un ejemplo, pueden usarse vectores que provocan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente, tales como el vector de expresión de *E. coli* pUR278 cuando va a producirse una gran cantidad de un sitio de unión a antígeno. El producto de expresión puede producirse en forma de una proteína de fusión con lacZ. Otros vectores bacterianos incluyen vectores pIN y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos ajenos como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). Estas proteínas de fusión son generalmente solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión con matriz de afinidad de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Puede proporcionarse un sitio de escisión por proteasa de trombina y/o factor Xa en el polipéptido expresado de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto de GST.

[0186] Puede usarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos en un sistema de insectos incluyendo células de *Spodoptera frugiperda*. El promotor particular usado puede depender de dónde se inserte la codificación de proteína en la secuencia. Por ejemplo, la secuencia puede clonarse individualmente en el gen de polihedrina y colocarse bajo el control del promotor de polihedrina.

40

[0187] Pueden usarse sistemas de expresión basados en virus con células de mamífero tales como un adenovirus por el que la secuencia codificante de interés puede ligarse con el promotor tardío adenoviral y secuencia líder tripartita. Después puede usarse recombinación *in vitro* o *in vivo* para insertar este gen quimérico en el genoma adenoviral. Las inserciones en la región E1 o E3 darán como resultado un virus recombinante viable que es capaz de expresar el sitio de unión a antígeno en células hospedadoras infectadas. Pueden requerirse señales de inicio específicas que incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes para traducción eficaz de secuencias codificantes de sitios de unión a antígeno insertados. Pueden obtenerse señales y codones de inicio y de control de la traducción de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Pueden usarse elementos potenciadores de la transcripción y terminadores de la transcripción para potenciar la eficacia de expresión de un sistema basado en virus.

50

[0188] Cuando se requiera producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. En general se usa un gen marcador seleccionable de modo que después de la transfección, las células se cultiven durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se transfieran a un medio que contiene un medio selectivo en el que pueden explorarse las células que contienen el marcador seleccionable correspondiente, por ejemplo, resistencia a antibióticos. El resultado es que las células que tienen el plásmido integrado de forma estable en sus cromosomas crecen y forman focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Los genes de la timidina quinasa, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa del virus del herpes simple son ejemplos de genes que pueden emplearse en células tk⁻, hgrpt⁻ o aprT⁻, respectivamente proporcionando de este modo sistemas de selección apropiados. Los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato; *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico; *neo*, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418; e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina son ejemplos de genes que pueden usarse en sistemas de selección antimetabolitos.

[0189] Un sitio de unión a antígeno puede purificarse por un sistema de expresión recombinante por métodos

conocidos incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad (especialmente afinidad por los antígenos específicos Proteína A o Proteína G) y cromatografía en columna de filtración en gel), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. La purificación puede facilitarse proporcionando el sitio de unión a antígeno en forma de una proteína de fusión.

5

[0190] Puede producirse grandes cantidades de los sitios de unión a antígeno por un proceso que puede cambiarse de escala partiendo de un sistema de expresión piloto en un laboratorio de investigación que se aumenta de escala hasta un biorreactor de escala analítica (típicamente biorreactores de 5 l a aproximadamente 50 l) o biorreactores de escala de producción (por ejemplo, pero sin limitación 75 l, 100 l, 150 l, 300 l o 500 l). Los procesos que pueden cambiarse de escala deseables incluyen en los que hay niveles de bajos a indetectables de agregación como se mide por HPSEC o rCGE, típicamente no más de 5 % de agregación en peso de la proteína hasta no más del 0,5 % en peso de agregación de proteína. Adicionalmente o como alternativa, pueden desearse niveles indetectables de fragmentación medidos con respecto al área máxima total que representan el sitio de unión a antígeno intacto en un proceso que puede cambiarse de escala de modo que al menos el 80 % y hasta el 99,5 % o más del área máxima total represente sitio de unión a antígeno intacto. En otras realizaciones, el proceso que puede cambiarse de escala de la invención produce sitios de unión a antígeno a eficacia de producción de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 300 mg/l o más.

[0191] En otro aspecto se desvela un método para el tratamiento de una enfermedad o afección caracterizado por la expresión del receptor P2X₇ no funcional en un individuo que incluye la etapa de proporcionar un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente a un individuo que requiere un tratamiento para dicha afección. Típicamente la afección es cáncer, especialmente un cáncer epitelial como se describe en el presente documento.

25

[0192] Las enfermedades pre-neoplásicas y neoplásicas son ejemplos particulares a los que pueden aplicarse los métodos de la divulgación. Los ejemplos generales incluyen tumores de mama, tumores colorrectales, adenocarcinomas, mesotelioma, tumores de vejiga, tumores de próstata, tumor de células germinales, hepatoma/colangiocarcinoma, tumores neuroendocrinos, neoplasia de la hipófisis, tumor de células pequeñas de ciclo 20, cáncer de células escamosas, melanoma, fibroxantoma atípico, seminomas, no seminomas, tumores celulares de leydig del estroma, tumores de células de Sertoli, tumores cutáneos, tumores renales, tumores testiculares, tumores cerebrales, tumores ováricos, tumores estomacales, tumores orales, tumores de vejiga, tumores óseos, tumores del cuello uterino, tumores esofágicos, tumores laríngeos, tumores hepáticos, tumores pulmonares, tumores vaginales y tumor de Wilms.

35

[0193] Los ejemplos de cánceres particulares incluyen pero sin limitación adenocarcinoma, adenoma, adenofibroma, adenolinfoma, adontoma, cánceres relacionados con SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma de partes blandas alveolar, ameloblastoma, angioqueratoma, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, apudoma, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de hueso, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, tumores del cerebro y el SNC, cáncer de mama, branquioma, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer del cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma de linfocitos T cutáneo, carcinoma (por ejemplo, Walker, células basales, basoescamosas, Brown-Pearce, ductales, tumor de Ehrlich, Krebs 2, células de Merkel, mucinosas, pulmón de células no pequeñas, células en granos de avena, papilar, cirroso, bronquiolar, broncogénico, células escamosas y células transicionales), carcinosarcoma, displasia del cuello uterino, cistosarcoma filoides, cementoma, cordoma, coristoma, condrosarcoma, condroblastoma, craneofaringioma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, dermatofibrosarcoma protuberante, tumor de células redondeadas pequeñas desmoplásicas, carcinoma ductal, disgerminoma, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, endimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de los conductos biliares extra-hepáticos, cáncer del ojo; melanoma del ojo, retinoblastoma, cáncer de las trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibroma, fibrosarcoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, tumores de células gigantes, ganglioneuroma, glioma, glomangioma, tumor de células de la granulosa, ginandroblastoma, tumores malignos hematológicos, leucemia por tricoleucitos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, lunar hidatidiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, hamartoma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, hemangiosarcoma, trastornos histiocíticos, histiocitosis maligna, histiocitoma, hepatoma, hidradenoma, hondrosarcoma, opoma pequeño inmunoproliferativo, melanoma intraocular, cáncer de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de langerhans, cáncer de la laringe, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de li-fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, leiomiomasarcoma, leucemia (por ejemplo, células b, células mixtas, células nulas, linfocitos t, crónico de linfocitos t, asociado a htlv-ii, linfangiosarcoma, agudo

65

linfocítico, crónico linfocítico, mastocitos y meloide), leucosarcoma, tumor de células de leydig, liposarcoma, leiomoma, leiomiosarcoma, linfangioma, linfangiocitoma, linfagioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno del riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, meduloblastoma, meningioma, melanoma, mesenquimoma, mesonefoma, mesotelioma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, mixoma, mixosarcoma, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nijmegen, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (nsccl), neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibromatosis, neurofibroma, neuroma, neoplasias (por ejemplo, de hueso, de mama, del sistema digestivo, colorrectal, de hígado), cánceres oculares, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer ovárico de ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de la glándula parótida, cáncer del pene, tumores periféricos neuroectodérmicos, cáncer de la hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, osteoma, osteosarcoma, carcinoma ovárico, papiloma, paraganglioma, paraganglioma no cromafina, pinealoma, plasmacitoma, protooncogén, cánceres poco habituales y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, reticuloendoteliosis, rabdomioma, cáncer de las glándulas salivares, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (scl), cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, sarcoma (por ejemplo, sarcomas experimentales de Ewing, de Kaposi y de mastocitos), tumor de células de Sertoli, sinovioma, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer tiroideo, cáncer de células transicionales (vejiga), cáncer de células transicionales (pelvis-renal/uréter), cáncer trofoblástico, teratoma, tumor de células de la teca, timoma, tumor trofoblástico, cáncer de la uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer del útero, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

[0194] Otras enfermedades y afecciones incluyen diversas afecciones inflamatorias. Los ejemplos pueden incluir un componente proliferativo. Los ejemplos particulares incluyen acné, angina, artritis, neumonía de aspiración, enfermedad, empiema, gastroenteritis, inflamación, gripe intestinal, nee, enterocolitis necrotizante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, pid, pleuresía, dolor de garganta, rojez, rubor, garganta dolorida, gripe estomacal e infecciones del tracto urinario, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica o polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

[0195] En otro aspecto se desvela un uso de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFsv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para tratamiento de cáncer.

[0196] La cantidad de dosificación, frecuencia de dosificación, vías de administración, etc. se han descrito en detalle anteriormente.

[0197] En otro aspecto se desvela un método para el diagnóstico de cáncer que incluye la etapa de poner en contacto tejidos o células para los que debe determinarse la presencia o ausencia de cáncer con un reactivo en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFsv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición de diagnóstico como se ha descrito anteriormente y detectar la unión del reactivo con los tejidos o células. El método puede realizarse *in vivo* o *in vitro*.

[0198] Para diagnóstico *in situ*, el sitio de unión a antígeno puede administrarse al organismo para diagnosticar por inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial u otras vías de modo que pueda producirse una unión específica entre un sitio de unión a antígeno de acuerdo con la invención con una región epitópica en el receptor P2X₇ no funcional. El complejo de anticuerpo/antígeno puede detectarse convenientemente mediante un marcador unido al sitio de unión a antígeno o un fragmento funcional del mismo o cualquier otro método de detección conocido en la técnica.

[0199] Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico y como se describen en el presente documento típicamente se basan en antígenos marcados, anticuerpos o reactivos secundarios para detección. Estas proteínas o reactivos pueden marcarse con compuestos que se conocen en general por los expertos habituales en la materia incluyendo enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo, pero sin limitación, partículas coloreadas, tales como oro coloidal y perlas de látex. De estos, el marcaje radiactivo puede usarse para casi todos los tipos de ensayos y con la mayoría de variaciones. Los marcadores conjugados con enzimas son particularmente útiles cuando debe evitarse la radiactividad o cuando sean necesarios resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren un equipamiento caro para su uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos policlonales con afinidad purificada.

[0200] Como alternativa, el sitio de unión a antígeno puede marcarse indirectamente por reacción con sustancias

marcadas que tienen una afinidad por inmunoglobulina, tales como proteína A o G o anticuerpos secundarios. El sitio de unión a antígeno puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tiene una afinidad por la segunda sustancia conjugada con el sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno puede conjugarse con biotina y el conjugado de sitio de unión a antígeno-biotina detectarse usando avidina o estreptavidina marcada. De forma similar, el sitio de unión a antígeno puede conjugarse con un hapteno y el conjugado de sitio de unión a antígeno-hapteno detectarse usando anticuerpo anti-hapteno marcado.

[0201] En ciertos aspectos, los inmunoensayos utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en el que el sitio de unión a antígeno se marca indirectamente por reactividad con un anticuerpo secundario que se ha marcado con un marcador detectable. El anticuerpo secundario es preferentemente uno que se une con anticuerpos del animal del que deriva el sitio de unión a antígeno. En otras palabras, si el sitio de unión a antígeno es un anticuerpo de ratón, entonces el anticuerpo secundario, marcado, es un anticuerpo anti-ratón. Para que el sitio de unión a antígeno se use en el ensayo descrito en el presente documento, este marcador es preferentemente una perla recubierta con anticuerpo, particularmente una perla magnética. Para que el sitio de unión a antígeno se emplee en el inmunoensayo descrito en el presente documento, el marcador es preferentemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

[0202] También puede emplearse un sistema de anticuerpo doble alternativo, denominado con frecuencia sistemas de formato rápido porque se adaptan a determinaciones rápidas en presencia de un analito. El sistema requiere alta afinidad entre el sitio de unión a antígeno y el analito. De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, la presencia del receptor P2X₇ no funcional se determina usando un par de sitios de unión a antígeno, cada uno específico para la proteína del receptor P2X₇. Uno de dichos pares de sitios de unión a antígeno se denomina en el presente documento "sitio de unión de antígeno detector" y el otro de dicho par de sitios de unión a antígeno se denomina en el presente documento "sitio de unión a antígeno de captura". El sitio de unión a antígeno puede usarse como un sitio de unión a antígeno de captura o un sitio de unión a antígeno detector. El sitio de unión a antígeno también puede usarse como sitio de unión a antígeno tanto de captura como detector, juntos en un único ensayo. Un aspecto de la presente divulgación usa por lo tanto el método de tipo sándwich de sitios de unión a antígeno doble para detectar el receptor P2X₇ no funcional en una muestra de fluido biológico. En este método, el analito (proteína de receptor P2X₇ no funcional) se intercala entre el sitio de unión a antígeno detector y el sitio de unión a antígeno de captura, inmovilizándose de forma irreversible el sitio de unión a antígeno de captura en un soporte sólido. El sitio de unión a antígeno detector contendría un marcador detectable, para identificar la presencia del sándwich de analito-sitio de unión a antígeno y por lo tanto la presencia del analito.

[0203] Las sustancias de fase sólida ejemplares incluyen, pero sin limitación, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, perlas magnéticas, de plástico o de vidrio y portaobjetos que se conocen bien en el campo de radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático. Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para acoplar sitios de unión a antígeno a fases sólidas. Más recientemente, se han empleado varios materiales porosos tales como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

[0204] Se pretende que los siguientes ejemplos se ilustren pero sin limitación la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS DE dAB PARA UNIÓN CON RECEPTORES NO FUNCIONALES EN CÉLULAS VIVAS

[0205] Objetivo: Los experimentos descritos en el presente documento han sido para encontrar sitios de unión a antígeno que se unen con el péptido E200.

[0206] Antecedentes: Los antisueros que se unen con P2X₇ tienen baja afinidad por P2X₇ como se expresa en células de cáncer de hígado ya que la conformación de la diana epitópica en células de cáncer vivas difiere. Para identificar candidatos de dAb para agentes de unión de alta afinidad, fue necesario en primer lugar identificar una diana adecuada, sabiendo que se requiere una buena diversidad de secuencias de agentes de unión para ampliar la exploración del espacio conformacional para abarcar compuestos candidatos adecuados. Se seleccionó el péptido E200 como una diana adecuada para identificar candidatos de dAb.

[0207] Materiales y métodos: El péptido E200 se realizó por síntesis de fase sólida en Chiron Mimotopes. Se sintetizó una serie de conjugados para identificar los que más probablemente eran útiles para fines de exploración. Estos incluían conjugados proteicos BSA, DT y ovoalbúmina unidos con el residuo cys C terminal en el péptido E200 mediante MCS. Una cuarta variante implicaba biotinar el péptido E200 en el extremo C terminal.

[0208] Se identificaron inicialmente clones candidatos como positivos para ELISA en exploraciones tanto de fase sólida como de fase de solución. Estas se realizaron frente a los péptidos tanto conjugados como no conjugados. Se sintetizaron péptidos adicionales (200-208 y 207-215) para diferenciar más completamente las regiones de unión de

los diversos clones candidatos. Se ensayaron las propiedades de solución usando SEC-MALLS de los clones candidatos para asegurar que eran adecuados para desarrollo posterior.

Resultados:

- 5
- [0209] Se identificó y se aisló un gran número de candidatos de primera generación que se unieron inicialmente con el péptido E200 con afinidad de unión en el intervalo de K_D μ M como se mide por Biacore y después se unieron de forma detectable por citometría de flujo con células cancerosas vivas que expresaban la diana del receptor P2X₇ no funcional en su superficie. Los anticuerpos de un único dominio producidos a partir de biblioteca de presentación en fagos Domantis explorada frente al antígeno peptídico E200 mostraron una K_D del orden de 1 μ M usando análisis de unión de Biacore. Los clones candidatos que se llevan adelante mostraron diversidad en sus características de unión. Tres dAb candidatos, PEP2-2, PEP2-4 y PEP2-5 mostraron la mayor afinidad cuando se ensayaron en células de cáncer de próstata humana PC3 vivas por citometría de flujo. La exploración adicional implicó el uso de inmunohistoquímica convencional en la que se incubó tejido humano normal y canceroso con el dAb seleccionado marcado con el marcador Myc al que se añadió anticuerpo anti-Myc con HRP. Se añadió diaminobenzoato (DAB) para reaccionar con cualquier HRP restante después de completarse las etapas de lavado debidas. PEP2-4 y PEP2-5 se unieron moderadamente al tejido tumoral pero no al tejido normal tal como próstata y piel humana mientras que PEP2-2 fue un ejemplo de un candidato de dAb que mostró poca unión eficaz con tejido en la exploración inicial.
- 10
- [0210] Se realizó selección pasiva usando los péptidos E200, el conjugado E200-BSA, el conjugado de E200 y ovalbúmina y el conjugado de E200-DT mientras que la exploración de solución usó el péptido biotinilado ensayado después usando estreptavidina. Las selecciones tanto pasivas como en solución de los numerosos dAb candidatos funcionó bien con agentes de unión específicos que demostraban una buena diversidad de secuencia en forma de dominios V_H individuales. La exploración frente al péptido E200 y partes más pequeñas (200-208 y 207-215) reveló que los dAb candidatos se unían con diferentes regiones. Se llevaron adelante los que tenían las mejores propiedades de solución, que eran la mayor solubilidad de monómeros. Los que demostraron características de unión de Biacore bifásico no se llevaron adelante. Todos mostraron unión μ M con el péptido E200. En última instancia se llevaron a cabo un total de cinco ciclos de exploración como se muestra en el Ejemplo 5. Un ejemplo de los resultados del Ciclo 2 se muestra en la Figura 1.
- 20
- [0211] A continuación hay un ejemplo de dAb que se une con tejido canceroso en el que se tiñó tejido canceroso de cuello uterino humano con dAb marcado con c-Myc PEP2-4 y después se desarrolló usando anticuerpo de ratón anti-Myc (1:600) seguido del sistema de detección del polímero secundario Mach4 de Biocare Medical y DAB. Para inhibir la unión, se añadió el sustrato peptídico al primario a concentraciones de 0 (Figura 2), 25 nM (sin pérdida de unión), 0,25 μ M (sin pérdida de unión), 10 μ M (sin pérdida de unión), 0,1 mM (Figura 3) y 1 mM (Figura 4).
- 25
- [0212] No se observó inhibición de la unión a una concentración menor de 0,01 mM lo que indica que el ideal para 50 % de inhibición es de aproximadamente 40-50 μ M.
- 30
- [0213] Se muestra un segundo conjunto de secciones seriadas en las Figuras 5-7 de diferentes secciones tisulares, aumento también 10x.
- 35
- [0214] La diferencia entre péptido de competición añadido 0 y 10 μ M en contraste fue mínima como se muestra en las Figuras 8 (sin péptido) y 9 (péptido 10 μ M).
- 40
- [0215] Hay una clara inhibición a 100 μ M sin inhibición a 10 μ M lo que indica que la unión al 50 % de inhibición parece ser de aproximadamente 40-50 μ M en este sistema.
- 45
- [0216] Una sección de tejido de melanoma humano teñido de forma similar con dAb PEP2-4 20 nM se muestra en la Figura 10 posterior.
- 50
- [0217] **Conclusión:** Se identificaron sitios de unión a antígeno en forma de candidatos de dAb para unión de P2X₇ con células PC3 de alta afinidad. Se desconocía si estos sitios de unión a antígeno interactúan con un epítipo lineal o conformacional y se investigó posteriormente. El refinamiento de los candidatos requirió exploración adicional frente a un epítipo conformacional que representaba la forma del sitio de unión a antígeno diana E200 como se expresa en células cancerosas.
- 55

Ejemplo 2 – DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CANDIDATOS DE dAb EN FORMATO dAb-Fc

- 60
- [0218] **Objetivo:** Los experimentos descritos en el presente documento han sido para mejorar la afinidad de sitios de unión a antígeno que se unen con el péptido E200 mediante el formateo de dAb candidatos como dAb-Fc.
- [0219] **Antecedentes:** Se consiguió unión cooperativa de los dAb candidatos produciendo dAb-Fc de formato convencional con el subtipo IgG1 Fc de tipo humano. Estos formatos permitieron más exploración considerada de los clones de dAb candidatos permitiendo la eliminación de dAb candidatos de alta afinidad para los que el formateo
- 65

como dAb-Fc proporcionó poco beneficio debido a problemas de solubilidad. Después se seleccionarían soluciones conformacionales favorables para ciclos adicionales de exploración.

5 [0220] Resultados: Los primeros dab formateados PEP2-4 y PEP2-5 que se habían seleccionado como candidatos de alta afinidad del Ejemplo 1 mostraron poca unión adicional con el péptido E200 mientras que PEP2-2 y otros (2-47, 2-42) se beneficiaron con una mejora típica en K_D de 100-1000 veces. El formateo de los diversos candidatos dio como resultado una buena expresión como se desvela en el gel SDS-PAGE en la Figura 11.

10 [0221] La mejora de la unión es evidente con los candidatos que incluyen PEP2-2, PEP2-42, PEP2-47 mostrados en la Figura 12 en los que la micro placa de Biacore se recubrió con 100 UR de E200 y cada dAb-Fc se procesó a 100 nM.

Ejemplo 3 – DETERMINACIÓN DE UN EPÍTOPO CONFORMACIONAL PARA EXPLORACIÓN FRENTE A CANDIDATOS DE dAb

15 [0222] **Objetivo:** Los experimentos descritos en el presente documento han sido para determinar un epítipo conformacional apropiado para encontrar dAb que se unen con el péptido E200 y también se unen con un epítipo conformacional.

20 [0223] **Antecedentes:** Los agentes de unión de alta afinidad son para unirse con un dominio extracelular del receptor P2X₇ no funcional. La secuencia de P2X₇ se muestra en SEC ID N°: 1. Hay varias construcciones posibles que podrían desarrollarse pero hubo que determinar cuál de estas modelarían los epítopos conformacionales como se observa en una célula cancerosa viva. Fue necesario particularmente una diana que pudiera unirse con una fase sólida para posteriores experimentos de maduración de afinidad.

25 [0224] Se comenzó con ECD1 que tiene la estructura 47-332 porque este constituye todos los aminoácidos que forman el dominio extracelular entre los dominios transmembrana TM1 y TM2 incluyendo el segmento intramembranoso potencial en el extremo C terminal del segmento de 325-332. Incluyendo todos los restos se consideró probable que la estructura en torno al E200 diana se conservara.

30 [0225] **Materiales y métodos:** Se construyó ECD1 de forma recombinante usando procedimientos de biología molecular convencionales y se expresó en células *E. coli* como proteína soluble y se formateó como pECD-Fc y en pDisplay para inmunofluorescencia, transferencia de Western y citometría de flujo. La estructura de pDisplay tuvo la forma mostrada en el esquema de la Figura 13.

35 [0226] **Resultados:** Se compararon la expresión en superficie celular del P2X₇ en forma de tipo silvestre (WT) y en dos formas mutantes de longitud completa no funcionales (R307Q y E496A) junto con el ECD1 en células HEK293E y se midió con Transferencia de Western. Los lisados celulares y la expresión en superficie celular se comparó en las tres formas y se añadió el marcaje al ECD1. Se usó anticadherina como un control de normalización. Las células se biotinizaron con sulfo-NHS-SS-biotina, la reacción se detuvo y se realizó lisis con detergente suave. En este estadio se conservó una alícuota para indicación de la proteína celular total. La proteína biotinilada se capturó con resina de neutravidina que se lavó y eluyó con DTT 50 mM. El sobrenadante se conservó para una indicación del grupo intracelular de proteína específica. Las muestras se procesaron después en SDS PAGE reductor convencional/Western (Figura 14).

45 [0227] La expresión en superficie celular indica una reducción de los niveles de los mutantes no funcionales en comparación con WT en la superficie celular. La expresión de ECD1 de pDisplay expresado es eficazmente alta. Esta forma de la proteína se marca por anticuerpos para la forma no funcional del receptor, la forma específica de tumor y puede por lo tanto considerarse una posible forma representativa de tumor. Los monocitos, por el contrario, que expresaban la forma WT, fueron incapaces de unirse con los dAb. La eficacia de unión de los dab con el pDisplayECD1 fue menor que lo que indicaban los niveles de expresión que debería haber sido. Esto indica que la unión del epítipo diana en células vivas tienen impedimento estérico y la estructura de ECD1 es subóptima.

50 [0228] **Conclusión:** Aunque la construcción ECD1 se unió con candidatos de dAb lo que indica unión con un epítipo conformacional, la unión fue subóptima lo que planteó dudas con respecto a si esta construcción sería útil para estudios de maduración de afinidad.

Ejemplo 4 - DETERMINACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN ADICIONAL PARA MADURACIÓN DE AFINIDAD DE dAb CANDIDATOS

60 [0229] **Objetivo:** Producir una construcción que podría usarse en estudios de maduración de afinidad.

[0230] **Antecedentes:** El Ejemplo 3 reveló que ciertas isoformas de ECD podrían no reproducir epítopos conformacionales de P2X₇ como se observa en tumores vivos. Se decidió intentar una construcción adicional en forma de la estructura 47-306 (ECD2).

[0231] Materiales y métodos: Se construyó ECD2 de forma recombinante como en el Ejemplo 3, en forma soluble, formato Fc y como pDisplay para inmunofluorescencia, Transferencia de Western y citometría de flujo.

- 5 **[0232] Resultado:** Se muestra en la Figura 15 expresión de ECD2 como una construcción de Fc. Se muestra un SDS-PAGE reductor con fracciones de Proteína A en dos formas: WT (funcional) y formas mutantes K139A (no funcionales). Se identificaron dAb que se unían con la construcción ECD2. NB es una alícuota del sobrenadante que representa proteína no unida con Proteína A.
- 10 **[0233]** Las especies de dAb-Fc PEP2-4 y PEP2-5 junto con dAb de control HEL4 se procesaron en geles no reducidos y reducidos y Western correspondientes procesados en las fracciones reveladas con anticuerpo anti-P2X₇ (Figura 16). Tanto la expresión de dAb-Fc como la expresión de ECD2-Fc está clara. Los geles reducidos muestran marcaje específico en el ECD2Fc del anticuerpo anti-P2X₇ a 62 kDa con un fragmento proteolítico de menor peso molecular (monocatenario) a 31 kDa. Los Western correspondientes muestran reactividad con ambas bandas de
- 15 ECD2 pero ninguna con HEL4Fc, PEP2-4Fc o PEP2-5Fc.

[0234] La unión por citometría de flujo con células HEK293E vivas que expresaban pDisplay-ECD2 se mejoró claramente (Figura 17). La selección de unión de células vivas con HEL4 como el agente de unión de control negativo mostró claras mejoras con un mayor porcentaje de células positivas detectadas con dAb candidatos lo que

20 indica que el epítipo diana tenía menos impedimento estérico y estaba disponible para unión (Figura 18).

[0235] Conclusión: Se han identificado sitios de unión a antígeno que se unen con el receptor P2X₇ no funcional en células vivas y en ECD2. La retirada de los restos 307-332, comenzando a una estimación de 3 nm del sitio del epítipo de E200 tiene unión mejorada con la retirada de impedimento estérico parcial. No se produce pérdida de

25 conformación de E200 incluso aunque se esperaría que el segmento 307-332 estabilizara el plegamiento proteico ya que interacciona estrechamente con el segmento N terminal.

Ejemplo 5 – Generación de diversos agentes de alta afinidad.

- 30 **[0236] Objetivo:** Generar sitios de unión a antígeno con alta afinidad por el receptor P2X₇ no funcional.

[0237] Antecedentes: Los sitios de unión a antígeno del Ejemplo 1 que tienen las siguientes secuencias:

	CDR1	CDR2	CDR3
WT	SSYAMS---AISGSGGSTYYADSVKG---CAKSYGA-----FDY		
PEP2-2	RNHD.G---AISGSGGS.....---EPKPMDE-----Y		
PEP2-47	PMKD.G---AISGSGGS.....---EPSHFDRP-----Y		
PEP2-42	DNVE.S---SIGSKGED.....---QTVNVPEPA---AY		
PEP2-1	DNEP.G---S.AD..NH.....---QR.LNRYRAQ---Y		
PEP2-5	PASN..---S.TA..YR.....---QGQISNFPR---Y		
PEP2-4	GM.N..---S.NAT..R.....---FNRFSHRQYN---Y		
PEP2-34	T.TSD.LR.....---VHTFANRSLN---Y		
PEP2-7	GA.S..---T.N...LA.....---CSSCTSLNAN---Y		
PEP2-11	AR.P.A---S.D.G.LQ.....---ASAPKYFR---Y		
PEP2-30	AK.P.V---S.GPG.AR.....---PWRVYSYDR---Y		
PEP2-13	...A.A---T.D.N.LI.....---LQRYDRYTLN..Y		

- 35 se usaron como puntos de partida para ciclos por iteraciones de selección aleatoria y exploración sujetos a problemas de unión en el formato de Fc, solubilidad y posesión de una traza de disociación unifásica en Biacore. PEP2-2 y PEP2-47 poseían las características requeridas y se seleccionaron para maduración de afinidad incluso aunque tenían sorprendentemente menor afinidad de dominio individual por las dianas conformacional de ECD2 y de
- 40 péptido E200 que otros dAb candidatos tales como PEP2-4 y PEP2-5.

[0238] Materiales y métodos: Se maduró la afinidad de los dominios V_H seleccionados incluyendo 2-2, 2-47 y descendientes mediante 6 ciclos de diversificación de secuencia que incluían todas las CDR así como todas las regiones marco conservadas mediante diversificación de NNS que tomaron muestras de los 20 aminoácidos en cada

45 posición. El armazón de la biblioteca de V_H originado del V_H humano que dio lugar al control de HEL4 sin unión y los diversos agentes de unión positivos tiene la secuencia:

VHD

EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCAASGVNVSHDSMTWVRQAPGKGLEWVSAIRGPNGSTYYADSVKGRFTISR

50

DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGARHADTERPPSQQTMPFWGQGTLTVSS

[0239] Se generaron bibliotecas propensas a errores con una tasa de error de 2,7 aminoácidos. Se exploraron

grupos de clones frente al E200 inicialmente y después el ECD2 por ELISA de fagos con respecto a afinidad de unión aumentada. Se subclonaron ocho bibliotecas propensas a errores en el vector de expresión de dAb soluble pDOM38 sin marcador. Se llevó a cabo selección pasiva hasta el Ciclo 3. Se exploró un total de 1000 clones por Biacore a partir de las bibliotecas de Ciclo 5 PEP2-42, PEP2 agrupados y la biblioteca de Ciclo 4 PEP2 agrupados.

5 El grupo de clones representa los clones de PEP2 2-1, 2-2, 2-11, 2-13, 2-30, 2-34, 2-42 y 2-47. Se observó mejora en las velocidades de disociación por Biacore. La exploración de ELISA frente a E200 biotinilado 1 nM mostró mejora de CE_{50} del intervalo de 10^7 a 10^6 $\mu\text{g/ml}$ en el Ciclo 3 a 10^4 $\mu\text{g/ml}$ en el Ciclo 5, muy por encima de los dAb de control.

10 **[0240]** Se muestra en la Figura 19 el seguimiento por Biacore de clones de PEP2-42 seleccionados para péptido E200. El clon parental y los dAb de control de HEL4 están en la parte inferior de la figura. Se muestran variaciones de secuencia de los clones seleccionados en la siguiente figura. Los 32 clones mostrados tienen todas velocidades de disociación mejorada. Las curvas de velocidades de disociación quedaron en dos familias y se seleccionaron clones en consecuencia (Figura 20) con E/F (azul a la izquierda) que representan una curva de velocidad de disociación clásica y G/H (rojo a la izquierda) un tipo bifásico irregular. Los valores de K_D son 76 nM para el clon 6 y 200 nM para el clon 7.

[0241] Se obtuvo determinación de las características bioquímicas y/o biofísicas de los sitios de unión a antígeno por SEC-MALLS. Los que tenían características de solución monomérica se seleccionaron frente a los que tenían propensión a agregarse. Se descubrieron en general clones con una solubilidad en PBS > 10 mg/ml.

[0242] Se usó exploración de NNS, particularmente de parte de la región CDR3 variable, pero extendiéndose a los restos críticos en F4 tales como los restos 103-105 para refinar la unión a antígeno.

25 Resultados:

[0243] El árbol familiar de maduración de afinidad de anticuerpos se muestra en la Figura 21. Se muestra un ejemplo de la unión mejorada por Biacore en forma del clon PEP2-2-3Fc en la Figura 22. El canal se recubrió con 10 UR de péptido E200 y después se cargó con PEP2-2-3 100 pM, 250 pM, 500 pM y 1 nM en orden ascendente en la figura. El ajuste de curva revela una K_D de 130 pM. El valor correspondiente para el dAb no formateado PEP2-2-3 frente a E200 es de 7 nM, lo que muestra un aumento más moderado en la unión para los dAb de alta afinidad cuando se formatean como dAb-Fc en comparación con el aumento de los dAb parentales tales como PEP2-2 que aumentaron de 1 μM a 300 pM.

35 **[0244]** Los valores correspondientes para la K_D cuando se miden frente a ECD2 en forma de solución o como una construcción de ECD-Fc mostraron una unión significativamente menor frente al epítipo conformacional, produciendo PEP2-2-3 Fc un valor de 1,5 nM, PEP2-2-1 560 pM y PEP2-472-1 584 pM como ejemplos.

[0245] Se muestran ejemplos de K_D de PEP2-Fc derivado de Biacore usando E200 en la siguiente Tabla.

40

PEP-Fc	K_D (pM)
2-2	300
2-2-2	100
2-2-3	130
2-2-1-1	90
2-42	5.500
2-42-1	120
2-47	7500
2-47-1	110
2-247-1 (cruce de CDR 2-2/2-47-1)	190
2-247-2 (cruce de CDR 2-2-1/2-47-1)	450
2-4721 (cruce de CDR 2-47-1/2-2-2)	90

[0246] El efecto de la exploración de NNS en la posición 103 en PEP2-2-1 se muestra en la Figura 23. La traza 1 es solamente tampón y la Traza 5 es un ejemplo típico de unión mejorada obtenida intercambiando un resto de Arg por el Trp.

45

[0247] La unión de clones candidatos seleccionados con células HEK293 que expresaban control de simulación (sin unión), pDisplay-ECD1 (unión moderada), pDisplay-ECD2 (mayor unión) y control de pDisplay (sin unión) se ve en la Figura 24.

[0248] Los clones candidatos se unen específicamente y de forma competitiva con el antígeno diana y pueden retirarse por competición con la adición del ECD2 soluble. Como ejemplo la Figura 25 muestra que PEP2-2-1 Fc a 50 nM se retira por competición con ECD2 soluble 1 μ M. Se recubre una microplaca Biacore SA con péptido de biotina E200. Los datos mostrados son de un canal recubierto con 20 UR con un caudal de 20 μ l/min en tampón de HBS-EP. El Fc HEL 4 ni se une ni se ve afectado por la adición del ECD2. Se consiguen resultados similares en la retirada por competición del Fc PEP2-2-1 con E200 a 5 μ M o la construcción de Fc ECD2 a 1 μ M.

[0249] Se muestra la citometría de flujo de unión de varios agentes de unión a antígeno dAb-Fc candidatos con células cancerosas vivas en los siguientes ejemplos. Estos incluyen: líneas celulares PC3 de próstata (Figura 26), MDA-MB 231 de mama (Figura 27), SKOV-3 de ovario (Figura 28), 786-O renal (Figura 29), G361 de melanoma (Figura 30) y NCI-H596 de pulmón (Figura 31).

[0250] Se examinó la ausencia de reacción cruzada con receptores P2X₇ funcionales en linfocitos y monocitos con citometría de flujo. Se muestra un ejemplo en la Figura 32 en la que los dos clones de Fc dAb PEP2-2-1 y PEP2-2-3 Fc no mostraron unión por encima del fondo de control de HEL4 Fc. Por el contrario, la unión con células cancerosas vivas tales como LNCap de próstata está clara (verde en la Figura 33, no mostrando el control de HEL4 en rojo ninguna unión por encima del control secundario y el positivo para HLA mostrado en azul).

[0251] Se controló la destrucción celular directa o inhibición del crecimiento, como se mide usando el Ensayo de Cell Titer Blue, con los clones candidatos PEP2-2-1 y PEP2-2-3 usando una diversidad de líneas celulares. Durante un ciclo de crecimiento de 3 o 5 días, las células de control crecieron mientras que el crecimiento neto en presencia del Fc 2-2-1 o Fc 2-2-3 se midió como una proporción del crecimiento en presencia del control de HEL4 Fc. La Figura 34 muestra crecimiento celular de PC3 inhibido progresivamente a medida que 2-2-1 o 2-2-3 se valoran hasta 40 μ g/ml durante 5 días mientras que las células de control no se ven afectadas por HEL4 Fc. La línea celular de cáncer colorrectal COLO205 muestra más sensibilidad con Fc tanto 2-2-1 como 2-2-3 que provocan inhibición de crecimiento significativa a los 3 días mientras que a los 5 días, no permanece ninguna célula incluso a 2,5 μ g/ml (Figura 35). De forma similar la línea celular de melanoma A375 muestra destrucción celular significativa a los 3 días mientras que a los 5 días no permanece ninguna célula (Figura 36).

[0252] Conclusión: Se identificaron, secuenciaron y caracterizaron biofísicamente sitios de unión a antígeno que tenían alta afinidad por el receptor P2X₇ no funcional en células vivas. Se examinaron sus efectos en la función celular.

Ejemplo 6 – Experimentos futuros

[0253] Objetivo: Potenciar adicionalmente la afinidad de los dAb candidatos mediante exploración de NNS dirigida adicional de restos implicados en la unión directa del antígeno y en restos que permiten que las CDR se empaqueten de forma más eficaz. Mejorar la estabilidad y solubilidad de sitios de unión a antígeno modificando el Fc. Mejorar la eficacia de destrucción celular.

[0254] Materiales y métodos: Se realizarán técnicas convencionales para potenciar la afinidad de unión tales como ciclos adicionales de exploración de NNS. Los clones producidos se explorarán por Biacore para encontrar los que tengan velocidades de disociación mejoradas y ELISA de fagos frente a ECD2 (47-306). Se realizará exploración inicial usando el Ensayo de CTB para identificar clones con la combinación más eficaz de afinidad de unión y capacidad de destrucción.

[0255] Resultados esperados: Se espera que se aislen clones con constantes de unión al menos un log menores que también destruyan células cancerosas más eficazmente que los candidatos existentes. Como ejemplo, dominios de dAb candidatos nuevos de alta afinidad (sin formato Fc) tales como PEP2-2-12 en la Figura 36 muestran una KD frente al dominio ECD2 de 945 pM mientras que el parental PEP2-2-1 muestra una KD de 560 pM como una construcción de Fc con unión cooperativa asociada. La construcción de candidatos con diferentes dominios Fc permitirá examinar la influencia del Fc en las propiedades de solubilidad y destrucción celular. Son ejemplos la adición de Fc IgG2a de tipo ratón en lugar de Fc IgG humano de tipo 1.

[0256] El marcaje de especies de un único dominio de alta afinidad permitiría usarlas para fines de exploración sistémica. Se muestra un ejemplo en la Figura 38 en el que se ha unido un marcador Alexa488 al dominio dAb PEP2-2-12 y la determinación de afinidad de Biacore similar sugiere una K_D de 174 pM. Se muestra un candidato de alta afinidad con diferente parental en la Figura 39 en la que el dominio PEP2-472-12Alexa488 se mide con una KD de 156 pM.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0257]

<110> Biosceptre International Limited

<120> Anticuerpos anti-receptor P2X₇ y fragmentos de los mismos

<130> M81766106:TPG

5 <150> 2009903928

<151> 20-08-2009

<160> 198

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 595

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<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

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 Arg 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
 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 Ser 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
 580 585 590

Ser Pro Tyr
 595

<210> 2
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp Lys Leu Tyr Gln
 1 5 10 15

Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys Val Lys Gly Ile
 20 25 30

Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val Lys Lys Leu Val
 35 40 45

His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro Leu Gln Gly Asn
 50 55 60

Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gly Gln Glu Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu Cys Ser Ser Asp
 85 90 95

Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser Lys Gly Ile Gln
100 105 110

Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys Thr Cys Glu Val
115 120 125

Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala Pro Arg Pro Ala
130 135 140

Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile Lys Asn Asn Ile
145 150 155 160

Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu Pro Gly Leu
165 170 175

Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro Gln Cys Pro Ile
180 185 190

Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp Asn Phe Ser Asp
195 200 205

Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile Tyr Trp Asp Cys
210 215 220

Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys Tyr Ser Phe Arg
225 230 235 240

Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn
245 250 255

Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys
260 265 270

<210> 3
<211> 296
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp Lys Leu Tyr Gln
1 5 10 15

Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys Val Lys Gly Ile
20 25 30

Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val Lys Lys Leu Val
35 40 45

His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro Leu Gln Gly Asn
50 55 60

Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gly Gln Glu Gln
65 70 75 80

Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu Cys Ser Ser Asp
85 90 95

Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser Lys Gly Ile Gln
100 105 110

Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys Thr Cys Glu Val
115 120 125

Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala Pro Arg Pro Ala
130 135 140

Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile Lys Asn Asn Ile
145 150 155 160

Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu Pro Gly Leu
165 170 175

Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro Gln Cys Pro Ile
180 185 190

Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp Asn Phe Ser Asp
195 200 205

Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile Tyr Trp Asp Cys
210 215 220

Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys Tyr Ser Phe Arg
225 230 235 240

Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn
245 250 255

Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr
260 265 270

Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu Val Phe Gly Thr
275 280 285

Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln
290 295

<210> 4
<211> 6
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 4

Asp Asn Glu Pro Met Gly
1 5

5 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido

<400> 5

Ser Ile Ala Asp Ser Gly Asn His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 **Gly**

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido

25 <400> 6

Lys Gln Arg Gly Leu Asn Arg Tyr Arg Ala Gln Phe Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido

<400> 7

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

40 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido

50 <400> 8

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 9

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 10

Ser Gly Tyr Ala Met Ala
1 5

25

30 <210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

35 <400> 11

Thr Ile Leu Ser Asp Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 12

Lys Ile Lys Thr Phe Arg Asn His Ser Val Gln Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido
<400> 13

Gly Met Tyr Asn Met Ser
1 5

15 <210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido
<400> 14

Ser Ile Asn Ala Thr Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25 Gly

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido
35 <400> 15

Lys Phe Asn Gly Phe Ser His Arg Gln Tyr Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido
<400> 16

Pro Ala Ser Asn Met Ser
1 5

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido
 <400> 17
 10
 Ser Ile Thr Ala Ser Gly Tyr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido
 20
 <400> 18
 Lys Gln Gly Gln Ile Ser Asn Phe Pro Arg Phe Asp Tyr
 1 5 10

25 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> péptido
 <400> 19

Gly Ser Tyr Ala Met Ala
1 5

35
 <210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 45 <400> 20

Thr Ile Ser Thr Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido

<400> 21

Lys Val Arg Phe Ala Thr Ser Lys Ser Ile Asn Phe Asp Tyr
 1 5 10

10 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> péptido

20 <400> 22

Gly Ala Tyr Ala Met Ser
 1 5

25 <210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> péptido

<400> 23

Thr Ile Asn Gly Ser Gly Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

35 <210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> péptido

<400> 24

45

Lys Cys Ser Ser Cys Thr Ser Leu Asn Ala Asn Phe Asp Tyr
 1 5 10

50 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

<400> 25

Asp Gly Tyr Asn Met Ser
1 5

5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 26

Ser Ile Thr Ala Asn Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 27

Lys Ala Ser Tyr Ser Arg Pro Tyr Asn Phe Gln Phe Asp Tyr
1 5 10

30

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> péptido

<400> 28

40

Thr Tyr Asp Met Ala Trp
1 5

<210> 29

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

50

<400> 29

Ser Ile Ala Ala Ala Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> péptido
 <400> 30

Lys Gln Arg Ser Ile Ser Ile Arg Pro Met Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> péptido
 <400> 31

Gln Glu Tyr Gly Met Gly
1 5

25
 30 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 35 <400> 32

Ser Ile Thr Pro Ser Gly Asp Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> péptido
 <400> 33

Lys Val Arg Ser Met Ser Tyr Ala His Phe Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

10 <400> 34

Ala Arg Tyr Pro Met Ala
 1 5

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> péptido

<400> 35

Ser Ile Asp Gly Gly Gly Leu Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

25 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> péptido

<400> 36

35

Lys Ala Ser Ala Pro Lys Tyr Phe Arg Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 37
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SSYAMA

45 <400> 37

Ser Ser Tyr Ala Met Ala
 1 5

50 <210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 38

5

Thr Ile Asp Gly Asn Gly Leu Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> péptido

15

<400> 39

Lys Leu Gln Arg Tyr Asp Arg Tyr Thr Leu Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> péptido

<400> 40

Ala Lys Tyr Pro Met Val
1 5

30

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> péptido

40

<400> 41

Ser Ile Gly Pro Gly Gly Ala Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> péptido

50

<400> 42

Lys Pro Trp Arg Val Tyr Ser Tyr Asp Arg Phe Asp Tyr
1 5 10

5

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> péptido

<400> 43

15

Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> péptido

25

<400> 44

Thr Ile Thr Ser Asp Gly Leu Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> péptido

<400> 45

Lys Val His Thr Phe Ala Asn Arg Ser Leu Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

40

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> péptido

50

<400> 46

Asp Asn Val Glu Met Ser
1 5

5 <210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido
<400> 47

Ser Ile Gly Ser Lys Gly Glu Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido
<400> 48

Gln Thr Val Asn Val Pro Glu Pro Ala Phe Ala Tyr
1 5 10

25 <210> 49
<211> 6
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido
35 <400> 49

Pro Met Lys Asp Met Gly
1 5

40 <210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido
<400> 50

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

10 <400> 51

Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 52
 15 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> péptido

<400> 52

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

25 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> péptido

<400> 53

35 **Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

<210> 54
 40 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> péptido

<400> 54

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

50 <210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido
 <400> 55
 5
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 <210> 56
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 15 <400> 56
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 20 <210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> péptido
 <400> 57
 Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10
 30 <210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 58
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 <210> 59
 <211> 17
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> péptido
 <400> 59

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 60

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 61

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

25

30 <210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

35 <400> 62

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 63

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

	<210> 64
	<211> 6
	<212> PRT
5	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> péptido
10	<400> 64
	Arg Asn His Asp Met Gly
	1 5
15	<210> 65
	<211> 17
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
20	<223> péptido
	<400> 65
	Ala Ile ser Gly ser Gly Gly ser Thr Tyr Tyr Ala Asn ser val Lys
	1 5 10 15
	Gly
25	<210> 66
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
30	<220>
	<223> péptido
	<400> 66
35	Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
	1 5 10
40	<210> 67
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> péptido
45	<400> 67
	Arg Asn His Asp Met Gly
	1 5
50	<210> 68
	<211> 17
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
55	<220>

<223> péptido

<400> 68

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 69

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 70

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 70

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

30

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> péptido

<400> 71

40

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 72

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

50

<400> 72

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido
 <400> 73

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

15 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido
 <400> 74

25 **Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

30 <210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido
 <400> 75

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido
 <400> 76

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

50 <210> 77

<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido

<400> 77

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10 Gly

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

20 <400> 78

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 79
25 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> péptido

<400> 79

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

35 <210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> péptido

<400> 80

45 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 81
<211> 11
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 81

5

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> péptido

15

<400> 82

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

20 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> péptido

25

<400> 83

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> péptido

40 <400> 84

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 85
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> péptido

50

<400> 85

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

5 <210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> péptido
<400> 86

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido
<400> 87

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 88
<211> 6
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido
35 <400> 88

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

40 <210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> péptido
<400> 89

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

50

<210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido
 <400> 90
 10
 Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 91
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido
 20
 <400> 91
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 <210> 92
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> péptido
 30
 <400> 92
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35
 <210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> péptido
 45
 <400> 93
 Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 94
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50

<220>
 <223> péptido
 <400> 94
 5
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 <210> 95
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> péptido
 15
 <400> 95
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 20 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> péptido
 <400> 96
 Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10
 30 <210> 97
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 97
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 <210> 98
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 98

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 99

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 100

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

25

30 <210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

35 <400> 101

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 102

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 103
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido
 <400> 103

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

15 <210> 104
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido
 <400> 104

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25 **Gly**

30 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido
 35 <400> 105

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 106
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido
 <400> 106

Arg Asn His Asp Met Gly
1 5

50

<210> 107
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido
 <400> 107
 10
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido
 20
 <400> 108
 Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10
 25 <210> 109
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> péptido
 <400> 109
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 35
 <210> 110
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> péptido
 <400> 110
 45
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 111
 <211> 11
 50

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> péptido
 <400> 111

 Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 112
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido
 <400> 112
 20
 Arg Asn His Asp Met Gly
 1 5
 <210> 113
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 113
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 114
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> péptido
 <400> 114
 Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10
 45
 <210> 115
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido

<400> 115

Pro Met Lys Asp Met Gly
1 5

5 <210> 116
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 116

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 Gly

<210> 117
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 117

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 118
30 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> péptido

<400> 118

Pro Met Lys Asp Met Gly
1 5

40 <210> 119
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 119

50

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido
<400> 120

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 121
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido
<400> 121

Pro Met Lys Asp Met Gly
1 5

25
30 <210> 122
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido
35 <400> 122

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido
<400> 123

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido
 <400> 124

Pro Met Lys Asp Met Gly
1 5

15 <210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido
 <400> 125

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25 **Gly**

<210> 126
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> péptido

35 <400> 126

Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 127
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido

<400> 127

Asp Asn Val Glu Met Ser
1 5

50 <210> 128

<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido

<400> 128

Ser Ile Gly Thr Lys Gly Glu Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10 Gly

<210> 129
<211> 12
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

20 <400> 129

Gln Thr Val Asn Val Pro Glu Pro Ala Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 130
25 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> péptido

<400> 130

Asp Asn Val Glu Met Ser
1 5

35 <210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> péptido

<400> 131

45 Ser Ile Gly Ser Lys Gly Glu Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 132
50 <211> 12
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 132

Gln Thr Val Asn Val Pro Glu Pro Ala Phe Ala Tyr
1 5 10

10 <210> 133

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 133

Pro Met Lys Asp Met Gly
1 5

20

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

30 <400> 134

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35 <210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> péptido

<400> 135

Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

45

<210> 136

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> péptido

<400> 136

Pro Met Lys Asp Met Gly
1 5

5 <210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 137

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

15 Gly

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 138

Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 139
30 <211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> péptido

<400> 139

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
20 25

40 <210> 140
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 140

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Ile
20 25

5 <210> 141
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 141

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
20 25

15 <210> 142
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 142

25 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
20 25

30 <210> 143
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> péptido

<400> 143

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
20 25

40 <210> 144
<211> 29
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 144

Glu Val Gln Met Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
20 25

10 <210> 145

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> péptido

<400> 145

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

20

<210> 146

<211> 14

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

30

<400> 146

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ala Ser
1 5 10

35

<210> 147

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> péptido

<400> 147

Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

45

<210> 148

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> péptido

<400> 148

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

5 <210> 149
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 149

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

15 <210> 150
<211> 31
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 150

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Met Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

30 <210> 151
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> péptido

<400> 151

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

40 <210> 152
<211> 31

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido

<400> 152

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

10 <210> 153
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> péptido

20 <400> 153

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25 <210> 154
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> péptido

<400> 154

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Leu Ser
1 5 10

35 <210> 155
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> péptido

<400> 155

Arg Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

45 <210> 156
<211> 11
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 156

Pro Ser Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> péptido

<400> 157

15

Pro Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 158
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> péptido

25

<400> 158

Arg Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30

<210> 159
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> péptido

<400> 159

Trp Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40

<210> 160
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> péptido

50

<400> 160

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 161
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 161

 Arg Phe Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 <210> 162
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> péptido

 <400> 162

 Trp Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 25 <210> 163
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> péptido

 <400> 163
 35
 Gly Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 <210> 164
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido
 45 <400> 164

 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 50 <210> 165
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> péptido

<400> 165

Arg Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> péptido

<400> 166

15

Cys Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 167
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> péptido

25

<400> 167

Arg Ser Cys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30

<210> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> péptido

<400> 168

Arg Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Leu Glu
1 5 10

40

<210> 169
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> péptido

50

<400> 169

Pro Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Leu Glu
1 5 10

<210> 170

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido

<400> 170

10 Arg Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 171
<211> 119
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

20 <400> 171

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Ile Arg Asn His
20 25 30

Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

25 <210> 172
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> péptido

<400> 172

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Val
 20 25 30
 Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Gly Ser Lys Gly Glu Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gln Thr Val Asn Val Pro Glu Pro Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 173
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 173

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Met Lys
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 174

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

10

<400> 174

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 175

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

10

<400> 175

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 176
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 176

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 177
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 177

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
20 25 30
Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Pro Gly
100 105 110
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 178
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 178

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 179
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 179

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 180
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 180

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Arg Asn His
20 25 30

Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 181
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 181

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 182
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 182

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Phe Ser Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 183

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

10

<400> 183

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Phe Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 184
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 184

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Ser Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 185
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 185

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
20 25 30

Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Phe Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 186
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 186

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Gly Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 187

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

10

<400> 187

ES 2 557 456 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Cys Gly Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 188
- <211> 119
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> péptido
- <400> 188

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Met Lys
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 189
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 189

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Met Lys
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Cys Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 190
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> péptido

<400> 190

Glu val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Met Lys
20 25 30
Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 191
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 191

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Met Lys
20 25 30
Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Pro Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 192

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 192

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr Arg Ser Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 193
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 193

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr Arg Ser Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 194
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 194

Glu Val Gln Met Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Val
 20 25 30

Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Gly Thr Lys Gly Glu Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Met Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gln Thr Val Asn Val Pro Glu Pro Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Leu Ser
115 120

<210> 195
<211> 120
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> péptido

<400> 195

Glu Val Gln Met Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Val
20 25 30
Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Gly Ser Lys Gly Glu Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gln Thr Val Asn Val Pro Glu Pro Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 196
<211> 119

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido

<400> 196

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Met Lys
20 25 30
Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr Arg Ser Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 197
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> péptido

20 <400> 197

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Met Lys
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Glu Pro Ser His Phe Asp Arg Pro Phe Asp Tyr Arg Ser Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 198

<211> 6520

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

10

<400> 198

aattcgccgc caccatggag accgacaccc tgctgctgtg ggtgctgctg ctgtgggtgc	60
ccggatccac cggcgagggtg cagctgttgg agtctggggg aggcttggtg cagcctgggg	120
ggtccctgcg tctctcctgt gcagcctccg gattcacctt tcgtaatcat gatatggggt	180
gggtccgcca gggtccaggg aagggtctag agtgggtctc agctattagt ggtagtgggtg	240
gtagcacata ctacgcaaac tccgtgaagg gccggttcac catctcccgc gacaattcca	300
agaacacgct gtatctgcaa atgaacagcc tgcgtgccga ggacaccgcg gtatattact	360
gtgcggaacc gaagcctatg gatacggagt ttgactacag gagtccggga accctggtca	420
ccgtctcgag cgctagcacc cacacctgcc cccctgccc tgcccccgag ctgctgggcg	480
gacctagcgt gttcctgttc ccccccaagc ctaaggacac cctgatgata agcaggaccc	540
ccgaagtgc ctgctgggtg gtggatgtga gccacgagga ccctgaagtg aagttcaact	600
ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagtaca	660
acagcaccta ccgctgggtg tctgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggca	720
aggagtacaa gtgcaaagtg agcaacaagg ccctgcctgc ccctatcgag aaaaccatca	780
gcaaggccaa gggccagcct agagagcccc aggtctacac cctgcctccc tccagagatg	840
agctgaccaa gaaccagggtg tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac cccagcgaca	900
tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg	960
tgctggacag cgatggcagc ttcttcctgt actccaagct gaccgtggac aagagcagat	1020
ggcagcaggg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac aatcactaca	1080
cccagaagag tctgagcctg tcccctggca agtgatagcg gccgctcgag tctagagggc	1140
ccgttttaac ccgctgatca gcctcgactg tgcccttctag ttgccagcca tctgttgttt	1200
gccccctccc cgtgccttcc ttgacctgg aagggtccac tcccactgtc ctttccta	1260
aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg	1320

tggggcagga	cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	caggcatgct	ggggatgcgg	1380
tgggctctat	ggcttctgag	gcggaagaa	ccagctgggg	ctctaggggg	tatccccacg	1440
cgccctgtag	cgccgatta	agcgcggcgg	gtgtggtggt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	1500
cacttgccag	cgccctagcg	cccgtctctt	tcgctttctt	cccttccttt	ctcgccacgt	1560
tcgccggctt	tccccgtcaa	gctctaaatc	gggggctccc	tttagggttc	cgatttagtg	1620
ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	attaggggtga	tggttcacgt	agtgggccat	1680
cgccctgata	gacggttttt	cgccctttga	cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtgga	1740
tcttggtcca	aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggg	ctattctttt	gatttataag	1800
ggattttgcc	gatttcggcc	tattgggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	1860
cgaattaatt	ctgtggaatg	tgtgtcagtt	aggggtgtgga	aagtcctccag	gctcccccagc	1920
aggcagaagt	atgcaaagca	tgcattctcaa	ttagtcagca	accaggtgtg	gaaagtcctcc	1980
aggctcccca	gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	2040
cccgcctcta	actccgcccc	tcccgcctct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	2100
ccatggctga	ctaatttttt	ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctctg	cctctgagct	2160
attccagaag	tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggg	ttttgcaaaa	agctccccggg	2220
agcttgata	tccatttttcg	gatctgatca	agagacagga	tgaggatcgt	ttcgcatgat	2280
tgaacaagat	ggattgcacg	caggttctcc	ggccgcttgg	gtggagaggc	tattcggtca	2340
tgactgggca	caacagacaa	tcggctgctc	tgatgccgcc	gtgttcgggc	tgtcagcgca	2400
ggggcgcccc	gttctttttg	tcaagaccga	cctgtccggg	gccctgaatg	aactgcagga	2460
cgaggcagcg	cggttatcgt	ggctggccac	gacgggcgtt	ccttgcgag	ctgtgctcga	2520
cgttgtcact	gaagcgggaa	gggactggct	gctattgggc	gaagtgccgg	ggcaggatct	2580
cctgtcatct	caccttgctc	ctgccgagaa	agtatccatc	atggctgatg	caatgcggcg	2640
gctgcatacg	cttgatccgg	ctacctgccc	attcgaccac	caagcgaaac	atcgcatcga	2700
gcgagcacgt	actcggatgg	aagccggctc	tgtcgatcag	gatgatctgg	acgaagagca	2760
tcaggggctc	gcgccagccg	aactgttcgc	caggctcaag	gcgcgcatgc	ccgacggcga	2820
ggatctcgtc	gtgacccatg	gcgatgcctg	cttgccgaat	atcatggtgg	aaaatggccg	2880
ctttctgga	ttcatcgact	gtggccggct	gggtgtggcg	gaccgctatc	aggacatagc	2940
gttggtacc	cgatgatattg	ctgaagagct	tggcggcgaa	tgggctgacc	gcttcctcgt	3000
gctttacggg	atcgccgctc	ccgattcgca	gcgcatcgcc	ttctatcgcc	ttcttgacga	3060
gttcttctga	gcgggactct	ggggttcgaa	atgaccgacc	aagcgacgcc	caacctgcca	3120
tcacgagatt	tcgattccac	cgccgccttc	tatgaaaggt	tgggcttcgg	aatcgttttc	3180
cgggacgccg	gctggatgat	cctccagcgc	ggggatctca	tgtggagtt	cttcgcccac	3240
cccaacttgt	ttattgcagc	ttataatggg	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	3300
acaaataaag	catttttttc	actgcattct	agttgtggtt	tgtccaaact	catcaatgta	3360

tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc atggtcatag	3420
ctgtttccctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc	3480
ataaagtgtg aagcctgggg tgccaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg	3540
tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa	3600
cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg	3660
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	3720
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag	3780
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac	3840
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga	3900
taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt	3960
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgctg cgctttctca tagctcacgc	4020
tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc	4080
cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta	4140
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat	4200
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca	4260
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct	4320
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg	4380
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag	4440
tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc	4500
tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact	4560
tggctcgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt	4620
cgttcattcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta	4680
ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta	4740
tcagcaataa accagccagc cgggaaggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc	4800
gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat	4860
agtttgcgca acgttggtg cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt	4920
atggcttcac tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg	4980
tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca	5040
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta	5100
agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg	5160
cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact	5220
ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg	5280
ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cggtcaccca actgatcttc agcatctttt	5340
actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga	5400

ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc	5460
atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa	5520
caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcga cggatcggga	5580
gatctcccga tccccatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa	5640
gccagtatct gctccctgct tgtgtgttgg aggtcgctga gtagtgcgcg agcaaaattt	5700
aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca attgcatgaa gaatctgctt aggggttaggc	5760
gttttgcgct gcttcgcgat gtacgggcca gatatacgcg ttgacattga ttattgacta	5820
gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg	5880
ttacataact tacggtaaatt ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga	5940
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat	6000
gggtggagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgcaa	6060
gtacgcccc tattgacgtc aatgacggtg aatggcccg ctaggcattat gcccagtaca	6120
tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcac gctattacca	6180
tggatgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat	6240
ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg	6300
actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac	6360
gggtgggaggt ctatataagc agagctctct ggctaactag agaaccact gcttactggc	6420
ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa	6480
gcttgggtacc gagctcggat ccactagtcc agtgtggtgg	6520

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de un único dominio para unión a un receptor P2X₇, definiéndose el anticuerpo de un único dominio por la fórmula general:

5

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

FR1, FR2, FR3 y FR4 son cada una regiones marco conservadas;

10

CDR1, CDR2 y CDR3 son cada una regiones determinantes de complementariedad;

y en las que:

CDR1 tiene una secuencia: RNHDMG;

15

CDR2 tiene una secuencia: AISGSGGSTYYANSVKG; y

CDR3 tiene una secuencia: EPKPMDEFDY.

2. Un anticuerpo de un único dominio para unión a un receptor P2X₇, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

20

FR1 tiene una secuencia: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF;

FR2 tiene una secuencia: WVRQAPGKGLEWVS;

FR3 tiene una secuencia: RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA;

FR4 tiene una secuencia: RSPGTLTVSS, PSPGTQVTSS o PSPGTLTVSS.

25

3. Un anticuerpo de un único dominio para unión a un receptor P2X₇, de acuerdo con la reivindicación 2, en el que:

FR4 tiene una secuencia de RSPGTLTVSS.

4. Un dominio variable de inmunoglobulina, Fab, diacuerpo, triacuerpo, scFv, proteína de fusión o conjugado que incluye un anticuerpo de un único dominio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

30

5. Un anticuerpo de un único dominio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o dominio variable de inmunoglobulina, Fab, diacuerpo, triacuerpo, scFv, proteína de fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que una secuencia de aminoácidos que forma una o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 es una secuencia humana.

35

6. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de un único dominio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o dominio variable de inmunoglobulina, Fab, diacuerpo, triacuerpo, scFv, proteína de fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 4.

40

7. Una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo de un único dominio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o dominio variable de inmunoglobulina, Fab, diacuerpo, triacuerpo, scFv, proteína de fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 4 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45

8. Un anticuerpo de un único dominio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o dominio variable de inmunoglobulina, Fab, diacuerpo, triacuerpo, scFv, proteína de fusión o conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para uso en el tratamiento del cáncer o de una afección inflamatoria.

Figura 1

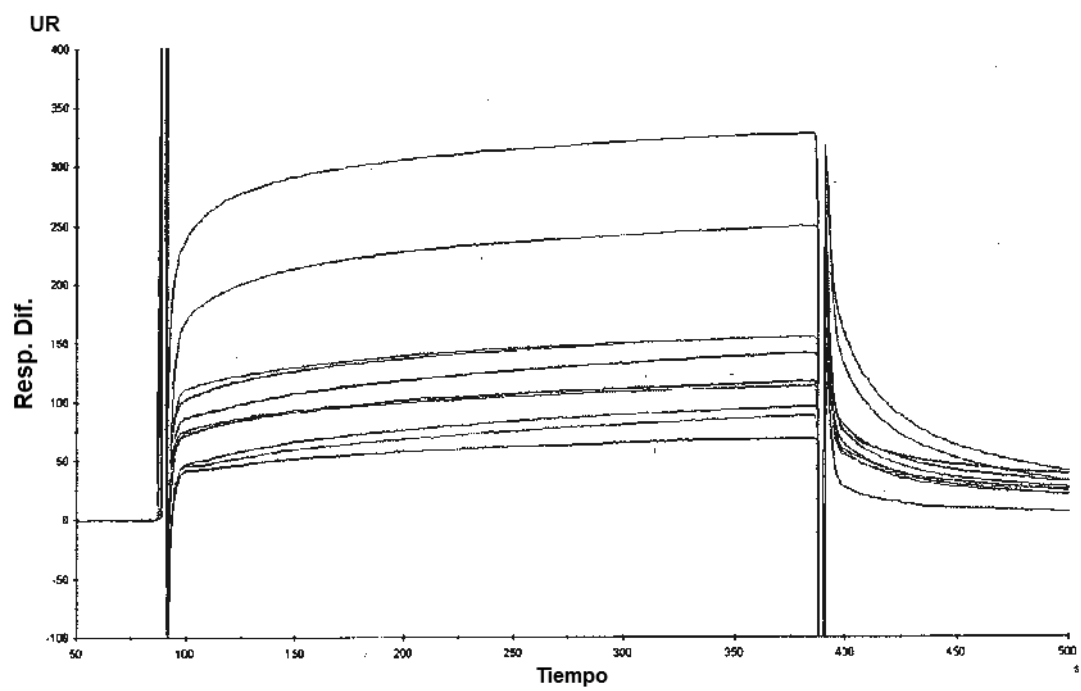


Figura 2

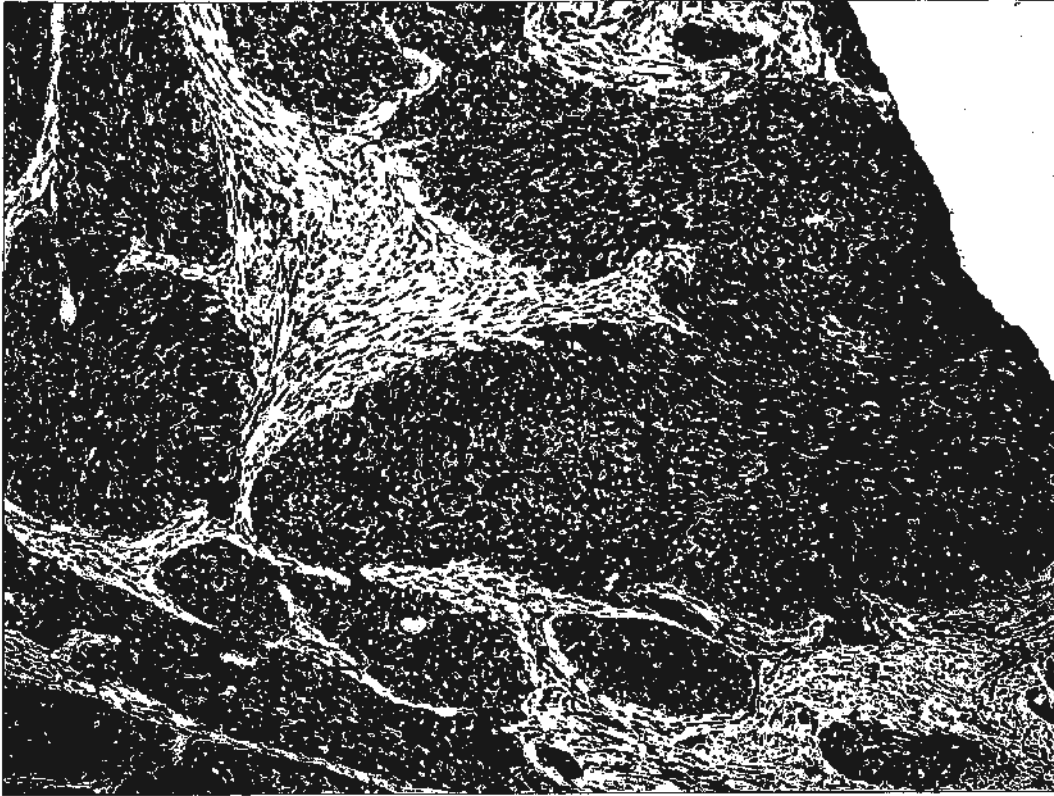


Figura 3

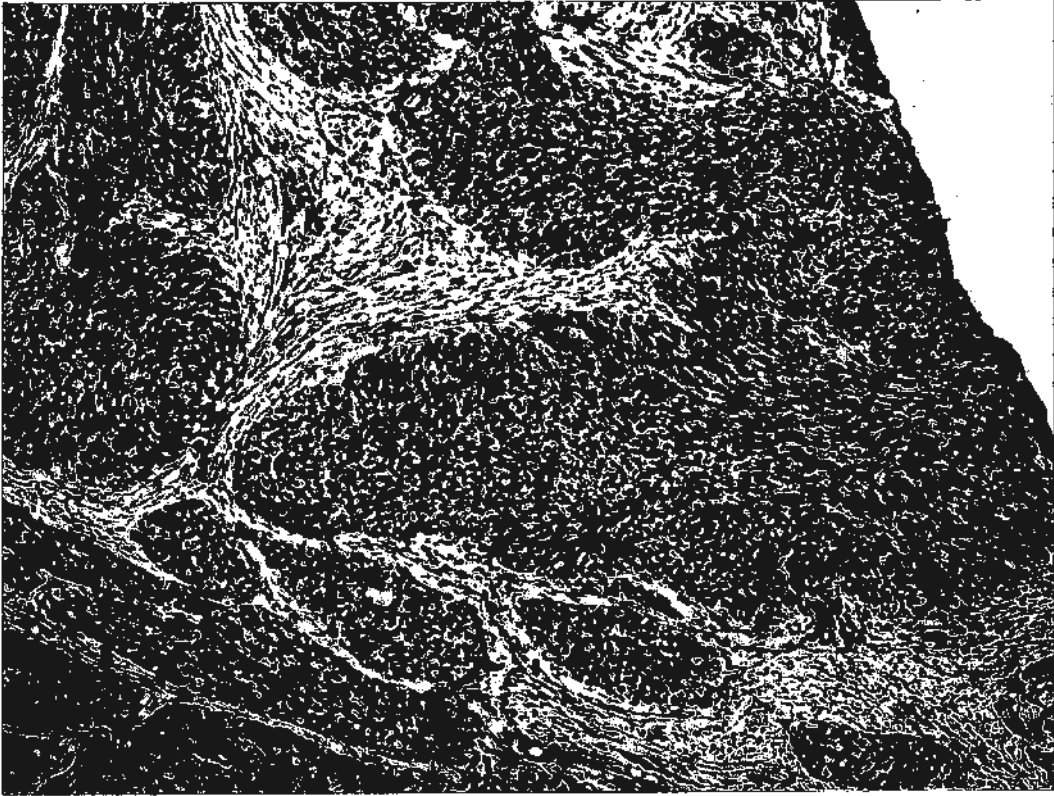


Figura 4



Figura 5

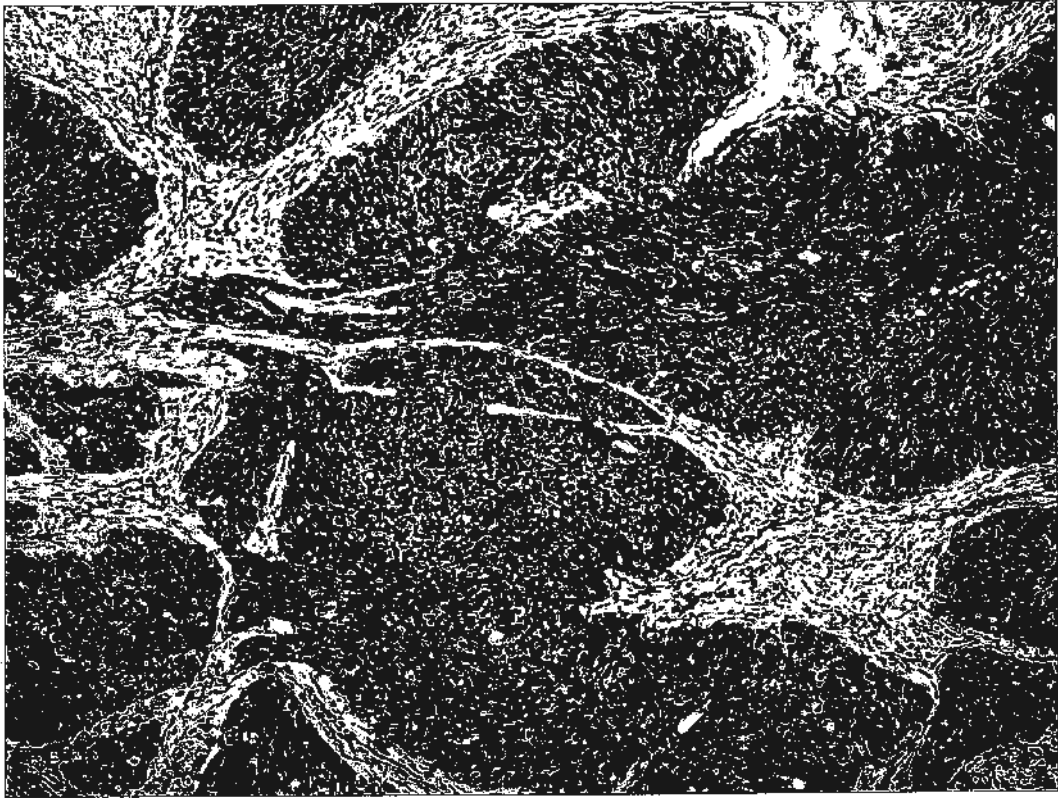


Figura 6

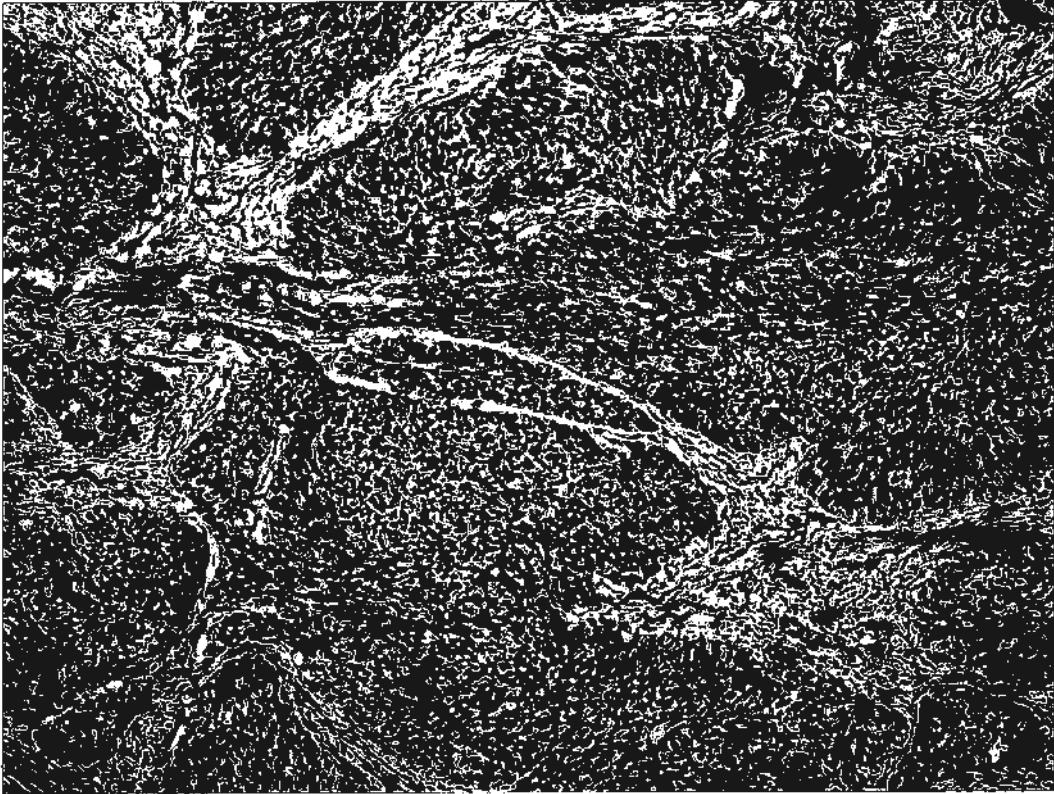


Figura 7

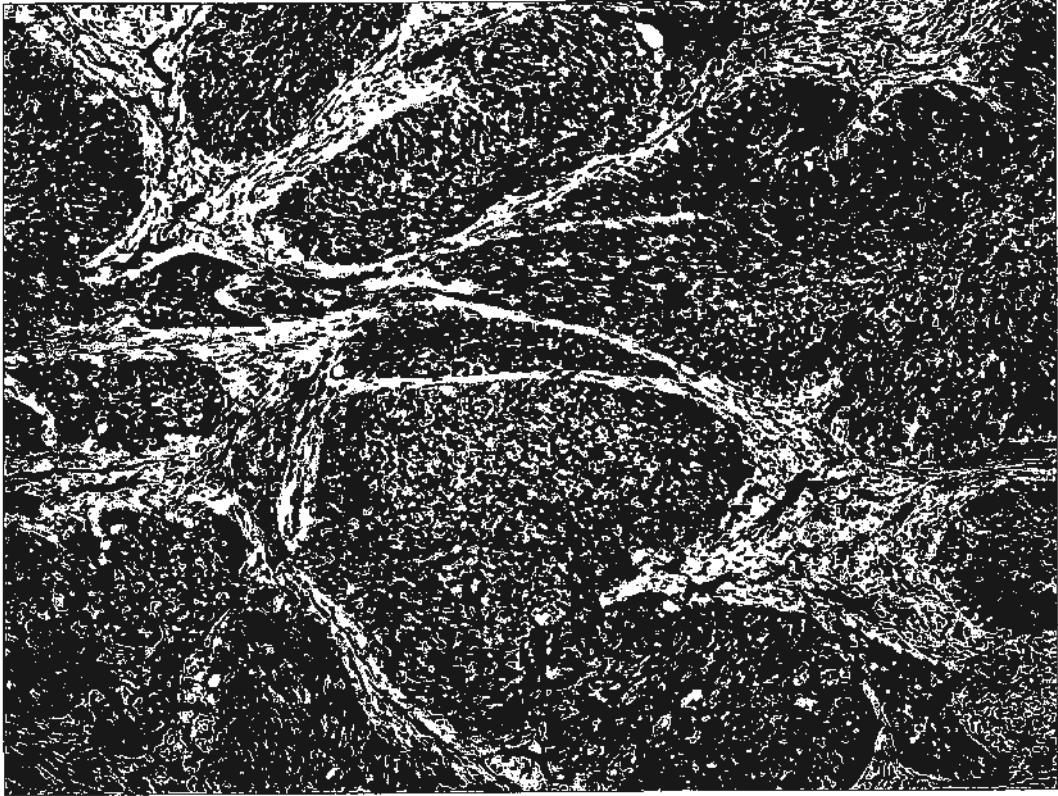


Figura 8

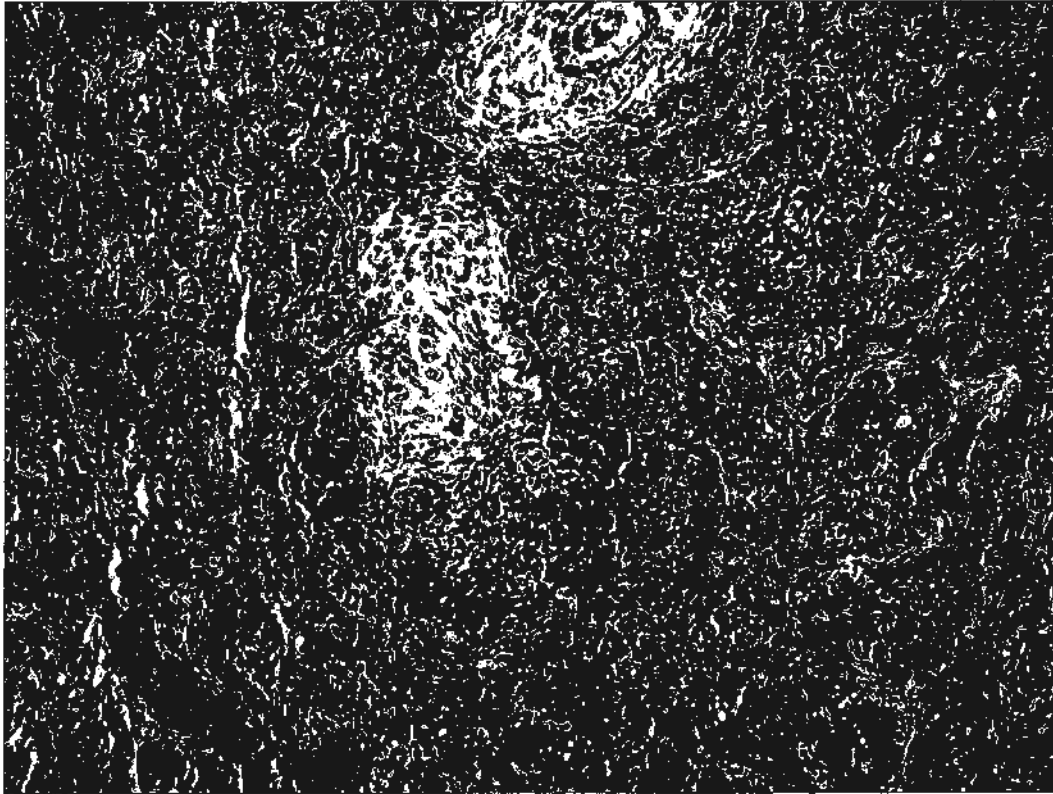


Figura 9

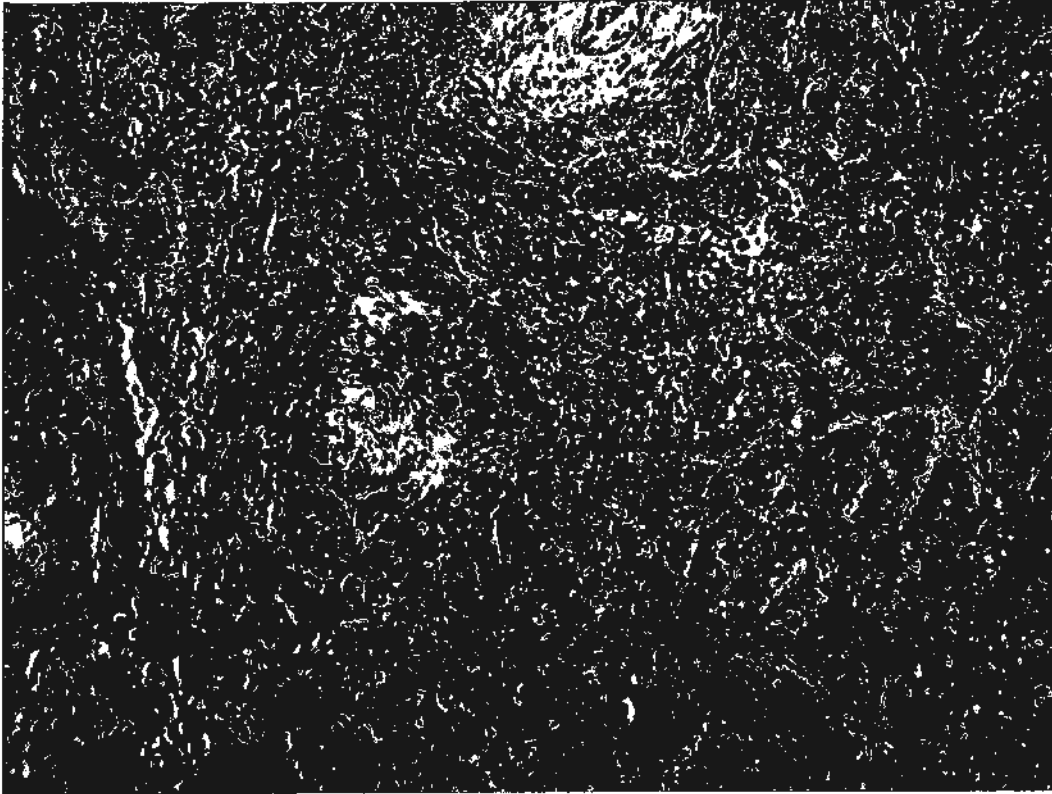


Figura 10

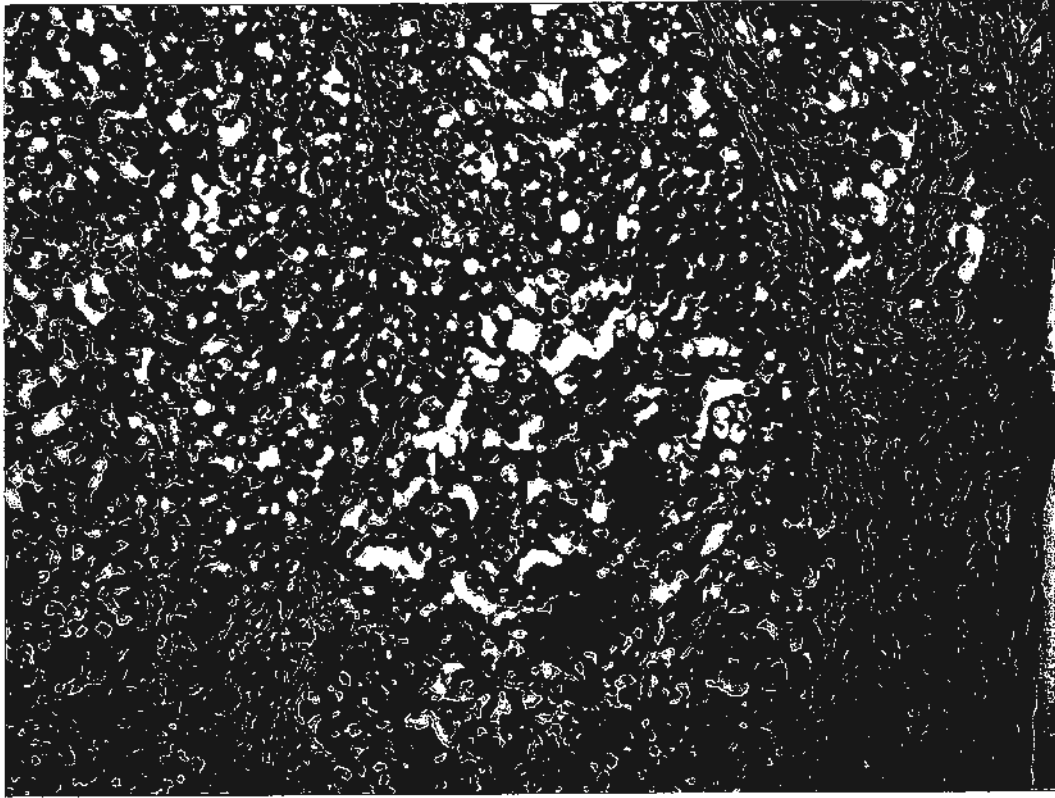


Figura 11

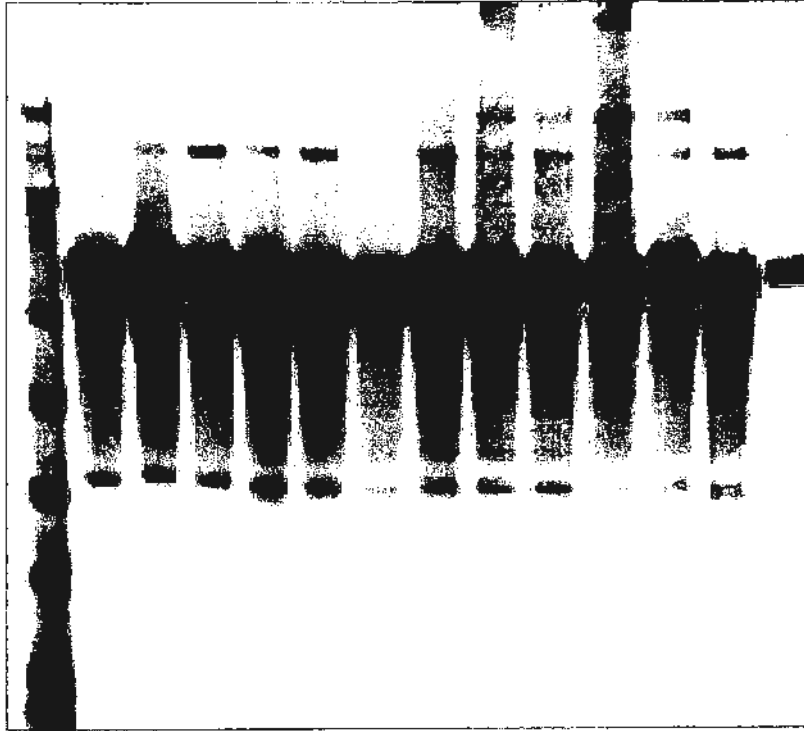


Figura 12

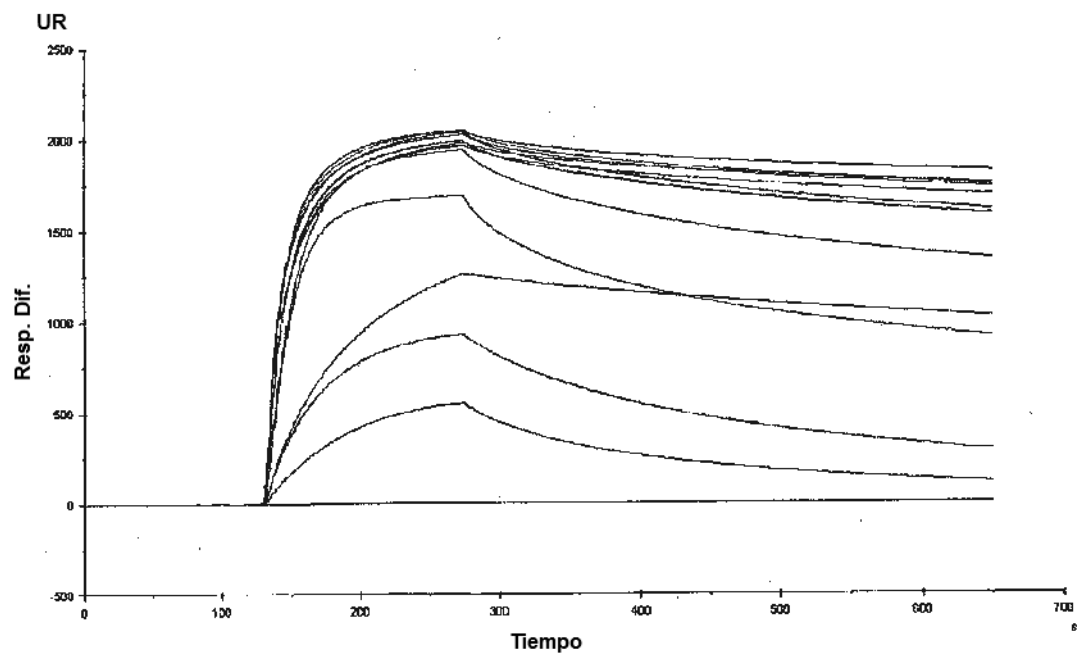


Figura 13

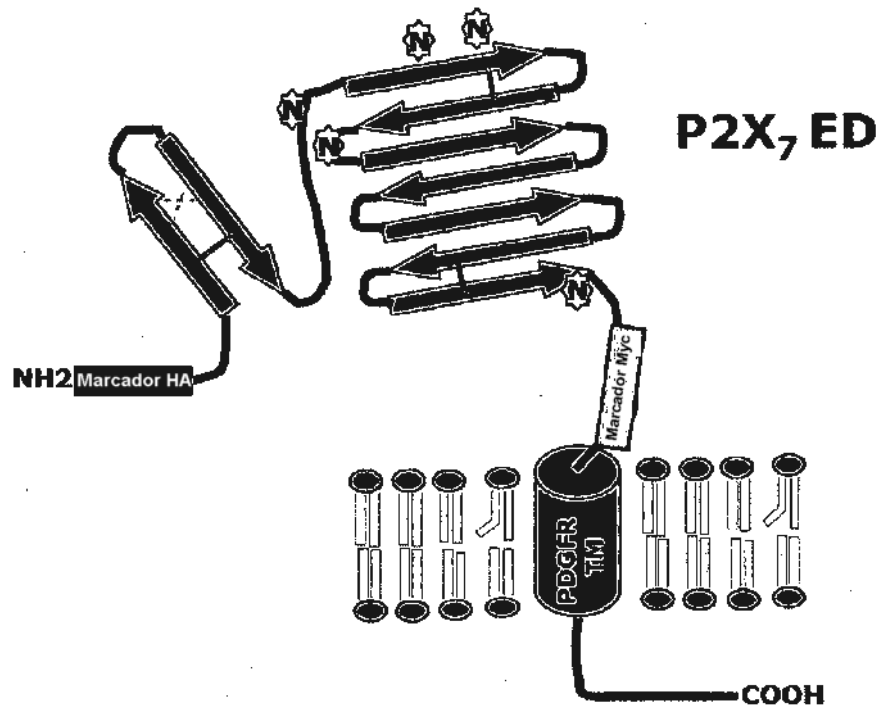


Figura 14

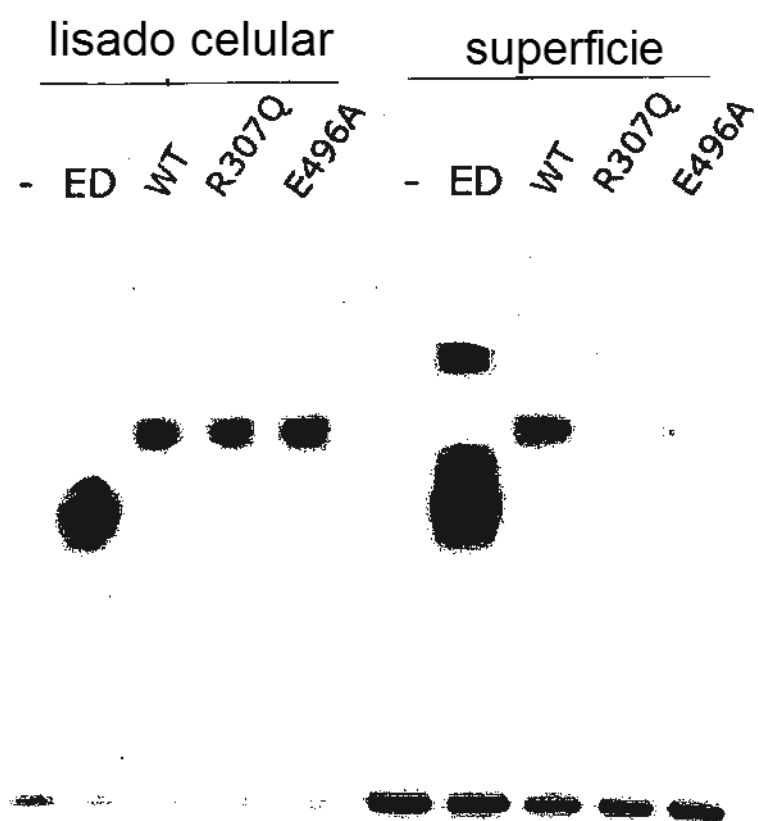


Figura 15

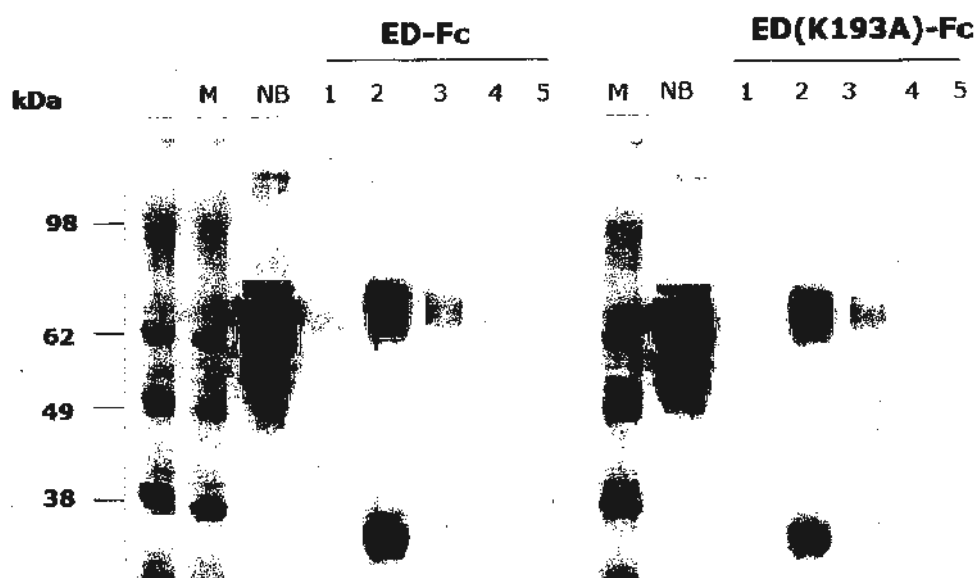


Figura 16

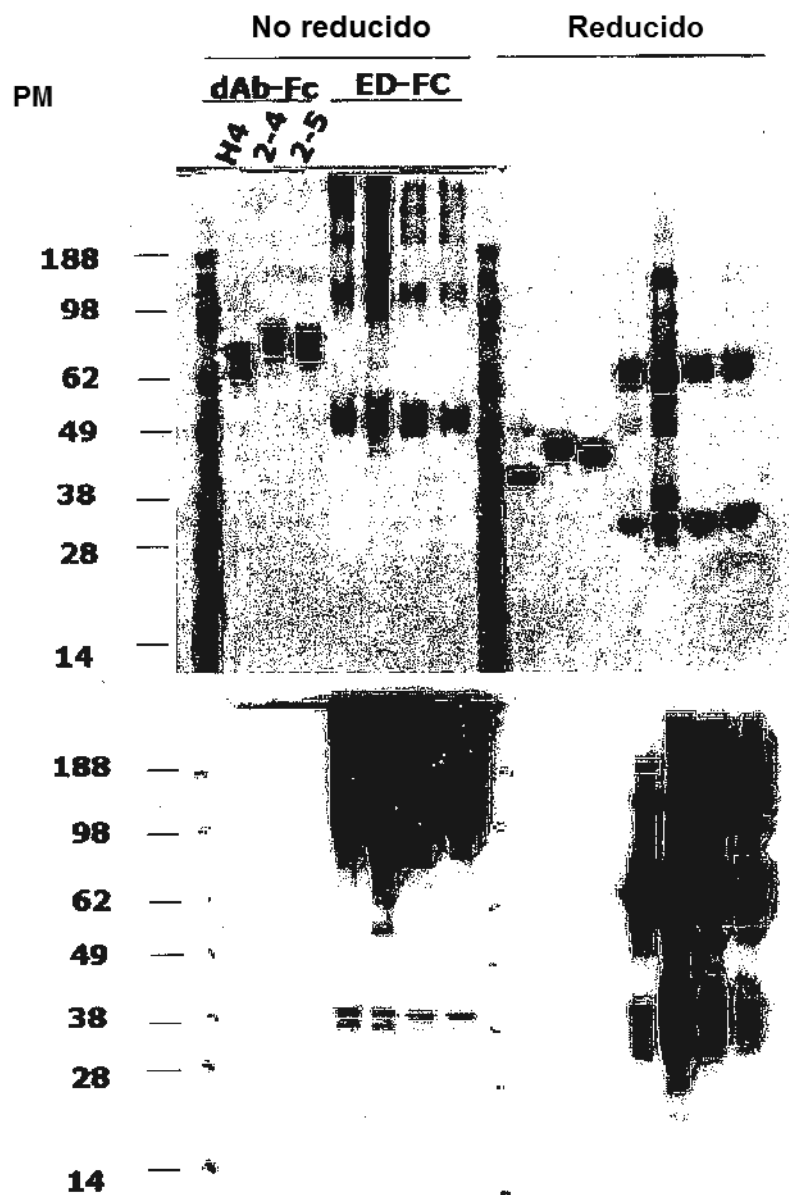


Figura 17

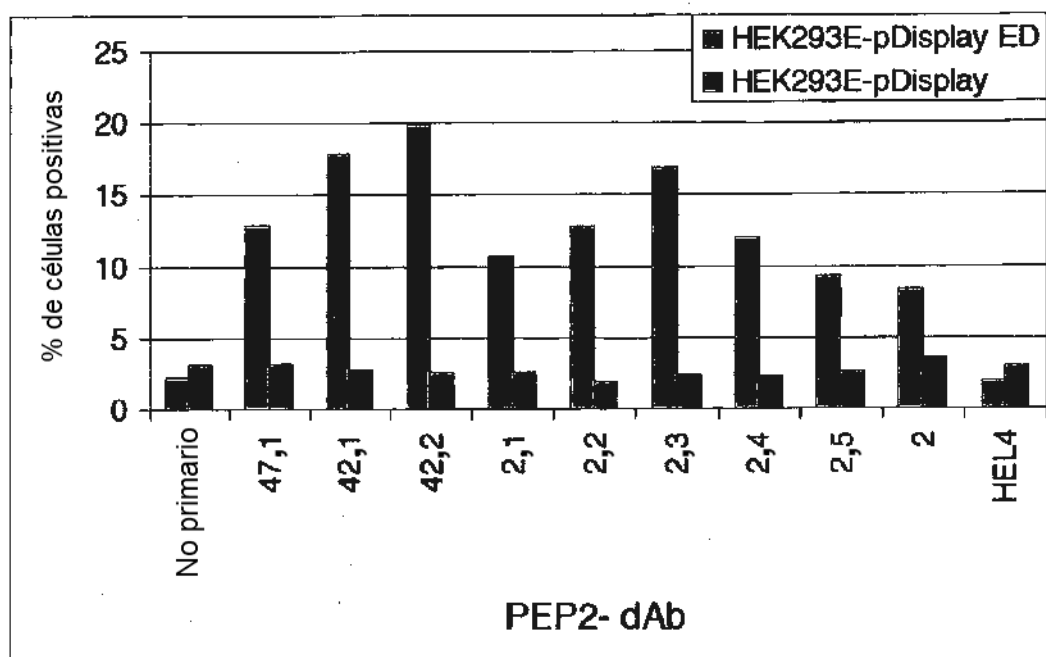


Figura 18

Unión de Ab con células HEK293E transfectadas con pDisplay-ED
Población positiva para FITC de selección 1

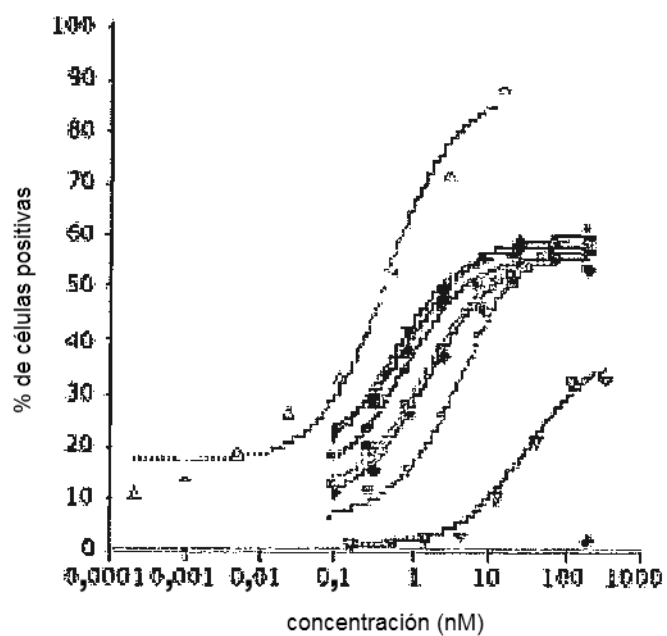


Figura 19

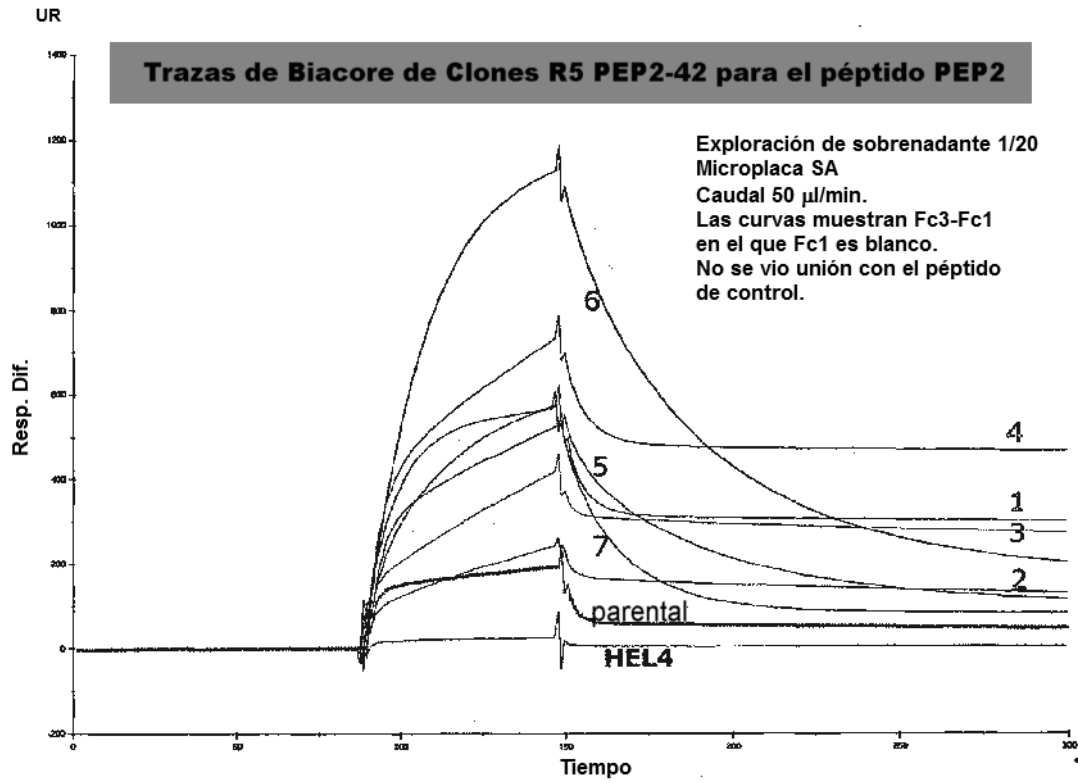


Figura 20

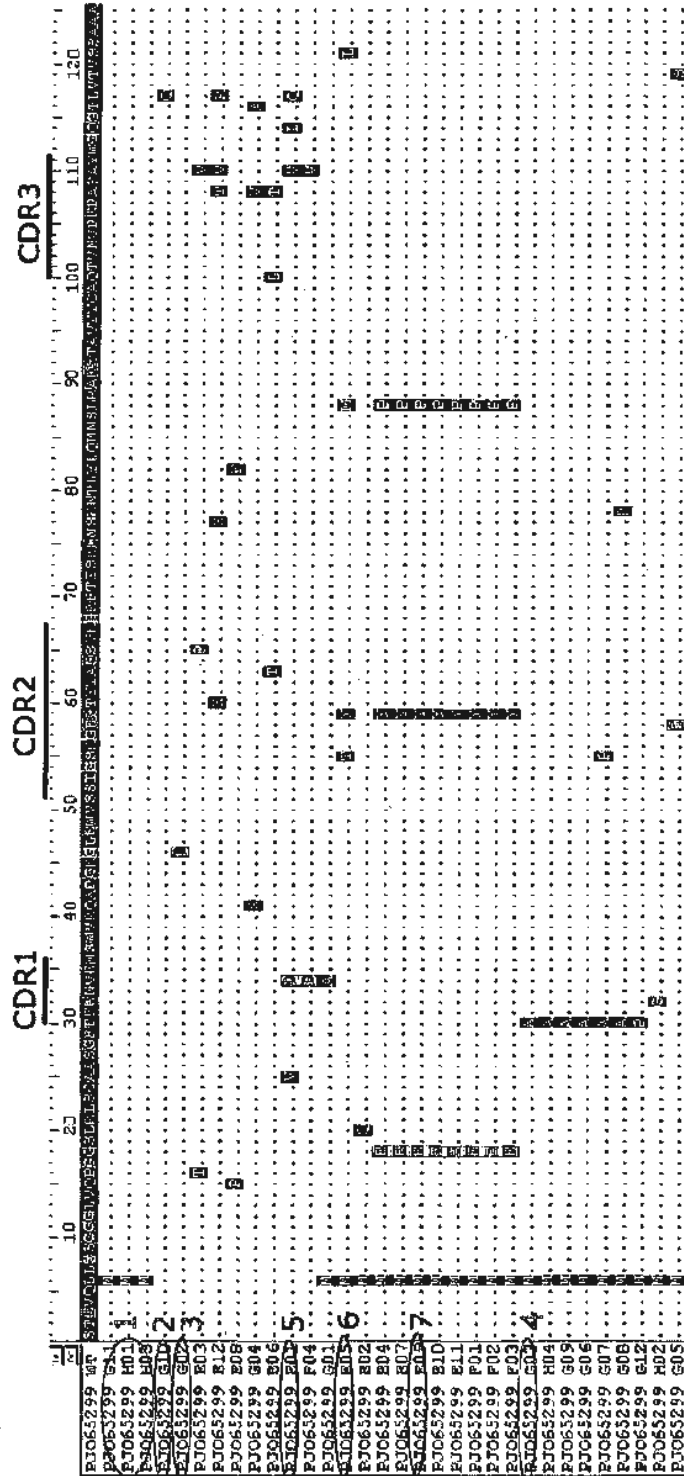


Figura 21

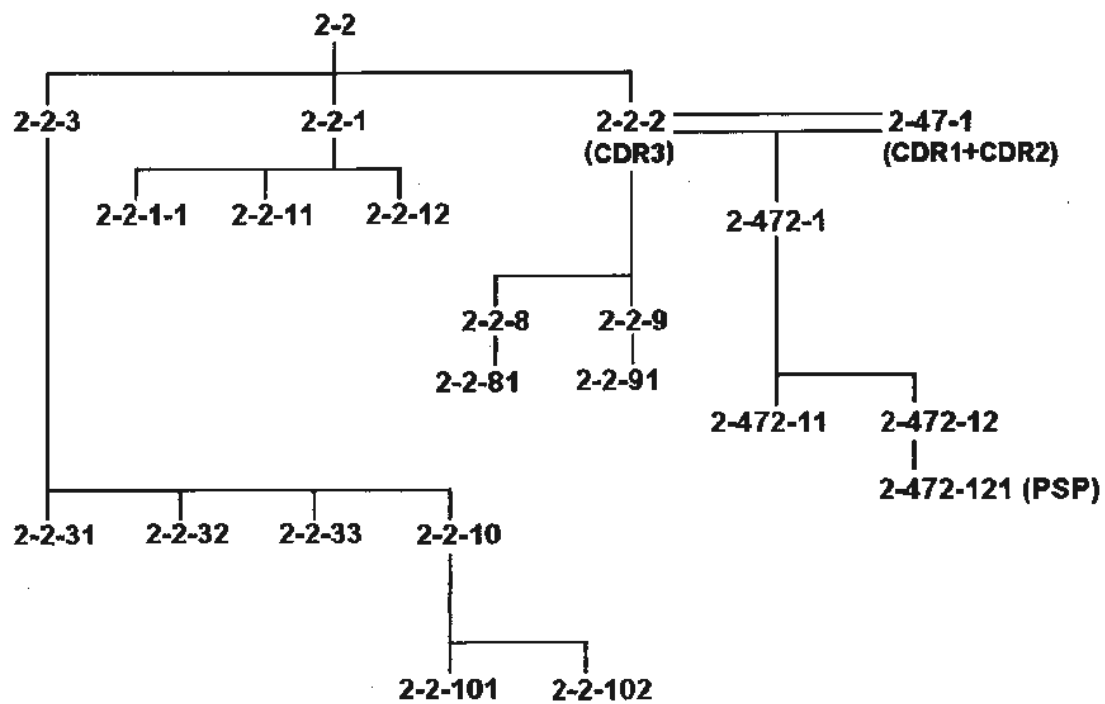


Figura 22

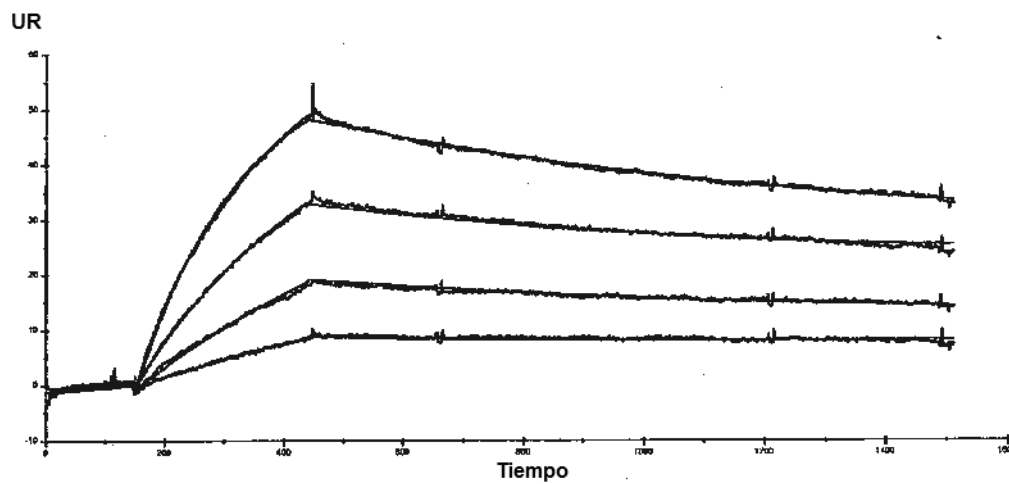


Figura 23

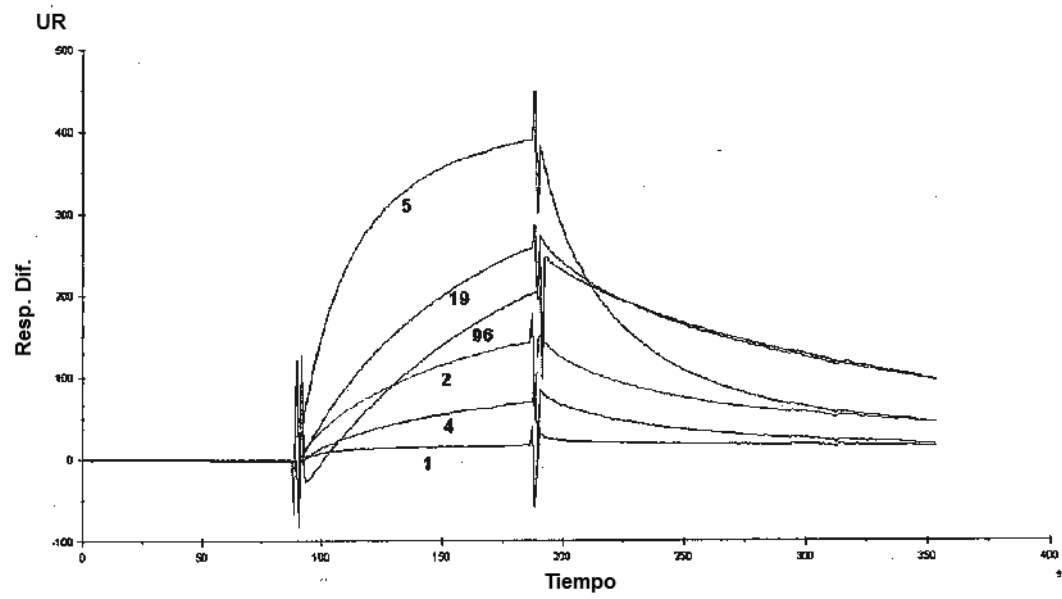


Figura 24

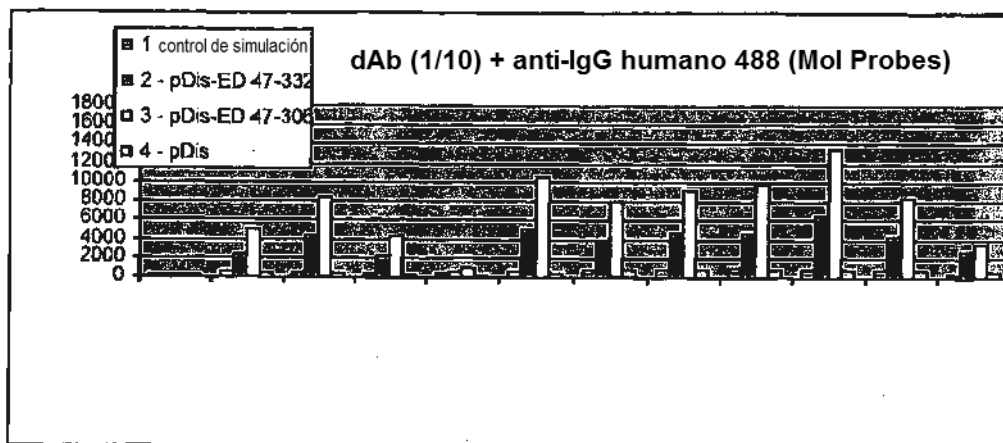


Figura 25

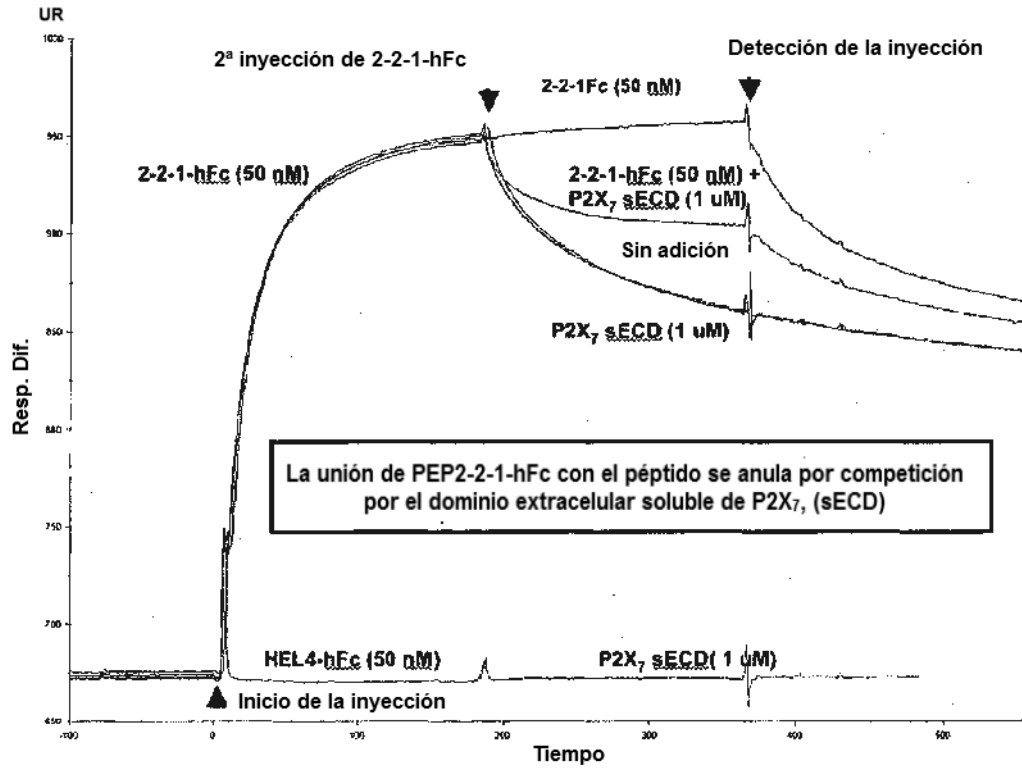


Figura 26

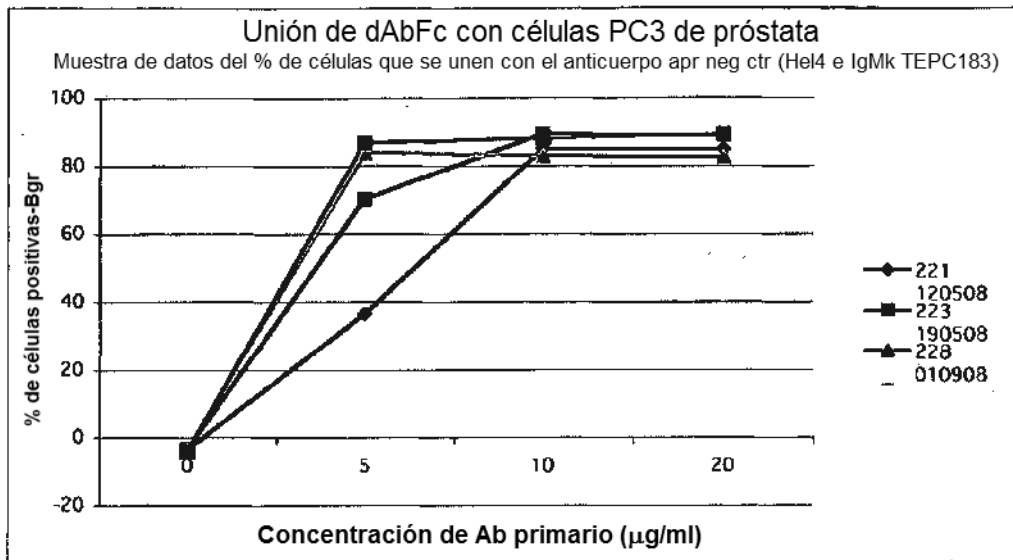


Figura 27

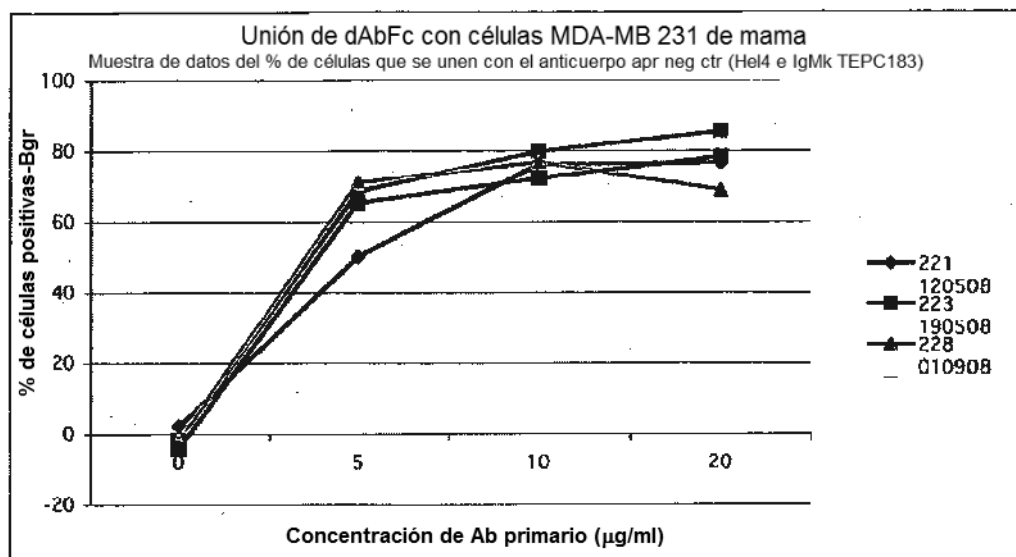


Figura 28

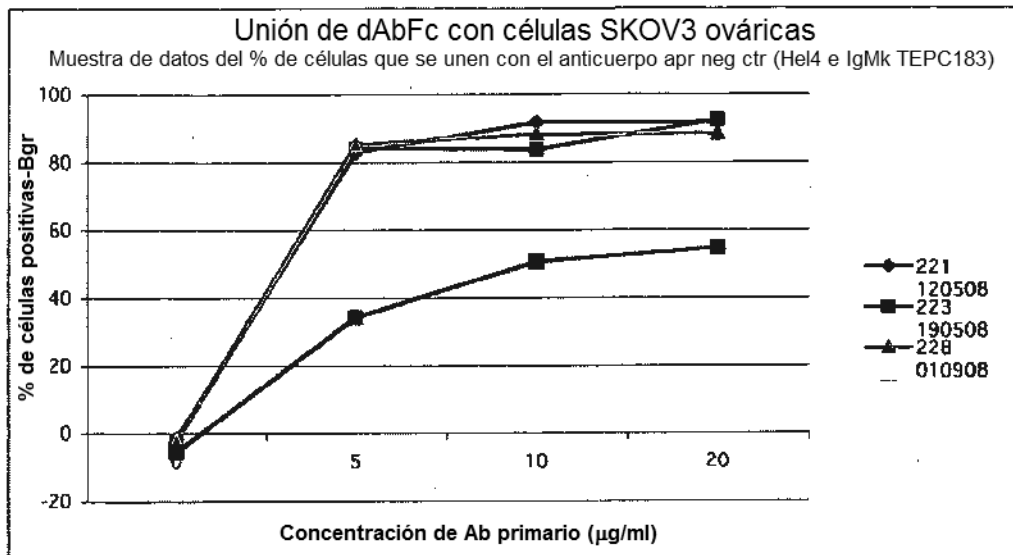


Figura 29

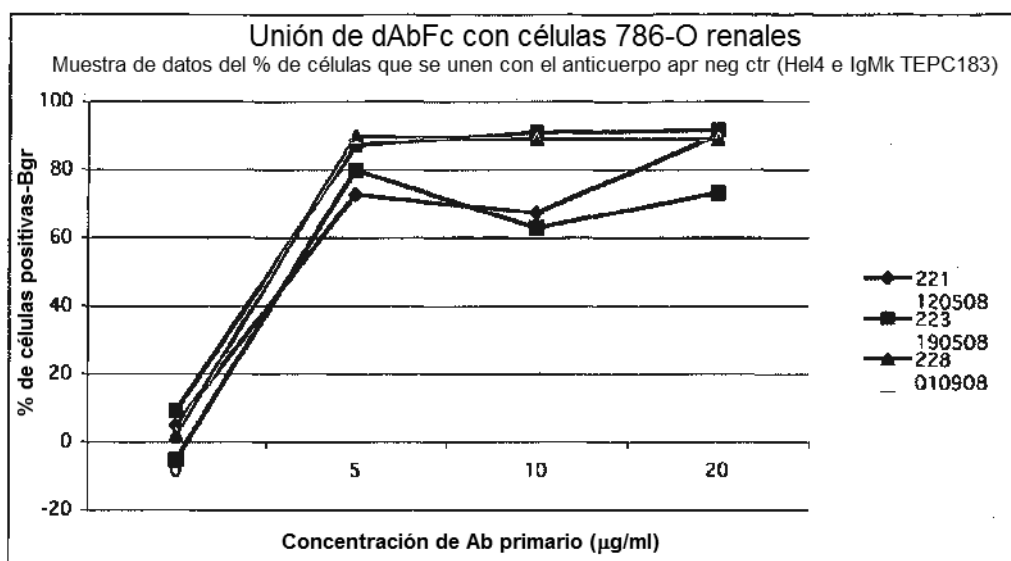


Figura 30

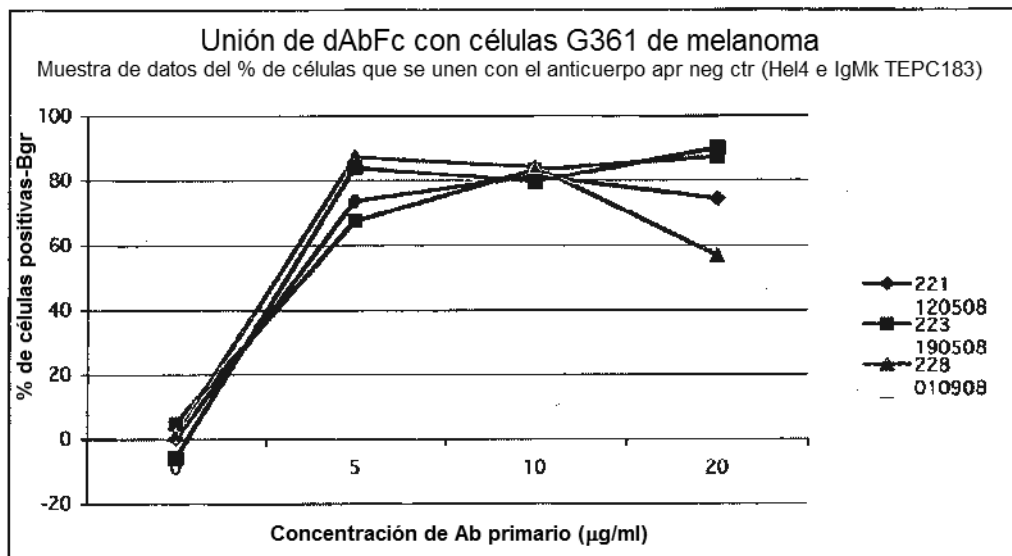


Figura 31

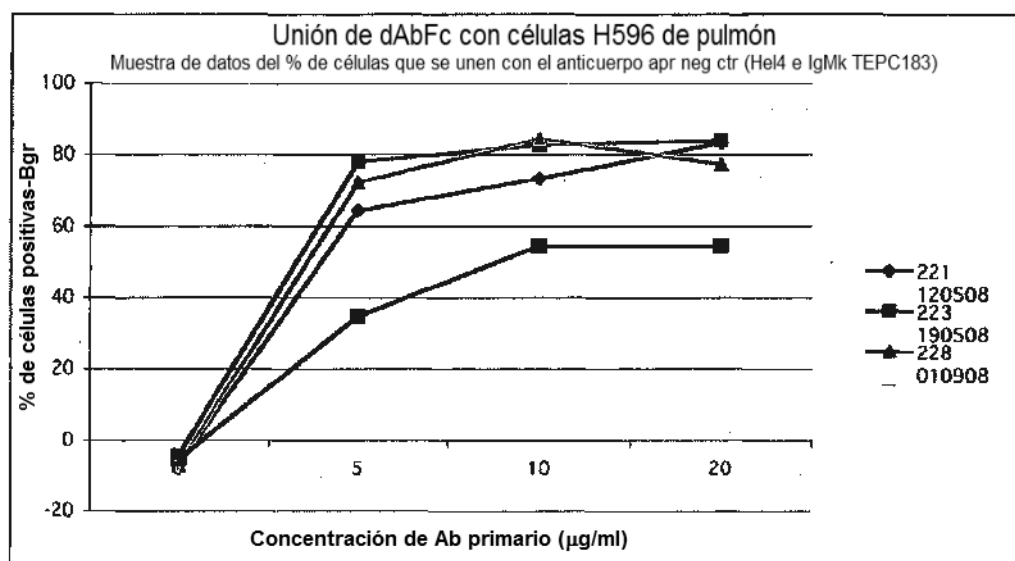


Figura 32

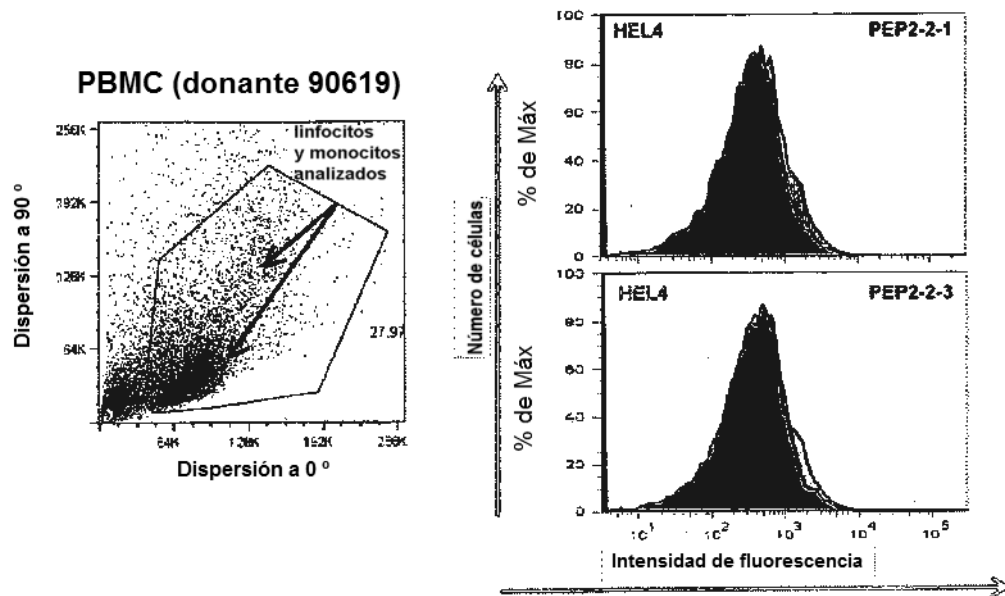


Figura 33

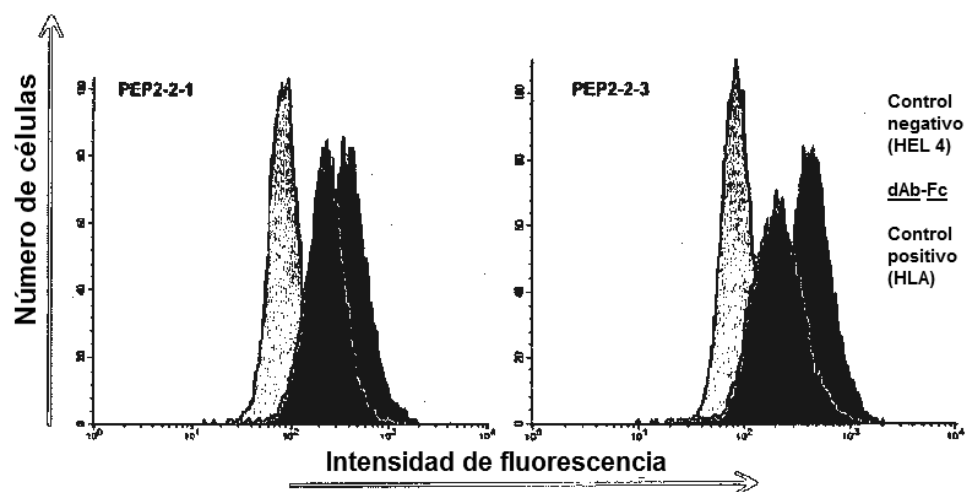


Figura 34

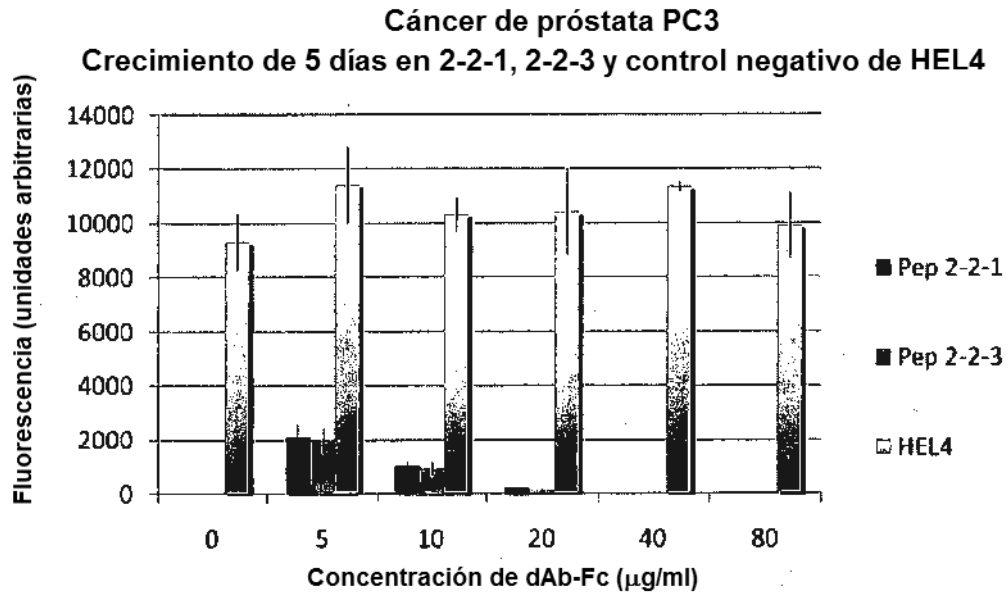


Figura 35

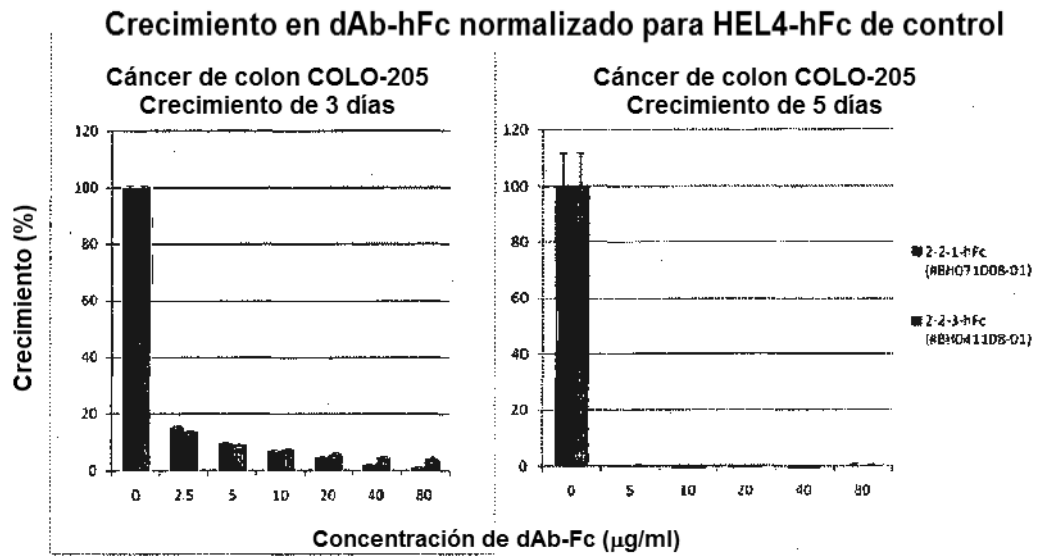


Figura 36

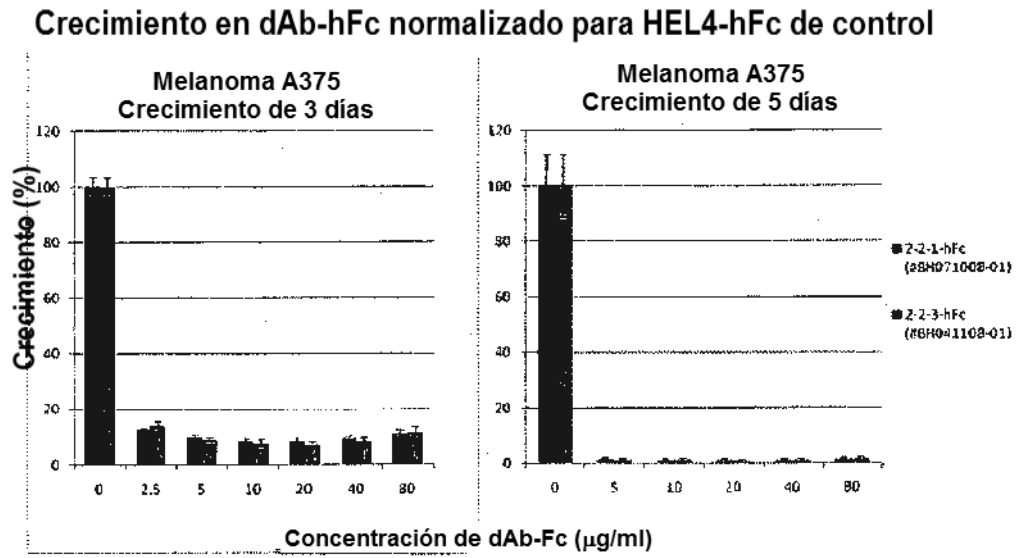


Figura 37

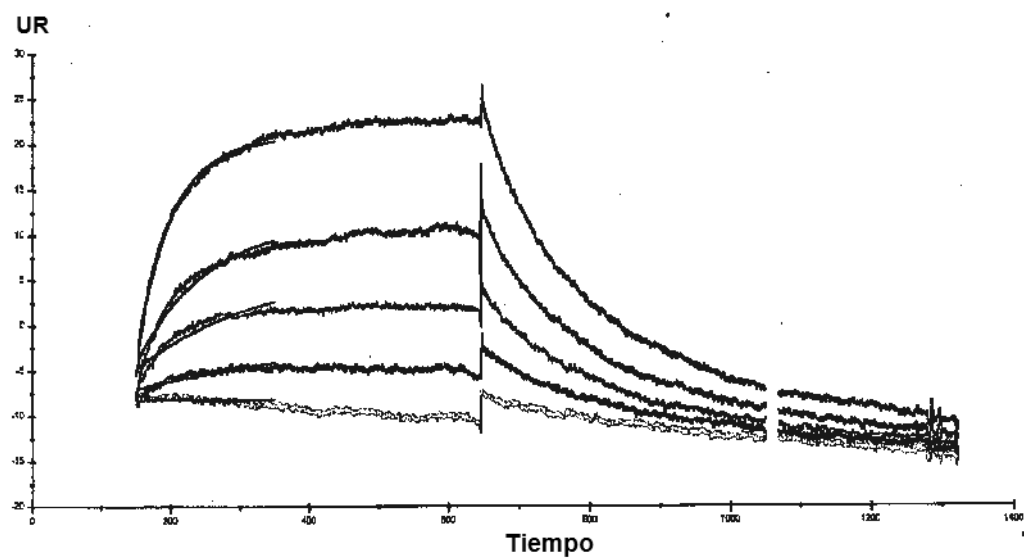


Figura 38

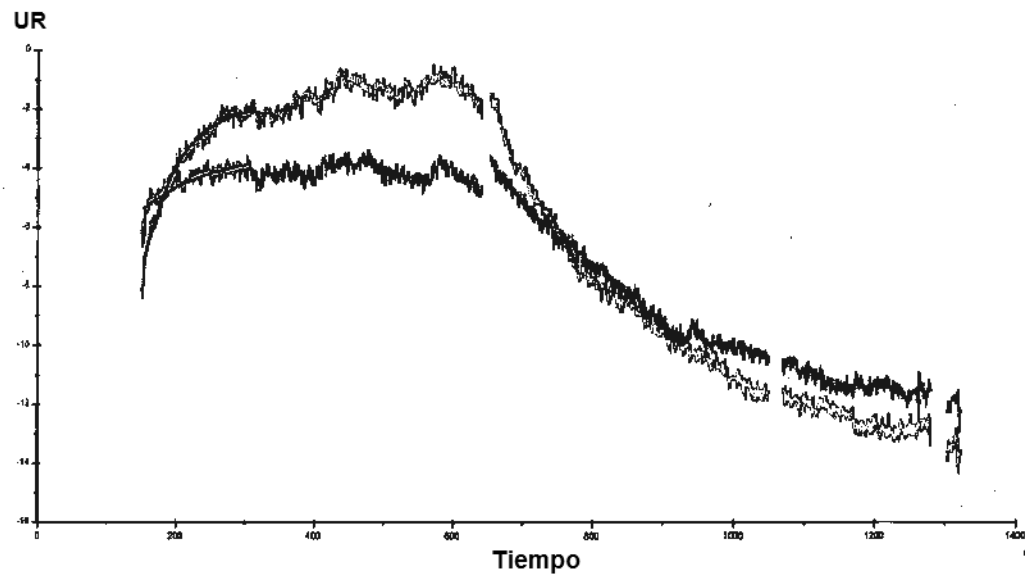


Figura 39

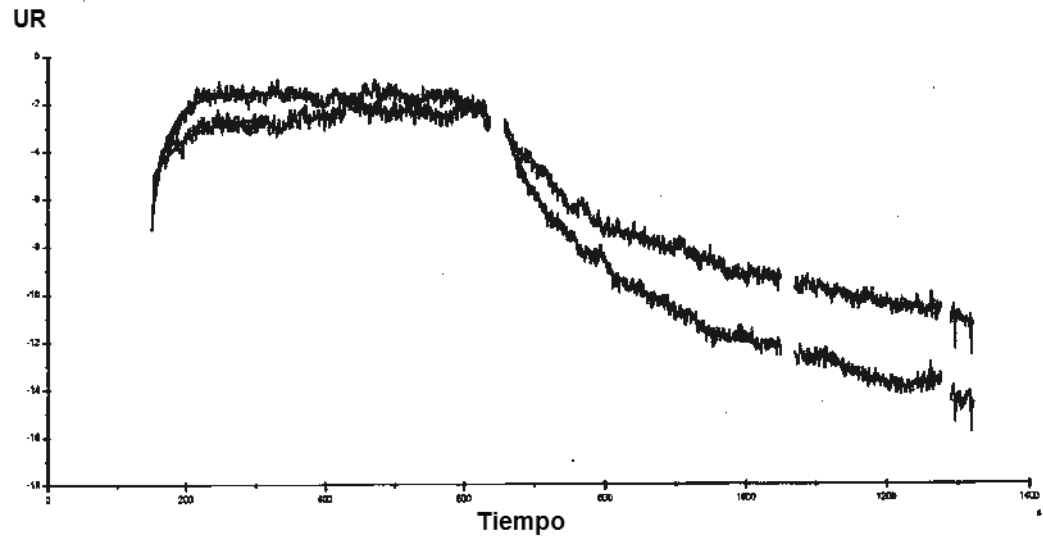


Figura 40

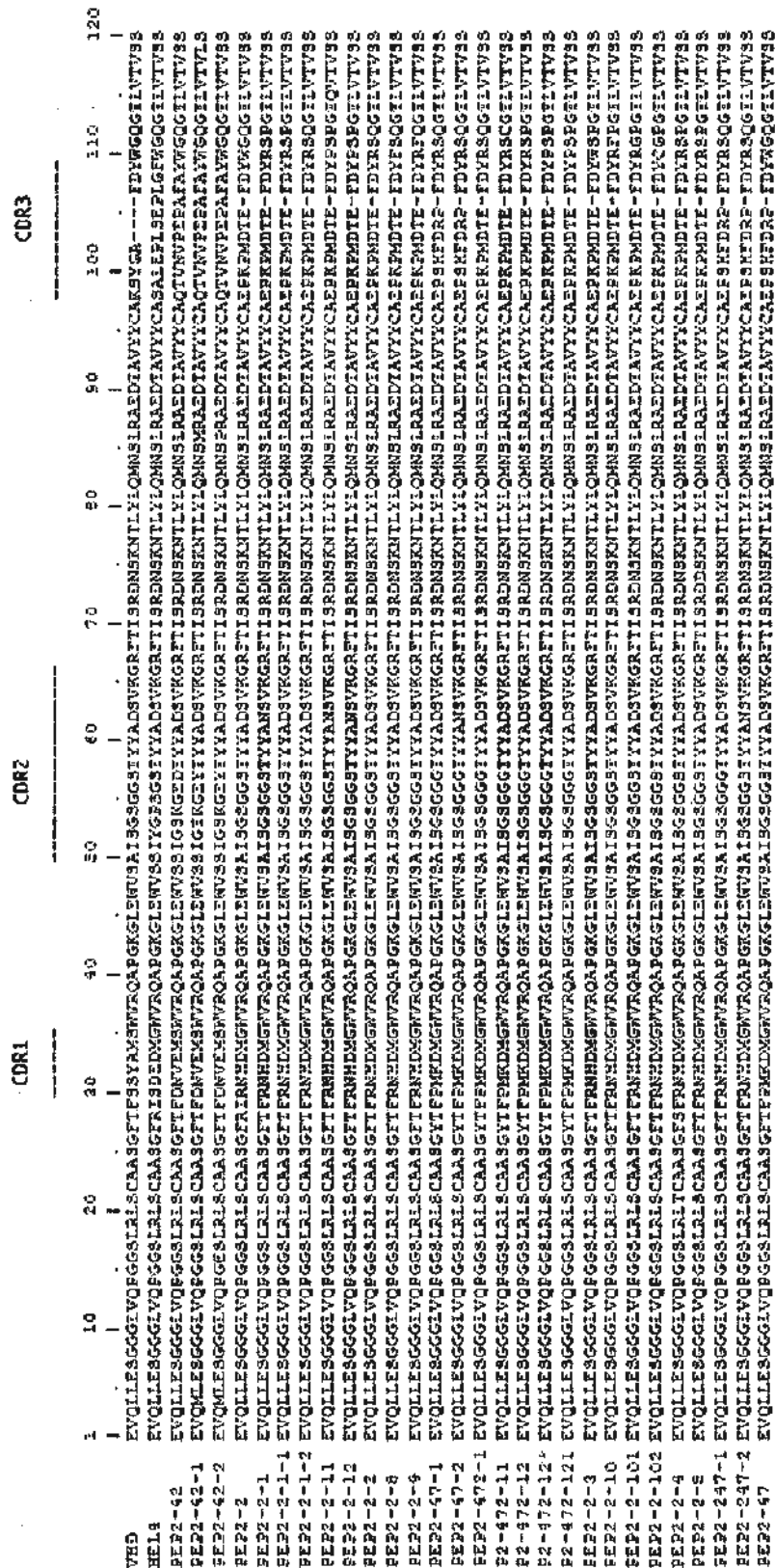


Figura 41

SEC ID Nº: 1

1	MPACCSCSDV	FQYETNKVTR	IQSMNYGTIK	WFFHVIIIESY	VCFALVSDKL	YQRKEPVISS
61	VHTKVKGIAE	VKEEIVENG	KKLVHSVFD	ADYTFPLQGN	SFFVMTNELK	TEGQEQR LCP
121	EYPTRRTLCS	SDRGCKKGWM	DPQSKGIQTG	RCVVHEGNQK	TCEVSAWCPI	EAVEEAPRPA
181	LLNSAENFTV	LIKNNIDFPG	HNYTTRNLP	GLNITCTFHK	TQNPQCPIFR	LGDIFRETGD
241	NFSDVAIQGG	IMGIEIYWDC	NLDRWFHHR	PKYSFRRLLD	KTNVNSLYPG	YNERYAKYYK
301	ENNVEKRTL	KVEGIRFDIL	VFGTGGKF	IQLVVYIGST	LSYFGLAAVF	IDFLIDTYSS
361	NCCRSHIYPW	CKCCQPCVVN	EYYRKKCES	IVEPKPTLKY	VSEVDESHIR	MVNQQLGRS
421	LQDVKGQEV	RPAMDFTDLS	RLPLALHDP	PIPGQPEEQ	LLRKEATPRS	RDSPVWCQCG
481	SCLPSQLPES	HRCLEELCCR	KKPGACITTS	ELFRKLVLSR	HVLQFLLLYQ	EPLLALDVDS
541	TNSRLRHCA	RCYATWRFGS	QDMADFAILP	SCCRWRIRKE	FPKSEGQYSG	FKSPY

Figura 42

SEC ID N°: 2

```

1      MPACCSGSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFS Y VCFALVSDKL YORKEPVTSS
61     VHTKVKGIAE VKKEIVENCV KKLVHSVFD T ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQR LCP
121    EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQT G RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181    LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNLP GLNITCTFH K TQNPOCPIFR LGDIFRETGD
241    NFSDVAIQGG IMGIEIYWD C NIDRWFFHCR PKYSFRR LDD KTNVSLYPG YNFRYAKYYK
301    ENNVEKR TLI KVFCIRFDIL VFCTGCKFDI IQLVVYIGST LSYFCIAAVT IDFLIDTYSS
361    NCCRSHIYPW CKCCQPCVVN EYYYRKKCES IVEPKFTLKY VSFVDESHIR MVNQQLLGRS
421    LQDVKGQEV P RPAMDFTDLS RLPLALHDT P PIPGQPEEI Q LLRKEATPRS RDSPVWCQCG
481    SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPGACITTS ELERKLVLS R HVLOFLLLYQ EPLLALDVDS
541    TNSRLRHGAY RGYATWRFGS QMADFAILP SCCRWRI RKE FPKGECQYSC FKSPY

```


Figura 43

SEC ID Nº: 3

```

1      MPACGSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFSY VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61     VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKLVSFVDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFKL TEGQEQLCP
121    EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181    LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNLP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD
241    NFSDVAIQGG IMGIEIYDC NLDREWHHR PKYSFRRLDD KTNVSLYPG YNFRYAKYYK
301    ENNVEKRTLI KVFGIRFDIL VFCTGCKFDI IQLVVYIGST LSVFGLAAVF IDFLIDTYGS
361    NCCRSHTYFW CKCCQPCVWN EYYRKKCES IVEPKPTLKY VSEVDESHIR MVNQQLGRS
421    LQDVKQSEVP RPAMDFDLS RLPLALHDTF PIPQPEEIQ LLRKEATPRS RDSPVWCQCG
481    SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPACITTS ELFRKLVLRS HVLQFLLLYQ EPLLALDVDS
541    TNERLRHCAY RCYATWRFGS QDMADFAILP SCCRWIRKE FPKSECCQYSG FKSPY

```

Figura 44

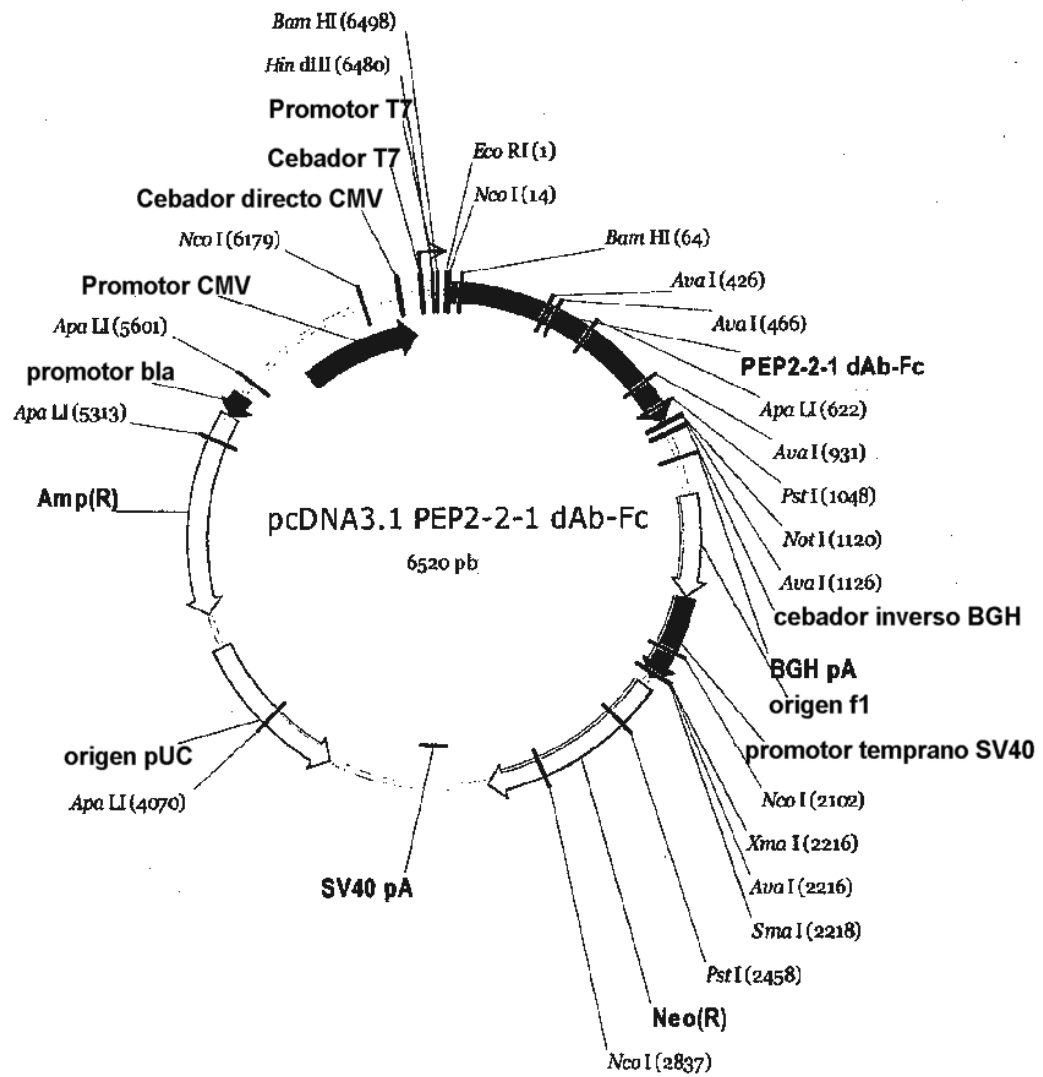


Figura 45

[illegible]

atcagagcagacgactcggatggaagccggctcttgctcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgc
 gtcagccgaactctgctccgcccagggcccaaggtccgcactgcccgaagggcaggatcccgctcgtagcccatggcgatgcct
 gcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggacccg
 tatcaggacatagcgttggttaccctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggtgacccgcttctcgtgct
 ttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgcttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactct
 ggggttcgaaatgaccgaccaagcgacgcccaacctgccatcacgagatttcgattccacccgctgccttctatgaaa
 ggttgggcttcggaatcgcttttcgggaagccggctggatgatctccagcgggggatctcatgctggagtcttctc
 gccaccccaacttggtttatgtagcttataatggtttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagc
 atttttttcaactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttateatgtctgtataccgctcgacct
 cttagctagagcttggegtaatcatggtcatagctgttctctgtgtgaaattgttatccgctcacaaattccacacac
 atacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaataagtgagtgagtaactcacattaatggcttgccgtc
 actgcccgctttccagtcgggaacctgtcgtgcagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagaggcggtt
 tgggtattgggctcttccgcttctcgtcactgaactcgctgcgctcggtcgttcgggtgcgggcagcgggtatca
 gctcactcaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcagggaagaacatgtgagcaaaaggcca
 gcaaaaggccaggaacctgtaaaaggcccgcttgctggcgcttttccataggctccgccccctgacgagcatcaca
 aaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacctcgacaggaactataaagataccaggcggtttcccccctggaagctcc
 ctctgctgcgtctcctgttcgagccctgccgcttacccgataacctgtccgcttctctccttcgggaagcgtggcgct
 ttctcatagctcaogctgtaggatctcagttcggtgtaggctcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccc
 ccgttcagcccgacccgctgcgcttctccgtaactatctgtcttgagtcacacccggtaagacacgaacttatcgcca
 ctggcagcagccactggttaacaggatttagcagagcaggttatgtaggcggtgtctacagagttcttgaaagtgttgcc
 taactacgctacactaagaaacacatatttcttatctcgcctctcctcgaagccaottaccttcccaaaaaagactt
 gtagctcttgatccggcaaaacaaaccacccgctggtagcggtttttttggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaa
 aaaggatctcagaagatcttttgatcttttctacggggctctgacgctcagtggaacgaaaactcaggttaaggga
 tttggctcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatctttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaa
 gtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaactcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatt
 cgttcatccatagttgcttgactccccgctgtgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtg
 tgcaatgatccgcgagacccacgctcacccgctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagc
 gcagaagtgttctgcaactttatccgctccatccagttctattaatgttgccgggaagctagagtaagtagttcg
 ccagttaatagtttgccgcaacgttgttgccattgtctacaggcatcgtgggtgtcacgctcgtcgtttgggtatggctc
 attcagctccgggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctccttcg
 gtccctccgatcgttgtcagaagtgaagttggccgcagtggttatcactcatggttatggcagcactgcataattctctt
 actgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattcttgagaatagtgatgcg
 gcgacccgagttgcctctgcccggcgctcaacacgggataacacccgcccacatagcagaacttcaaaagtgtctatca
 ttggaaaacgtttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgt
 gcacccaaactgatcttcagcatcttttaactttcaccagcggtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgcgc
 aaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttctttttcaatattattgaagcatttatc
 aggggttatctcccatgagcggatcacacatctgaatctatccgaaaaataaataaatagggttccgcgcacattt

ccccgaaaagtggccacctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatcccctatgggtgcactctcagtaacaatctgc
 tctgatgccgcatagttaagccagtatctgctccctgcttgtgtgttggaggctcgctgagtagtgccgagcaaaat
 ttaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttaggggttaggcgttttgctgctgcttc
 gccatgtacggggccagatatacgcgttgacattgattattgactagttattaatagtaataattacggggtcatta
 gtteatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggccgcctggctgaccgcccacgaccc
 ccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtgg
 agtatttacggtaaaactggccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgcccctattgacgtcaat
 gacggtaaatggccgcctggcattatgccagtaacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgt
 attagtcacgctattaccatgggtgatgggttttggcagtaacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcaeggg
 gatttccaagtctccaccccatcgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgt
 cgtaacaactccgcccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctg
 gctaaactagagaacccactgcttactggcttatcgaaatttaatacgaactcaactataggagagaccaagctggetagc
 ctttaaaacttaagcttggtaaccgagctcggatccactagtccagtggtgtgtg

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- | | | |
|----|--|--|
| 10 | <ul style="list-style-type: none"> • WO 02057306 A1 [0007] • WO 2008043145 A [0007] • WO 03020762 A1 [0007] | <ul style="list-style-type: none"> • WO 2009033233 A [0008] • WO 2009903928 A [0257] |
|----|--|--|

15 Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- | | | |
|----|---|--|
| 20 | <ul style="list-style-type: none"> • KABAT et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, 1991 [0061] • NEEDLEMAN, S.B. ; WUNSCH, C.D. <i>Journal of Molecular Biology</i>, 1970, vol. 48, 443-453 [0098] • MARKS et al. <i>BioTechnology</i>, 1992, vol. 10, 779 [0101] | <ul style="list-style-type: none"> • HAWKINS et al. <i>J. Mol. Biol.</i>, 1992, vol. 226, 889 [0101] • JONES et al. <i>Nature</i>, 1986, vol. 321, 522 [0104] • RIECHMANN et al. <i>Nature</i>, 1988, vol. 332, 323 [0104] |
| 25 | <ul style="list-style-type: none"> • BARBAS et al. <i>Proc Nat. Acad. Sci. USA</i>, 1994, vol. 91, 3809 [0101] • SCHIER et al. <i>Gene</i>, 1995, vol. 169, 147-155 [0101] • YELTON et al. <i>J. Immunol.</i>, 1995, vol. 155, 1994 [0101] | <ul style="list-style-type: none"> • VERHOEYEN et al. <i>Science</i>, 1988, vol. 239, 1534 [0104] • PADLAN, E. A. <i>Mol. Immunol.</i>, 1991, vol. 28, 489 [0107] • SAMBROOK et al. <i>Molecular Cloning, A Laboratory Manual</i>. Cold Spring Harbor Laboratory, 1990 [0122] |
| 30 | <ul style="list-style-type: none"> • JACKSON et al. <i>J. Immunol.</i>, 1995, vol. 154 (7), 3310 [0101] | <ul style="list-style-type: none"> • Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1998 [0122] • Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1980 [0159] |