

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 225**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 14/05	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2009 PCT/AU2009/000869**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10000041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2009 E 09771858 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2318438**

54 Título: **Péptidos y epítos anti P2X7**

30 Prioridad:

04.07.2008 AU 2008903451

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

26.04.2017

73 Titular/es:

**BIOSCEPTRE (AUST) PTY LTD (100.0%)
11 Julius Avenue
North Ryde NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:

**BARDEN, JULIAN ALEXANDER y
GIDLEY-BAIRD, ANGUS**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 610 225 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

Péptidos y epítomos anti P2X7

5 **Campo de la divulgación**

[0001] La presente divulgación se refiere a péptidos, epítomos y producción de anticuerpos monoclonales de los mismos.

10 **Antecedentes de la divulgación**

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

[0003] Los receptores purinérgicos (P2X) son canales selectivos de cationes abiertos por ATP. Cada receptor está compuesto 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 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 un receptor P2X₇ que contiene uno o más monómeros que tienen una isomerización en *cis* en Pro210 (de acuerdo con SEQ ID NO: 1 en la Figura 1) y que está desprovisto de función de unión a ATP se ha encontrado 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 y WO03/020762A1 analizan ambos una sonda para distinguir entre receptores P2X₇ funcionales y receptores P2X₇ no funcionales en forma de un anticuerpo monoclonal. El documento WO2008/043145 describe hibridomas que producen anticuerpos contra receptor P2X₇ no funcional. El documento WO2008/043146 describe anticuerpos contra receptor P2X₇ no funcional. Barden *et al.* (FEBS Letters (2003) 528: 159-162) describe la detección específica de receptores P2X₇ humanos no funcionales en células HEK293 y linfocitos B.

[0008] Los antisueros monoclonales tienen ciertas características serológicas no halladas en polisueros que hacen a los anti sueros monoclonales reactivos particularmente valiosos para su uso en investigación, diagnóstico y terapia. Es clave entre estos que los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una afinidad por antígeno que es mayor que la afinidad de la mayoría de especificidades halladas en un polisiero.

[0009] Hasta la fecha ha sido muy difícil obtener un hibridoma que genere cantidades útiles de anticuerpo monoclonal contra receptores P2X₇ no funcionales como se expresan en células vivas, y en particular, anticuerpos monoclonales que puedan usarse en una serie de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Además, los inventores no son conscientes de ningún anticuerpo monoclonal que se haya generado contra receptores P2X₇ funcionales en células vivas. Existe la necesidad de dichos reactivos, particularmente de nuevos anticuerpos capaces de diferenciar entre receptores P2X₇ que se unen a ATP y que no se unen a ATP en células vivas.

[0010] Además, hasta donde conocen los inventores, los anticuerpos anti P2X₇ generalmente no diferencian entre monómeros de P2X₇ y el receptor P2X₇ trimérico formado a partir de estos monómeros. Los anticuerpos que se unen con el receptor trimérico pero no con monómeros de P2X₇ serían ventajosos para estadificar un cáncer, dado que el receptor trimérico se haya particularmente en tejido neoplásico avanzado.

60 **Sumario de la invención**

[0011] La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

[0012] La divulgación se refiere a péptidos y epítomos para inducir anticuerpos que se unan con receptores P2X₇ no funcionales, pero no con receptores P2X₇ funcionales en células vivas. Los péptidos también son útiles para inducir anticuerpos que se unen con receptores P2X₇ funcionales pero no con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas. La divulgación también se refiere a anticuerpos que se unen con estos péptidos, a composiciones que
5 contienen estos péptidos, a métodos para usar los péptidos para generar anticuerpos y a métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedad asociada con expresión de receptor P2X₇ no funcional.

[0013] En ciertos casos se proporciona un epítomo de un receptor P2X₇, estando el epítomo formado por una primera región en forma de una región de un primer monómero de un receptor P2X₇; y una segunda región en forma de una
10 región de un segundo monómero del receptor; en el que las primera y segunda regiones se forman en el receptor por isomerización en *cis* de un resto en la posición 210 de SEQ ID NO: 1 de un monómero del receptor; y en el que las primera y segunda regiones se disponen adyacentes entre sí en el receptor permitiendo de este modo la unión de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti P2X₇ con las primera y segunda regiones que forman el epítomo.

15 **[0014]** En otros casos se proporciona un receptor P2X₇ que tiene un epítomo como se ha descrito anteriormente. Típicamente uno o más de los monómeros del receptor tienen una isomerización en *cis* en la posición 210 de SEQ ID NO: 1 del monómero.

20 **[0015]** En otros casos se proporciona un anticuerpo para unirse con un epítomo de un receptor P2X₇, estando el epítomo formado por una primera región en forma de una región de un primer monómero de un receptor P2X₇; y una segunda región en forma de una región de un segundo monómero del receptor; en el que las primera y segunda regiones se forman en el receptor por isomerización en *cis* de un resto en la posición 210 de SEQ ID NO: 1 de un monómero del receptor; y en el que las primera y segunda regiones se disponen adyacentes entre sí en el receptor
25 permitiendo de este modo la unión de un sitio de unión a antígeno del anticuerpo con las primera y segunda regiones que forman el epítomo.

[0016] En un caso se proporciona un complejo inmunitario en forma de un epítomo como se ha descrito anteriormente unido a un anticuerpo.

30 **[0017]** En otro caso se proporciona un péptido que incluye una región N terminal y una región C terminal, definiéndose las regiones N y C terminales cada una por restos N y C terminales, en el que:

- la región N terminal incluye una secuencia de HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 2) o fragmento de la misma de al menos
35 4 restos;
- la región C terminal incluye un resto C terminal que es prolina, alanina o glicina; en el que el resto C terminal de la región N terminal está unido covalentemente con un resto N terminal de la región C terminal;

en el que el resto C terminal de la región C terminal está conectado con un péptido adicional por un enlazador que
40 tiene una longitud de aproximadamente 10 a 40 angstroms;
y en el que dicho péptido adicional consiste en una secuencia KTTNVSLYPGYNFRYAKYYKENVKRTLIKVFGIRFDILVFGTGKFD (SEQ ID NO: 6) o fragmento de la misma de al menos 4 restos.

45 **[0018]** En otro caso más, se proporciona un péptido definido por la fórmula:

(A)(X_n)(B), en la que:

- (A) es una secuencia de aminoácidos de GHNYTTRNILP (SEQ ID NO: 8) o un fragmento de la misma de al
50 menos 4 aminoácidos;
- (X_n) es un enlazador de 10 a 40 angstroms de longitud, consistiendo dicho enlazador en uno o más restos de aminoácidos;
- 55 - (B) es una secuencia de aminoácidos de AKYYKENVK (SEQ ID NO: 9) o un fragmento de la misma de al menos 4 aminoácidos.

[0019] En casos adicionales se proporciona un péptido que tiene la siguiente secuencia:

60 GHNYTTRNILPGAGAKYYKENVK (SEQ ID NO: 10).

[0020] En más casos adicionales se proporciona un complejo inmunitario en forma de un péptido descrito anteriormente unido a un anticuerpo. Típicamente el anticuerpo se une con receptores P2X₇ no funcionales pero no con receptores P2X₇ funcionales.

[0021] En más casos adicionales se proporciona un uso de un péptido descrito anteriormente para producir un anticuerpo para unión con receptores P2X₇ no funcionales.

[0022] En más casos adicionales se proporciona un uso de un anticuerpo descrito anteriormente para determinar si un individuo tiene un cáncer.

[0023] En más casos adicionales se proporciona un uso de un anticuerpo descrito anteriormente para tratar a un individuo que tiene cáncer.

[0024] En más casos adicionales se proporciona un kit que incluye un anticuerpo como se ha descrito anteriormente y opcionalmente:

- un péptido como se ha descrito anteriormente;

incluyendo el kit instrucciones descritas para su uso en diagnóstico o tratamiento de cáncer.

Descripción detallada de los casos

[0025] Se hará ahora referencia en detalle a ciertos casos de la divulgación. Aunque la divulgación se describirá junto con los casos, se entenderá que la intención no es limitar la divulgación a estos casos. Por el contrario, se pretende que la divulgación abarque todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, que pueden incluirse dentro del alcance de la presente divulgación como se define por las reivindicaciones.

[0026] 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 divulgación. La presente divulgación no está limitada de ningún modo a los métodos y materiales descritos.

[0027] Se entenderá que la divulgación desvelada y definida en la presente memoria descriptiva se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o evidentes a partir del texto o los dibujos. Todas estas diferentes combinaciones constituyen diversos aspectos alternativos de la divulgación.

[0028] 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 “comprendiendo”, “comprende” y “comprendido”, excluya aditivos, componentes, números enteros o etapas adicionales.

[0029] Los antisueros anti-P2X₇ contra receptores P2X₇ no funcionales expresados en células vivas disponibles en el momento de la divulgación han sido todos policlonales.

[0030] Los inventores han identificado un epítipo que se expresa exclusivamente en receptores P2X₇ que no se unen con ATP (conocidos de otro modo como “receptores no funcionales”). Se ha descubierto que el epítipo y los péptidos que lo forman son útiles para generar anticuerpos monoclonales que se unen con receptores P2X₇ no funcionales expresados en células vivas.

[0031] La unión en células vivas es importante porque se cree que la expresión del receptor P2X₇ no funcional en o sobre células, siendo ejemplos las células epiteliales, es un biomarcador de muchos cánceres tales como cánceres epiteliales y otras afecciones. En consecuencia, con anticuerpos monoclonales que se unen con células vivas se hace posible proporcionar productos terapéuticos sistémicos bien en forma del anticuerpo en sí mismo, o un conjugado de anticuerpo-agente citotóxico a una amplia serie de enfermedades caracterizadas por la expresión de receptores P2X₇ no funcionales. También se hace posible posibilitar la captura de imágenes *in vivo* y diagnóstico o supervisión de enfermedades caracterizadas por la expresión de receptores P2X₇ no funcionales.

[0032] Los inventores han observado a partir de modelización molecular detallada descrita adicionalmente en el presente documento que el epítipo se encuentra solamente en el receptor P2X₇, es decir el trímero formado a partir de los monómeros de P2X₇. Más particularmente, el epítipo abarca monómeros de P2X₇ adyacentes en el receptor P2X₇ trimérico. Los monómeros de P2X₇ individuales que no se alinean como en un receptor trimérico no funcional no contienen por lo tanto el epítipo. Esto permite, provechosamente estadificar tumores. Esto es más difícil de hacer con anticuerpos que se unen tanto con receptor P2X₇ monomérico como con el trimérico.

[0033] Para el fin de interpretar la memoria descriptiva, las siguientes definiciones se aplicarán en general y siempre que sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En caso de que cualquier definición expuesta entre en conflicto con cualquier documento referido en el presente documento, la definición expuesta posteriormente prevalecerá.

[0034] “Receptor purinérgico” se refiere en general a un receptor que usa una purina (tal como ATP) como ligando.

[0035] “Receptor P2X₇” se refiere en general a un receptor purinérgico formado por tres subunidades proteicas o monómeros, teniendo al menos uno de los monómeros una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID NO: 1. En la medida en que el receptor P2X₇ se forma a partir de tres monómeros, es un “trímero” o “trimérico”. El “receptor P2X₇” puede ser un receptor funcional o no funcional como se describe posteriormente. El “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 que incluyen formas truncadas o secretadas de origen natural de los monómeros que forman el receptor P2X₇ (por ejemplo, una forma que consiste en la secuencia del 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 ciertos casos de la divulgación, los polipéptidos monoméricos de P2X₇ de secuencia nativa desvelados en el presente documento son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden la secuencia de aminoácidos de longitud completa mostrada en SEQ ID NO: 1. En ciertos casos, el receptor P2X₇ puede tener una secuencia de aminoácidos que está modificada, por ejemplo diversos aminoácidos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 pueden sustituirse, suprimirse o puede insertarse un resto.

[0036] El “receptor P2X₇ funcional” se refiere en general a una forma del receptor P2X₇ que tiene un sitio de unión o hendidura para unión a ATP. Cuando se une a 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 la homeostasis normal, la expresión de receptores P2X₇ funcionales se limita 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.

[0037] “Receptor P2X₇ no funcional” se refiere en general a una forma de un receptor P2X₇ en la que uno o más de los monómeros tiene una isomerización en *cis* en Pro210 (de acuerdo con SEQ ID NO: 1). La isomerización puede surgir de cualquier acontecimiento molecular que conduzca al plegamiento erróneo del monómero, incluyendo por ejemplo mutación de secuencia primaria de monómero o procesamiento postraduccional anómalo. Una consecuencia de la isomerización es que el receptor es incapaz de unirse con ATP. En las circunstancias, el receptor no puede formar un poro y esto limita la medida en que los iones de calcio pueden entrar en el citosol. Se expresan receptores P2X₇ no funcionales en una amplia serie de cánceres epiteliales y hematopoyéticos.

[0038] Los “anticuerpos” o “inmunoglobulinas” o “Ig” son proteínas de gamma globulina que se encuentran en la sangre, u otros fluidos corporales de vertebrados que actúan en el sistema inmunitario para unirse con el antígeno, identificando y/o neutralizando de este modo objetos ajenos.

[0039] Los anticuerpos son en general una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente. Las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene enlaces disulfuro intracatenarios espaciados regularmente.

[0040] Las cadenas H y L definen dominios Ig específicos. Más particularmente, cada cadena 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}).

[0041] Los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen 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 cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0042] El dominio constante incluye la parte Fc que comprende las partes carboxilo terminales de ambas cadenas H unidas entre sí por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos tales como ADCC se determinan por secuencias en la región Fc, cuya región también es la parte reconocida por receptores de Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

[0043] El emparejamiento de un V_H y V_L entre sí 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 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 por 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 variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables” (en general 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, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β .

[0044] “Región hipervariable” se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3).

10

[0045] 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.

[0046] Un anticuerpo “intacto” 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, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de secuencia de aminoácidos de los mismos.

15

[0047] Los “fragmentos de anticuerpo completo que incluyen un dominio variable” incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

20

[0048] Los “fragmentos Fab” consisten en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena 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.

25

[0049] Un “fragmento Fab” difiere de los 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 designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

30

[0050] 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 reticular con el antígeno.

[0051] 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 estrecha, no covalente.

35

[0052] 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 de dos cadenas. 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 unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

40

45

[0053] “Fv monocatenario” también abreviado como “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados para formar una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno.

50

[0054] 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.

[0055] “Diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden 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 de sFv (véase párrafo precedente) con enlazadores cortos (de aproximadamente 5-10 restos) entre los 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.

60

[0056] Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos 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.

[0057] Un “*anticuerpo aislado*” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente preexistente. Son componentes contaminantes materiales que interferirían con usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos.

5 **[0058]** 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. 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 inutilizado.

10

[0059] Las formas “*humanizadas*” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) 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 los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan 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 de anticuerpo deseada. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan 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 sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

25

[0060] “*Anticuerpo monoclonal*” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden 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 sin contaminarse por otros anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por la metodología de hibridoma. Los “*anticuerpos monoclonales*” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas.

35 **[0061]** La expresión “*anticuerpo anti receptor P2X₇*” o “*un anticuerpo que se une con receptor P2X₇*” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con 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 de receptor P2X₇ no relacionada es menor de aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo con receptor P2X₇ como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertos casos, un anticuerpo que se une con receptor P2X₇ tiene una constante de disociación (K_d) de <1 μM, <100 nM, <10 nM, <1 nM o <0,1 nM. Un anticuerpo de receptor P2X₇ no funcional es generalmente uno que tiene algunas o todas de estas características serológicas y que se une con receptores P2X₇ no funcionales pero no con receptores P2X₇ funcionales.

45 **[0062]** Un anticuerpo de “*afinidad madurada*” es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables 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 de afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Se producen anticuerpos de afinidad madurada por procedimientos conocidos en la técnica.

50

[0063] 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.

55 **[0064]** 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.

[0065] 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). A no ser que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, “*afinidad de unión*” se refiere a 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 (K_d). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general con el

antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad en general se unen con el antígeno más rápido 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 divulgación.

5

[0066] “Epítipo” en general se refiere a la parte de un antígeno que se une con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un epítipo puede ser “lineal” en el sentido de que los bucles hipervariables de las CDR de anticuerpo que forman el sitio de unión a antígeno se unen con una secuencia de aminoácidos como en una estructura proteica primaria. En ciertos casos, el epítipo es un “epítipo conformacional”, es decir uno en el que los bucles hipervariables de las CDR se unen con restos como se presentan en la estructura proteica terciaria o cuaternaria.

10

[0067] En un caso se proporciona un epítipo de un receptor P2X₇

estando formado el epítipo por:

15

- una primera región en forma de una región de un primer monómero de un receptor P2X₇; y
- una segunda región en forma de una región de un segundo monómero del receptor;

en el que las primera y segunda regiones se forman en el receptor por isomerización en *cis* de un resto en la posición 210 de SEQ ID NO: 1 de un monómero del receptor;

20

y en el que las primera y segunda regiones se disponen adyacentes entre sí en el receptor permitiendo de este modo la unión de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti P2X₇ con las primera y segunda regiones que forman el epítipo.

25

[0068] Típicamente el epítipo es un epítipo conformacional. En estos casos, las primera y segunda regiones definen cada una un espacio molecular que incluye cada una uno o más restos de SEQ ID NO: 1. Típicamente la primera región es una que define un espacio molecular que incluye uno o más de los restos de SEQ ID NO: 1 que se exponen para unión con un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de isomerización en *cis* de Pro210 de un monómero que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. Estos restos incluyen Gly 200, His 201, Asn 202, Tyr 203, Thr 204, Thr 205, Arg 206, Asn 207, Ile 208, Leu 209 y Pro210. En un caso la primera región incluye al menos uno de estos restos. Típicamente la primera región incluye al menos 4 de estos restos, aunque puede ser menor, por ejemplo, 2 o 3, dependiendo de cuantos restos se presenten en la segunda región. En un caso, la primera región incluye al menos 1 par de restos mostrados en la Tabla 1 a continuación:

35

Tabla 1

His 201 Gly 200	Asn 202 Gly 200	Tyr 203 Gly 200	Thr 204 Gly 200	Thr 205 Gly 200	Arg 206 Gly 200	Asn 207 Gly 200	Ile 208 Gly 200	Leu 209 Gly 200
	Asn 202 His 201	Tyr 203 His 201	Thr 204 His 201	Thr 205 His 201	Arg 206 His 201	Asn 207 His 201	Ile 208 His 201	Leu 209 His 201
		Tyr 203 Asn 202	Thr 204 Asn 202	Thr 205 Asn 202	Arg 206 Asn 202	Asn 207 Asn 202	Ile 208 Asn 202	Leu 209 Asn 202
			Thr204 Tyr 203	Thr205 Tyr 203	Arg 206 Tyr 203	Asn 207 Tyr 203	Ile 208 Tyr 203	Leu 209 Tyr 203
				Thr 205 Thr 204	Arg 206 Thr 204	Asn 207 Thr 204	Ile 208 Thr 204	Leu 209 Thr 204
					Arg 206 Thr 205	Asn 207 Thr 205	Ile 208 Thr 205	Leu 209 Thr 205
						Asn 207 Arg 206	Ile 208 Arg 206	Leu 209 Arg 206
							Ile 208 Asn 207	Leu 209 Asn 207
								Leu 209 Ile 208

[0069] En ciertos casos la primera región incluye 2 o más pares de restos mostrados en la Tabla 2.

[0070] La primera región puede contener adicionalmente uno o más restos periféricos que están implicados de forma íntima en la formación del sitio de unión a ATP en el mayor de los dos pliegues de dominio extracelular. Estos son Lys 193, Phe 275 y Arg 294. Arg 125 se localiza en el menor de los dos pliegues de dominio extracelular. Por lo tanto en ciertos casos, la primera región incluye además uno o más de los siguientes restos de SEQ ID NO: 1: Arg 125, Lys 193, Phe 275 y Arg 294. Se entenderá que la primera región no consiste solamente en estos restos. Es decir la primera región, como se ha analizado anteriormente, define un espacio molecular que incluye uno o más de los restos de SEQ ID NO: 1 que se exponen para unión a un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de isomerización en *cis* de Pro 210 de un monómero que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. En este contexto, los Arg 125, Lys 193, Phe 275 y Arg 294 se proporcionan solamente además, pero no como alternativa a por ejemplo uno o más de los restos Gly 200, Su 201, Asn 202, Tyr 203, Thr 204, Thr 205, Arg 206, Asn 207, Ile 208, Leu 209.

[0071] Típicamente la segunda región es una que define un espacio molecular que incluye uno o más de los restos de SEQ ID NO: 1 que se exponen para unión a un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de isomerización en *cis* de Pro210 de un monómero que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. Estos restos incluyen Lys 297, Tyr 298, Tyr 299, Lys 300, Glu 301, Asn 302, Asn 303, Val 304, Glu 305 y Lys 306. En un caso la segunda región incluye al menos uno de estos restos. Típicamente la segunda región incluye al menos 4 de estos restos, aunque puede ser menor, por ejemplo, 2 o 3, dependiendo de cuantos restos se presenten en la primera región. En un caso, la segunda región incluye al menos 1 par de restos mostrados en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Tyr 298 Lys 297	Tyr 299 Lys 297	Lys 300 Lys 297	Glu 301 Lys 297	Asn 302 Lys 297	Asn 303 Lys 297	Val 304 Lys 297	Glu 305 Lys 297	Lys 306 Lys 297
	Tyr 298 Tyr 299	Tyr 298 Lys 300	Tyr 298 Glu 301	Tyr 298 Asn 302	Tyr 298 Asn 303	Tyr 298 Val 304	Tyr 298 Glu 305	Tyr 298 Lys 306
		Tyr 299 Glu 301	Tyr 299 Glu 301	Tyr 299 Asn 302	Tyr 299 Asn 303	Tyr 299 Val 304	Tyr 299 Glu 305	Tyr 299 Lys 306
			Lys 300 Glu 301	Lys 300 Asn 302	Lys 300 Asn 303	Lys 300 Val 304	Lys 300 Glu 305	Lys 300 Lys 306
				Glu 301 Asn 302	Glu 301 Asn 303	Glu 301 Val 304	Glu 301 Glu 305	Glu 301 Lys 306
					Asn 302 Asn 303	Asn 302 Val 304	Asn 302 Glu 305	Asn 302 Lys 306
						Asn 303 Val 304	Asn 303 Glu 305	Asn 303 Lys 306
							Val 304 Glu 305	Val 304 Lys 306
								Glu 305 Lys 306

[0072] En ciertos casos la segunda región incluye 2 o más pares de restos mostrados en la Tabla 2.

[0073] La segunda región puede contener adicionalmente uno o más restos periféricos que están implicados íntimamente en la formación del sitio de unión a ATP. Estos son Arg 307 y Lys 311. Por lo tanto en ciertos casos, la segunda región incluye además Arg 307 y/o Lys 311. Se entenderá que la segunda región no consiste solamente en estos restos. Es decir, la segunda región, como se ha analizado anteriormente, define un espacio molecular que incluye uno o más de los restos de SEQ ID NO: 1 que se exponen para unión a un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de isomerización en *cis* de Pro210 de un monómero que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. En este contexto, los Arg 307 y Lys 311 solamente se proporcionan además de, pero no como alternativa a, por ejemplo, uno o más de los restos Lys 297, Tyr 298, Tyr 299, Lys 300, Glu 301, Asn 302, Asn 303, Val 304, Glu 305 y Lys 306.

[0074] En ciertos casos, el epítipo es o incluye un epítipo lineal. Los ejemplos incluyen en los que la primera región incluye una de las siguientes secuencias de SEQ ID NO: 1 en la Tabla 3:

Tabla 3

Gly 200 a Tyr 203
His 201 a Thr 204
Asn 202 a Thr 205
Tyr 203 a Arg 206
Thr 204 a Asn 207
Thr 205 a Ile 208
Arg 206 a Leu 209

[0075] En estos casos, la segunda región del epítipo puede incluir una de las siguientes secuencias de SEQ ID NO: 1 en la Tabla 4:

5

Tabla 4

Lys 297 a Lys 300
Tyr 298 a Glu 301
Tyr 299 a Asn 301
Lys 300 a Asn 303
Glu 301 a Val 304
Asn 301 a Glu 305
Asn 303 a Lys 306

[0076] En ciertos casos, la primera región contiene más restos que la segunda región. En otros casos, la segunda región contiene más restos que la primera región.

10

[0077] La primera región y segunda región pueden contener cada una de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 restos, por ejemplo 5, 6, 7, 8 o 9 restos. Cuando hay más restos en la segunda región, puede haber menos restos en la primera región, es decir menos de 4, por ejemplo 2 o 3. Lo mismo se aplica a la inversa.

15 **[0078]** Como se describe en el presente documento, las primera y segunda regiones se disponen adyacentes entre sí en el receptor permitiendo de este modo la unión de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti P2X₇ a las primera y segunda regiones que forman el epítipo. En más detalle, los inventores han descubierto que aunque se localicen en monómeros separados, las primera y segunda regiones en combinación forman un epítipo que puede unirse con un sitio de unión a antígeno individual de un anticuerpo. En general las primera y segunda regiones del epítipo están separadas por no más de aproximadamente 40 Angstrom. Si la distancia es mayor que esto, la afinidad de unión del anticuerpo tiende a reducirse ya que el sitio de unión a antígeno se requiere para atravesar una distancia mayor a través de los monómeros dentro del receptor en cuyo caso se unen menos restos. En general las primera y segunda regiones están separadas por aproximadamente 10 Angstrom, aunque son posibles mayores distancias menores de 40 Angstrom tales como 15, 20, 25, 30, 35 Angstrom.

25

[0079] El epítipo descrito en el presente documento puede proporcionarse en una forma sustancialmente purificada o aislada, por ejemplo como un fragmento de un receptor P2X₇ de origen natural o como un receptor P2X₇ sintético.

30 **[0080]** En otros casos se proporciona un receptor P2X₇ que incluye un epítipo como se ha descrito anteriormente. Típicamente al menos uno de los monómeros del receptor tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en SEQ ID NO: 1. El receptor puede ser una variante de origen natural de receptor P2X₇, por ejemplo, en el que los monómeros de P2X₇ son variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas que incluyen formas truncadas o secretadas de origen natural de los monómeros que forman el receptor P2X₇ (por ejemplo, una forma que consiste en la secuencia de dominio extracelular o forma truncada de la misma), formas
35 variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural. En ciertos casos de la divulgación, los polipéptidos monoméricos de P2X₇ de secuencia nativa son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden la secuencia de aminoácidos de longitud completa mostrada en SEQ ID NO: 1. En ciertos casos el receptor P2X₇ puede tener una secuencia de aminoácidos que se modifica, por ejemplo diversos aminoácidos en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 pueden
40 sustituirse, suprimirse o puede insertarse un resto.

45 **[0081]** Típicamente, el receptor es un receptor P2X₇ no funcional que incluye un epítipo como se ha descrito anteriormente. La isomerización en *cis* puede surgir de cualquier acontecimiento molecular que conduzca a plegamiento erróneo del monómero, incluyendo por ejemplo, mutación de la secuencia primaria de monómero o procesamiento postraduccional anómalo. En ciertos casos, no todos los monómeros del receptor tienen una isomerización en *cis* de un resto en la posición 210 de un monómero, por ejemplo, 1 o 2 de los monómeros del receptor pueden tener una isomerización en *cis* de un resto en la posición 210 de SEQ ID NO: 1.

[0082] El receptor puede proporcionarse en forma sustancialmente purificada o aislada, es decir puede aislarse de

una célula, puede estar en forma de una muestra de receptor homogénea, bien proporcionada como una fase sólida o de otro modo.

5 **[0083]** Como se describe en detalle posteriormente, los inventores han generado anticuerpos que tienen un sitio de unión a antígeno para unión con un epítipo descrito anteriormente. Por lo tanto en ciertos casos se proporciona un anticuerpo para unión con un epítipo como se ha descrito anteriormente.

10 **[0084]** Típicamente al menos una región determinante de complementariedad ((CDR) (o región hipervariable)) de un sitio de unión a antígeno (o dominio variable) se une con una primera región del epítipo y al menos otra CDR de ese sitio de unión a antígeno se une con la segunda región del epítipo. En algunos casos, 2 de las CDR se unen con la primera región y la otra CDR se une con la segunda región. En otros casos, 2 de las CDR se unen con la segunda región y la otra CDR se une con la primera región. En algunos casos, una CDR se une con la primera región, otra CDR se une con la segunda región y la CDR restante no está unida con la primera o segunda región del epítipo.

15 **[0085]** En ciertos casos se proporciona un anticuerpo anti receptor P2X₇ no funcional, en el que el sitio de unión a antígeno del anticuerpo se une con al menos un par de restos de la Tabla 1 anterior y con al menos un par de restos de la Tabla 2 anterior.

20 **[0086]** En otros casos se proporciona un anticuerpo anti receptor P2X₇ no funcional, en el que el sitio de unión a antígeno del anticuerpo se une con al menos una secuencia de la Tabla 3 anterior y con al menos una secuencia de la Tabla 4 anterior.

25 **[0087]** En otros casos se proporciona un complejo inmunitario en forma de un epítipo descrito anteriormente unido a un anticuerpo. Típicamente, el epítipo se proporciona en un receptor P2X₇. Todos los epítipos del receptor pueden unirse con anticuerpo o solamente algunos, por ejemplo, menos de tres epítipos del receptor se unen con anticuerpo. El complejo puede contener más o menos moléculas de anticuerpo que receptores.

30 **[0088]** Como se describe en el presente documento, usando un modelo tridimensional de un receptor P2X₇ no funcional, los inventores han determinado una serie de péptidos que pueden usarse para producir un anticuerpo para unirse con el epítipo de la divulgación. Por lo tanto, en cierto caso, se proporciona un péptido que incluye una región N terminal y una región C terminal, definiéndose las regiones N y C terminales cada una por restos N y C terminales, en los que:

- 35 - la región N terminal incluye una secuencia de una de los siguientes:
 - HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 2);
 - GHNYTTRNIL (SEQ ID NO: 3);
 - 40 • DFPGHNYTTRNIL (SEQ ID NO: 4);
 - un fragmento de SEQ ID NO: 2 a 4 de al menos 4 restos;
 - 45 • la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 2-4 en la que los restos D pueden sustituirse de forma conservativa con un resto E, N o Q; los restos F pueden sustituir de forma conservativa un resto Y o W; los restos G pueden sustituir de forma conservativa un resto A, V, L o I; los restos H pueden sustituir de forma conservativa un resto K o R; los restos N pueden sustituir de forma conservativa un resto D, E o Q; los restos Y pueden sustituir de forma conservativa un resto F o W; los restos T pueden sustituir de forma conservativa un resto C, S o M; los restos R pueden sustituir de forma conservativa un resto H o K; el resto I puede sustituir de forma conservativa un resto G, A, V o L; y el resto L puede sustituir de forma conservativa un resto G, A, V o I;
 - 50 • MPACCSGSDVDFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSIVCFALVSDKL YQRKEPVISSVHTKVKGIAEV-
KEEIVENGVKKLVHVSFDTADYTFPLQGN SFFVMTNFKTEGQEQLCPEYPTRRITLCSSDRGCKKGMWMD-
55 PQSKGIQTG RCVVHEGNQKTCEVSAWCPIEAVEEAPRPALLNSAENFTVLIKNNIDFGP HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 5); o
 - una secuencia dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 5 que incluye HNYTTRNIL en el extremo C,
- 60 - la región C terminal incluye un resto C terminal que es prolina, alanina o glicina,

en el que el resto C terminal de la región N terminal se une covalentemente con un resto N terminal de la región C terminal.

[0089] La región C terminal puede consistir en un único resto de aminoácido en forma de prolina en conformación en *cis*. Como alternativa puede incluir otros restos localizados N terminal de la prolina.

[0090] Típicamente, el resto C terminal de la región C terminal está conectado con un péptido adicional por un enlazador que tiene una longitud de aproximadamente 10 a 40 Angstrom. En un caso el péptido adicional consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 6 o un fragmento de la misma de 4 restos o más. En un caso la región C terminal incluye un resto C terminal que es prolina en conformación en *cis*.

[0091] En un caso, el péptido adicional deriva de la secuencia de receptor P2X₇, y tiene no más de 594 restos de un receptor P2X₇ de SEQ ID NO: 1. En particular, el péptido adicional puede consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 6 o una secuencia dentro de la secuencia de SEQ ID NO: 6. Los ejemplos de estos péptidos dentro de SEQ ID NO: 6 incluyen los que tienen una secuencia descrita en la Tabla 5 (numeración de acuerdo con la Figura 1):

Tabla 5

K281 a K297	Y298 a G314
T282 a Y298	Y299 a I315
T283 a Y299	K300 a R316
N284 a K300	E301 a F317
V285 a E301	N302 a D318
S286 a N302	N303 a I319
L287 a N303	V304 a L320
Y288 a V304	E305 a V321
P289 a E305	K306 a F322
G290 a K306	R307 a G323
Y291 a R307	T308 a T324
N292 a T308	L309 a G325
F293 a L309	I310 a G326
R294 a I310	K311 a K327
Y295 a K311	V312 a F328
A296 a V312	F313 a D329
K297 a F313	

15

[0092] El péptido mostrado en la Tabla 5 puede tener una longitud de 6 a 17 restos. En una realización, el fragmento peptídico es de K297 a F313 que consiste en la secuencia de KYKKNVEKRTLIKVF (SEQ ID NO: 7).

[0093] La región C terminal puede unirse o conectarse con el péptido adicional por cualquier reacción de conjugación adecuada que pueda usarse con cualquier enlazador adecuado. El enlazador puede ser de una longitud particular para ayudar a la inmunogenicidad y minimizar la interferencia espacial. Por ejemplo, el enlazador puede tener una longitud de entre 10 Å y 40 Å. Preferentemente el enlazador tiene una longitud de 10 o 20 Å.

[0094] El enlazador puede ser un enlazador de aminoácidos de uno o más restos de aminoácidos. No se pretende, sin embargo, que la expresión “enlazador de aminoácidos” implique que dicho enlazador consiste exclusivamente en restos de aminoácidos. El enlazador de aminoácidos puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que no interfiera sustancialmente con el péptido de la divulgación.

[0095] Los restos de aminoácidos del enlazador de aminoácidos son preferentemente aminoácidos de origen natural o aminoácidos no naturales, y todo L o todo D o mezclas de los mismos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden seleccionarse de glicina, alanina, leucina, serina, valina y treonina. Preferentemente el enlazador consiste en uno o dos aminoácidos seleccionados de glicina y alanina.

[0096] En ciertos casos se proporciona un péptido definido por la fórmula: (A)(X_n)(B), en la que:

35

- (A) es una secuencia de aminoácidos de GHNYTTRNILP (SEQ ID NO: 8) o un fragmento de la misma de al menos 4 aminoácidos;

- (X_n) es un enlazador de 10 a 40 angstrom de longitud, consistiendo dicho enlazador en uno o más restos de aminoácidos;

40

- (B) es una secuencia de aminoácidos de AKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 9) o un fragmento de la misma de al menos 4 aminoácidos.

5 **[0097]** En otros casos se proporciona un péptido que tiene la siguiente secuencia:

GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 10).

10 **[0098]** Los péptidos de la divulgación pueden prepararse por cualquiera de varias técnicas conocidas en este campo incluyendo síntesis de fase sólida y tecnología de ADN recombinante.

15 **[0099]** Como se conoce en la técnica, un vehículo es una sustancia que se conjuga con un péptido que forma un epítipo para potenciar inmunogenicidad. Algunos vehículos hacen esto uniéndose con múltiples vehículos para proporcionar un antígeno de peso molecular aumentado al hospedador en el que se va a desarrollar la respuesta inmunitaria.

20 **[0100]** Los vehículos preferidos incluyen toxinas o toxoides bacterianos. Otros vehículos adecuados incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis*, albúmina tal como albúmina de suero bovino, péptidos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas de Pertussis, proteína D de *H. influenza* y toxina A, B o C de *C. difficile*.

[0101] Cuando el vehículo es una toxina o un toxoide bacteriano, se prefieren toxoides de difteria o tétanos.

25 **[0102]** Preferentemente el vehículo contiene grupos funcionales que pueden reaccionar con el péptido de la divulgación, o pueden modificarse para ser capaces de reaccionar con el péptido.

30 **[0103]** Como se ha mencionado anteriormente, los péptidos de la divulgación son útiles para generar anticuerpos monoclonales que se unen con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas, pero no con receptores P2X₇ funcionales en células vivas. Una ventaja adicional es que estos péptidos pueden usarse también para generar anticuerpos monoclonales que se unen con receptores P2X₇ funcionales en células vivas, pero no con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas.

35 **[0104]** Estos últimos anticuerpos son particularmente importantes porque pueden usarse para seleccionar individuos para los que la terapia de anticuerpos puede aplicarse sistemáticamente. En más detalle, la mayoría de la población contiene alelos que controlan la expresión de receptores P2X₇ funcionales en tejidos tales como tejidos linfoides. Se entiende que la expresión del receptor en estos compartimentos tisulares es una fisiología completamente normal. Por el contrario, una minoría de la población tiene uno o más alelos que controlan la expresión del receptor P2X₇ no funcional en estos compartimentos tisulares. Si se proporcionara a esta última población anticuerpo que se una con receptores no funcionales expresados en células vivas para el tratamiento del cáncer, existe el riesgo de que esta terapia pueda afectar al sistema inmunitario porque eliminaría las células linfoides que expresan receptores no funcionales.

40 **[0105]** En consecuencia, los anticuerpos de la divulgación descritos en el presente documento que se unen con receptores funcionales pero no con receptores no funcionales en células vivas son particularmente útiles para ayudar a seleccionar individuos para los que no debería proporcionarse terapia de anticuerpos o bien debería proporcionarse en una forma modificada de forma apropiada. Dicho ensayo podría usarse junto con una exploración idéntica usando el anticuerpo para receptores no funcionales. De esta manera los pacientes con receptores funcionales en tejido linfóide y pacientes con receptores no funcionales en tejido linfóide podrían separarse de pacientes con bajos niveles de expresión de receptor, bien funcionales o no funcionales. El uso de cada anticuerpo en conjunto permite la diferenciación de pacientes que al menos requerirían supervisión más estrecha como resultado del agotamiento de sus células inmunitarias que acompaña al tratamiento de su afección con el anticuerpo terapéutico para receptor no funcional.

55 **[0106]** En ciertos casos se proporciona un anticuerpo para unirse con un receptor P2X₇ funcional, pero no un receptor P2X₇ no funcional expresado en una célula viva. En otros casos se proporciona un anticuerpo para unirse con un receptor P2X₇ no funcional, pero no un receptor P2X₇ funcional expresado en una célula viva. Típicamente estos anticuerpos son anticuerpos inducidos contra un péptido de la divulgación.

60 **[0107]** En ciertos casos los anticuerpos de la divulgación pueden tener afinidades que varían de 10⁻⁷ M a 10⁻¹³ M como moléculas de anticuerpo completas pero con una tendencia a requerir 1,0⁻⁷ M si se usa la vía de hibridoma preferentemente como una IgM para evitar la inhibición del crecimiento del hibridoma por los anticuerpos que se producen. Estas afinidades pueden aumentarse o reducirse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia incluyendo maduración de afinidad de anticuerpos.

[0108] El anticuerpo puede ser uno obtenido de antisueros monoclonales o policlonales. El anticuerpo puede

producirse por hibridoma o bibliotecas de presentación en fagos. Pueden obtenerse antisueros monoclonales y policlonales inmunizando a un hospedador con un péptido de la divulgación junto con un adyuvante de acuerdo con técnicas convencionales. Los sueros resultantes pueden explorarse usando cualquiera de varias técnicas serológicas en las que los sueros se exponen a expresión del receptor en células vivas.

5

[0109] Usando la divulgación se hace posible proporcionar anticuerpos usando expresión recombinante. Por ejemplo, las CDR de los anticuerpos generados por inmunización con el péptido de la divulgación se secuencian, se determinan las secuencias de nucleótidos codificantes y después se subclonan en vectores de expresión para síntesis recombinante de anticuerpos. Esto proporciona después oportunidades de desarrollar anticuerpos quiméricos, es decir anticuerpos que contienen dominios variables humanos y dominios constantes no humanos, anticuerpos humanizados, es decir los formados por injerto de CDR no humanas en un marco de anticuerpo humano y anticuerpos completamente humanos.

[0110] Los anticuerpos de la divulgación pueden modificarse con respecto a la función efectora, para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, las regiones constantes de la cadena pesada de anticuerpo pueden alterarse al isotipo IgG2a de ratón, IgG2b de ratón o IgG1 humano. El anticuerpo generado de este modo puede tener citotoxicidad celular (ADCC) o citotoxicidad mediada por complemento (CMC) mejoradas. En otra modificación, la fucosa puede suprimirse de la región Fc, o pueden introducirse restos de ácido siálico en la región Fc. El anticuerpo generado de este modo también puede tener actividad ADCC potenciada o actividad CMC potenciada. En otra modificación más, pueden introducirse resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular mediada por complemento aumentada y ADCC. Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales. Como alternativa, puede obtenerse técnicamente un anticuerpo que tenga regiones Fc modificadas o mixtas y puede por lo tanto tener lisis de complemento y capacidades de ADCC potenciadas.

[0111] El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o de cualquier isotipo. Cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en dAb, Fab, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv y CDR.

[0112] El anticuerpo o fragmento puede proporcionarse en una fase sólida tal como una perla, superficie o vaso de cultivo tisular.

[0113] El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar provisto de un marcador para detección de unión del anticuerpo o fragmento del mismo al receptor expresado en una célula viva.

[0114] Los anticuerpos y fragmentos pueden marcarse para su uso en la captura de imágenes médica. Dichos métodos implican unión química de un marcador o agente de captura de imágenes, tal como un radioisótopo, que incluyen ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹²Bi, administración del anticuerpo marcado o fragmento a un sujeto en un vehículo aceptable y captura de imágenes del anticuerpo marcado o fragmento *in vivo* en el sitio diana. Los anticuerpos radiomarcados o fragmentos de los mismos pueden ser particularmente útiles en captura de imágenes *in vivo* de cánceres descritos en el presente documento.

[0115] Los anticuerpos pueden purificarse por métodos conocidos por los expertos en la materia. Los métodos de purificación incluyen, entre otros, precipitación selectiva, cromatografía líquida, HPLC, electroforesis, cromatoenfoque y diversas técnicas de afinidad.

[0116] En algunos casos, los anticuerpos desvelados en el presente documento también pueden incluir formas multiméricas de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden tomar la forma de dímeros, trímeros o multímeros de mayor orden de anticuerpos de moléculas de inmunoglobulina monoméricas.

[0117] La reticulación de anticuerpos puede realizarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la reticulación de anticuerpos puede conseguirse mediante agregación natural de los anticuerpos, a través de técnicas de enlace químicas o recombinantes u otros métodos conocidos en este campo. Por ejemplo, las preparaciones de anticuerpo purificadas pueden formar espontáneamente agregados proteicos que contienen homodímeros de anticuerpo, y otros multímeros de anticuerpo de mayor orden. En un caso específico, la reticulación de anticuerpos usando un segundo anticuerpo para unirse con los anticuerpos de interés puede usarse para formar un homodímero. El anticuerpo reticulador puede derivar de un animal diferente comparado con el anticuerpo de interés. Por ejemplo, puede añadirse un anticuerpo de cabra anti ratón (específico de Fab) a un anticuerpo monoclonal de ratón para formar un homodímero. Este anticuerpo reticulador bivalente reconoce la región Fab o Fc de los dos anticuerpos de interés que forman un homodímero.

[0118] Como alternativa, pueden formarse homodímeros de anticuerpo mediante técnicas de enlace químico

conocidas en este campo. Los reticuladores químicos pueden ser homo o heterobifuncionales y se unirán covalentemente con dos anticuerpos que forman un homodímero. En algunos casos, es deseable que el reticulador químico no interactúe con la región de unión a antígeno del anticuerpo ya que esto puede afectar a la función del anticuerpo. Como se apreciará por los expertos en la materia, los anticuerpos pueden reticularse en la región Fab.

5

[0119] En otro aspecto más de la divulgación se proporciona un complejo inmunitario formado a partir de la unión de un anticuerpo o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente con un receptor P2X₇, expresado en una célula viva. El receptor puede ser funcional o no funcional.

10 **[0120]** En otro caso se proporciona un complejo inmunitario formado a partir de la unión de un anticuerpo o fragmento del mismo con un péptido descrito anteriormente.

[0121] Los complejos inmunitarios de la divulgación, incluyendo los que incluyen un epítipo o péptido de la divulgación son particularmente importantes ya que la detección de *in vitro* o *in vivo* es indicativa de la presencia de, 15 o predisposición a, una enfermedad o afección incluyendo preneoplasia y neoplasia.

[0122] Además, como se ha descrito anteriormente la detección de un complejo inmunitario formado a partir de la unión de un anticuerpo o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente con un receptor P2X₇ funcional en células vivas es un indicador importante de la idoneidad de un sujeto para tratamiento para una enfermedad o 20 afección caracterizada por expresión de receptor P2X₇ no funcional. Un porcentaje pequeño de la población normalmente expresa receptores P2X₇ en el estado no funcional en sus células hematopoyéticas tales como timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos y monocitos. Es importante por lo tanto ser capaz de identificar este fenotipo homocigoto para receptores no funcionales en sujetos que se han definido como en riesgo de, o que tienen, cáncer por ejemplo debido a la presencia de P2X₇ no funcional en otras células no hematopoyéticas.

25

[0123] También se cree que los sujetos que tienen un fenotipo de receptor P2X₇ no funcional heterocigoto se beneficiarán de la identificación de los complejos inmunitarios de la divulgación. Los tratamientos que se dirigen a receptores P2X₇ no funcionales pueden adaptarse y valorarse para tener en cuenta su fenotipo.

30 **[0124]** Estos métodos de detección se describen con más detalle posteriormente.

[0125] El anticuerpo o fragmento de anticuerpo incluido en el complejo inmunitario puede unirse a una fase sólida, tal como una perla o una placa, de modo que el complejo inmunitario se una a una fase sólida cuando se forme. Como alternativa, el receptor P2X₇, monómero o fragmento del mismo incluido en el complejo inmunitario puede 35 unirse a una fase sólida.

[0126] El anticuerpo puede marcarse para detección de formación del complejo inmunitario.

40 **[0127]** El complejo inmunitario puede incluir además un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como un anticuerpo de captura para captura del complejo inmunitario. El anticuerpo adicional o fragmento del mismo puede unirse con el anticuerpo anti receptor P2X₇. Además, el anticuerpo adicional o fragmento del mismo puede unirse con el receptor o fragmento del mismo.

45 **[0128]** El anticuerpo adicional o fragmento del mismo puede unirse con una fase sólida tal como una fase descrita anteriormente.

[0129] El anticuerpo adicional puede marcarse para detección de formación del complejo inmunitario. Los ejemplos de marcadores incluyen fluoróforos, colorantes, isótopos, etc.

50 **[0130]** En casos adicionales se proporciona una composición que incluye un péptido o epítipo de la divulgación junto con un adyuvante u otra molécula para potenciar una respuesta inmunitaria al péptido. El adyuvante puede ser selectivo para potenciar una respuesta inmunitaria humoral o celular o para ambas. En ciertos casos estas composiciones son útiles para vacunación contra enfermedad relacionada con receptor P2X₇ no funcional.

55 **[0131]** En otros casos se proporciona una composición que incluye un anticuerpo de la divulgación junto con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico. Estas composiciones son útiles para administración sistémica de anticuerpos para tratamiento de cáncer u otra enfermedad relacionada con receptor P2X₇ no funcional. En casos preferidos el anticuerpo es un anticuerpo de un único dominio.

60 **[0132]** En casos adicionales se proporciona un método de terapia, diagnóstico o supervisión de una enfermedad o afección caracterizada por la expresión de receptores P2X₇ no funcionales en células epiteliales, mesenquimales, germinales, neurales, pleurales o sanguíneas, comprendiendo el método administrar un anticuerpo a un individuo que requiere dicha terapia, diagnóstico o supervisión, siendo dicho anticuerpo uno que se une con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas pero no con receptores P2X₇ funcionales en células vivas. En una realización el

método incluye una primera etapa para usar un anticuerpo que se une con receptores P2X₇ funcionales en células vivas pero no con receptores P2X₇ no funcionales.

5 **[0133]** En ciertos casos se proporciona un uso de un anticuerpo como se describe en el presente documento para tratar a un individuo que tiene un cáncer. En otros casos se proporciona un uso de un anticuerpo como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratamiento de un individuo que tiene un cáncer. En otros casos se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer que incluye la etapa de poner en contacto un tejido de un individuo incluyendo cáncer con un anticuerpo para unión con un epítipo o péptido de la divulgación. El método puede operarse *in vivo* o *in vitro*.

10 **[0134]** Típicamente el cáncer es de origen epitelial (mama, próstata, intestino, pulmón, piel, cuello uterino, uterino, vaginal), mesenquimal, germinal, neural, pleural o sanguíneo.

15 **[0135]** El anticuerpo puede ser 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.

20 **[0136]** Se describen en detalle posteriormente la cantidad de dosificación, frecuencia de dosificación, vías de administración, etc.

25 **[0137]** En otro caso se proporciona una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno para unión con un epítipo o péptido de la divulgación o dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado que incluye el sitio de unión a antígeno y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 **[0138]** Los expertos en la materia conocen bien, o pueden determinar fácilmente, métodos para preparar y administrar anticuerpos a un sujeto que lo necesite. La vía de administración puede ser, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal), mediante inhalación o tópica. Una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo, que comprende un tampón (por ejemplo tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo albúmina humana). En otros métodos los anticuerpos pueden suministrarse directamente al sitio de enfermedad aumentando de este modo la exposición de la célula o el tejido enfermo al anticuerpo.

35 **[0139]** Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas (los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado) o no acuosas (son disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o
40 solución salina 0,8 %. Otros vehículos parenterales comunes 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, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

45 **[0140]** 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 cuyos 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
50 fabricación y almacenamiento y preferentemente estará conservada 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 el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de
55 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., 16^a ed. (1980).

60 **[0141]** Puede conseguirse prevención de la acción de microorganismos mediante 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. Puede producirse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0142] En cualquier caso, pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (por ejemplo, sitio de unión al 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 filtrada. En general, se prepararan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que
5 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, que produce un polvo de un principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución esterilizada por filtración previamente del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se cargan en recipientes tales como ampollas, bolsas, frascos, jeringas o viales, y se
10 sellan en condiciones asépticas según 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 indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos.

[0143] Las dosis eficaces de las composiciones de la presente divulgación, para 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, otros medicamentos administrados 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
15 dosificaciones de tratamiento pueden valorarse usando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la materia para optimizar la seguridad y eficacia.

[0144] Para el tratamiento de ciertos trastornos con un anticuerpo, 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
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 las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la divulgación. Se puede administrar a los sujetos dichas dosis diariamente, en días alternos, semanales o de acuerdo con otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento
30 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
35 simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada sitio de unión a antígeno administrada queda dentro de los intervalos indicados.

[0145] El anticuerpo para unión con el epítipo o péptido de la divulgación puede administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los
40 intervalos también pueden ser irregulares como se indica por la medición de los niveles en sangre del polipéptido diana o molécula diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de polipéptido en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Como alternativa, el anticuerpo puede 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 anticuerpo en el
45 paciente. La semivida de un anticuerpo también puede prolongarse mediante fusión con un polipéptido o resto estable, por ejemplo, albúmina o PEG. En general, los anticuerpos humanizados muestran la mayor semivida, seguidos de anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. En un caso, el anticuerpo puede administrarse en forma no conjugada. En otro caso el anticuerpo puede administrarse múltiples veces en forma conjugada.

[0146] La dosificación y frecuencia de administración puede 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 ya no tiene la patología o que está en un estado prepatológico para potenciar la
50 resistencia del paciente. Se define que dicha cantidad es una "dosis profiláctica eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero generalmente varían de
55 0,1 y 25 mg por dosis, especialmente de 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 tratamiento durante el resto de sus vidas.

[0147] En aplicaciones terapéuticas, se requiere en ocasiones una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de
60 aproximadamente 1 a 400 mg/kg de molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo por dosis, usándose más habitualmente dosificaciones de 5 a 25 mg para radioinmunoconjugados y mayores dosis para moléculas conjugadas de citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad.

[0148] Pueden administrarse agentes terapéuticos por medio parenteral, tópico, intravenoso, oral, subcutáneo, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado células con receptor P2X₇ no funcional, por ejemplo inyección intracraneal. Para administración de anticuerpo se prefiere
5 inyección intramuscular o infusión intravenosa.

[0149] Un anticuerpo puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o la afección que necesite tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico).

10 **[0150]** En otro caso se proporciona 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.

[0151] En otros casos se proporciona un kit para uso en una aplicación terapéutica mencionada anteriormente,
15 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;
20
- una etiqueta o prospecto con instrucciones para su uso.

[0152] En ciertos casos 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 cáncer descrita anteriormente.
25

[0153] 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 terapéutica que es eficaz para el tratamiento de 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 tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indica que la composición terapéutica se usa para tratar la afección elegida. En un caso, la etiqueta o el prospecto incluye instrucciones para su uso e indica que la composición terapéutica puede usarse para tratar un cáncer o para prevenir una complicación que surja del cáncer.
30

[0154] 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 en este caso de la divulgación puede comprender además un prospecto que indica que el y otro principio activo pueden usarse para tratar un trastorno o prevenir una complicación que surja 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.
35

[0155] En ciertos casos se proporciona un uso de un anticuerpo como se ha descrito anteriormente para determinar si un individuo tiene cáncer. En otros casos se proporciona un uso de un anticuerpo como se describe en el presente documento en la fabricación de medios para determinar si un individuo tiene cáncer. En otros casos, se proporciona un método para determinar si un individuo tiene cáncer que incluye la etapa de poner en contacto un tejido de un individuo para el que va a determinarse el cáncer con un anticuerpo de acuerdo con la divulgación en condiciones para formar un complejo inmunitario de acuerdo con la divulgación y determinar si el complejo inmunitario se ha formado, por lo que la formación de un complejo inmunitario determina que el individuo tiene cáncer. El método puede operarse *in vivo* o *in vitro*.
40

[0156] En un caso, el anticuerpo está 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 ha descrito anteriormente y detección de la unión del reactivo con los tejidos o células.
55

[0157] Para el diagnóstico *in situ*, el sitio de unión a antígeno o cualquiera parte activa y funcional del mismo puede administrarse al organismo para diagnosticarse por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, de modo que pueda producirse una unión específica entre un sitio de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación 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.
60

[0158] Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico de acuerdo con la divulgación y como se describen en el presente documento típicamente se basan en antígenos marcados, anticuerpos o reactivos secundarios para la detección. Estas proteínas o reactivos pueden marcarse con compuestos generalmente conocidos 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 se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren 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 de afinidad purificada.

[0159] Como alternativa, el anticuerpo puede marcarse indirectamente por reacción con sustancias marcadas que tengan una afinidad por inmunoglobulina, tal como proteína A o G o anticuerpos secundarios. El anticuerpo 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 anticuerpo puede conjugarse con biotina y el conjugado de biotina-sitio de unión a antígeno detectarse usando avidina o estreptavidina marcada. De forma similar, el anticuerpo puede conjugarse con un hapteno y el conjugado de anticuerpo-hapteno detectarse usando anticuerpo anti hapteno marcado.

[0160] Los inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en el que el anticuerpo se marca indirectamente por reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con un marcador detectable. El segundo anticuerpo es preferentemente uno que se une con anticuerpos del animal del que deriva el anticuerpo. En otras palabras, si el anticuerpo es un anticuerpo de ratón, entonces el anticuerpo secundario, marcado, es un anticuerpo anti ratón. Para usar el anticuerpo en el ensayo descrito en el presente documento, este marcador es preferentemente una perla recubierta con anticuerpo, particularmente una perla magnética. Para emplear el sitio de unión a antígeno en el inmunoensayo descrito en el presente documento, el marcador es preferentemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

[0161] Un sistema de anticuerpo doble alternativo, con frecuencia denominado sistemas de formato rápido porque se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito, también puede emplearse dentro del alcance de la presente divulgación. El sistema requiere alta afinidad entre el sitio de unión a antígeno y el analito. De acuerdo con un caso 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 proteína de receptor P2X₇. Uno de dichos pares de sitios de unión a antígeno se denomina en el presente documento "sitio de unión a 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 de la presente divulgación 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 de la presente divulgación también puede usarse como sitio de unión tanto de captura como detector, juntos en un único ensayo. Un caso de la presente divulgación usa por lo tanto el método de tipo sándwich de sitio de unión a antígeno doble para detectar 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 tanto la presencia del analito.

[0162] Las sustancias en 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. Los expertos en la materia también conocen bien métodos para acoplar sitios de unión a antígeno a fases sólidas. Más recientemente, se han empleado como soportes sólidos varios materiales porosos tales como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

[0163] En otro caso se proporciona una composición de diagnóstico 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.

[0164] Se prefiere que el anticuerpo para emplear en una composición de diagnóstico se marque de forma detectable. Está disponible una diversidad de técnicas para marcar biomoléculas, se conocen bien por los expertos en la materia y se considera que están dentro del alcance de la presente divulgación. Existen muchos marcajes y métodos de marcaje diferentes conocidos por los expertos habituales en la materia. Los ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse en la presente divulgación incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes.

[0165] Los marcadores usados habitualmente comprenden, entre otros, fluorocromos (como fluoresceína, rodamina, Texas Red, etc.), enzimas (como peroxidasa de rábano rústico, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina), isótopos radiactivos (como ^{32}P o ^{125}I), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos químicos o bioluminiscentes (como dioxetanos, luminol o acridinios). Se conocen bien en la técnica procedimientos de marcaje, como acoplamiento covalente de enzimas o grupos de biotilo, yodaciones, fosforilaciones, biotilaciones, etc.

[0166] Los métodos de detección comprenden, pero sin limitación, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas, etc. Los ensayos de detección habitualmente usados comprenden métodos radioisotópicos o no radioisotópicos. Estos comprenden, entre otros, Transferencia de Western, ensayos de superposición, RIA (Radioinmunoensayo) e IRMA (Inmunoensayo radioinmunométrico), EIA (Inmunoensayo Enzimático), ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas), FIA (Inmunoensayo Fluorescente) y CLIA (Inmunoensayo quimioluminiscente).

[0167] En otro caso se proporciona 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.

[0168] En otros casos se proporciona un kit para uso en una aplicación de diagnóstico mencionada anteriormente, incluyendo el kit:

- un anticuerpo de acuerdo con la divulgación y opcionalmente:
- un péptido de acuerdo con la divulgación;
- una etiqueta o un prospecto con instrucciones para su uso.

[0169] El kit o "artículo de fabricación" pueden 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 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 un caso, la etiqueta o el prospecto incluye instrucciones para su uso e indica que la composición de diagnóstico puede usarse para detectar un cáncer.

[0170] El kit puede comprender (a) una composición de diagnóstico; y (b) un segundo recipiente con un segundo agente de diagnóstico o segundo marcador contenido en el mismo. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, etc.

Ejemplo 1. Determinación de un modelo tridimensional de receptor P2X₇ no funcional para identificar epítomos potenciales para unión al anticuerpo.

[0171] La estructura del monómero de P2X₇ se basó en la modelización realizada por Hansen *et al.* 1998 (Hansen, M. A, Barden, J. A, Balcar, V. J, Keay, K. A, Bennett, M. R 1997 Biochem Biophys Res. Commun. 236, 670-675. Structural motif and characteristics of the extracellular domain of P2X receptors). En la que se determinó la homología estructural entre subtipos de P2X. Se obtuvo homología estructural adicional con la estructura de Ser transferasa en la base de datos de PDB como se aplicó al mayor de los dos dominios extracelulares identificados en Hansen mencionado anteriormente.

[0172] Este modelo se convirtió en la base para la identificación de los restos cruciales para la unión con ATP. Estos restos identificados se alteraron a Ala usando mutagénesis dirigida y los receptores mutados se expresaron en células HEK con el fin de medir la función del canal/poro P2X₇.

[0173] Los restos críticos que se descubrió individualmente que eran responsables de la pérdida de función debido a la incapacidad de ATP para unirse con el receptor expresado se mapearon después en diferentes lados del modelo del dominio extracelular grande. Como ejemplo, Arg 307 y Lys 311 (de SEQ ID NO: 1) estaban en un lado del ECD mientras que Lys193, Arg 294, His 201 y Phe 275 (de SEQ ID NO: 1) estaban en el otro lado del ECD a una distancia de aproximadamente 30 Angstrom.

[0174] Este hallazgo sugirió que el ensamblaje de monómeros requería asociación estrecha en tres dimensiones entre los diferentes grupos de aminoácidos esenciales. La modelización de un trímero en el que los restos estaban cerca en espacio conformacional dio como resultado un modelo en el que se sugirieron dianas epitópicas en monómeros adyacentes. Los inventores habían observado que la región de 200 a 216 de SEQ ID NO: 1 (en el presente documento E200) está expuesta en P2X₇ no funcional ya que solamente los receptores no funcionales

podrían unirse con un anticuerpo inducido contra E200. Los inventores también observaron que la región de 297 a 313 de SEQ ID NO: 1 (en el presente documento E300) está expuesta en P2X₇ no funcional ya que solamente los receptores no funcionales pueden unirse con un anticuerpo inducido contra E300. De acuerdo con el modelo de los inventores, estos epítomos son adyacentes en espacio conformacional en el modelo trimérico ensamblado.

5

[0175] Para ensayar la precisión del modelo del receptor ensamblado, aunque desconocido por difracción de rayos X del análisis de RMN, se ideó un modelo de la interfaz que consiste en restos expuestos capaces de unirse con un anticuerpo específico para la forma no funcional del receptor. Se seleccionaron elementos de las regiones E200 y E300 presentes en caras monoméricas adyacentes y se separaron de acuerdo con el modelo, siendo esta separación idealmente de 10 Angstrom. La orientación y separación de la interfaz propuesta accesible en receptores no funcionales fue la base para la construcción de la diana peptídica compuesta descrita posteriormente.

[0176] Solamente se produce presentación de la región E200 cuando el resto Pro210 (de SEQ ID NO: 1) está en *cis*. El bloqueo de este resto en *trans* da como resultado anticuerpos incapaces de unirse con el receptor ya que la región E200 no está expuesta. El bloqueo de Pro 210 en *trans* es coherente con la estructura que pertenece a receptores funcionales. Los receptores funcionales tienen una conformación única (individual). Todos los restos expuestos en la superficie de restos funcionales son capaces de contribuir a epítomos que se evitan idealmente si van a inducir anticuerpos específicos para unirse con receptores no funcionales para aplicaciones que incluyen dirección terapéutica de receptores no funcionales que no reaccionan de forma cruzada con receptores funcionales. Cuando Pro 210 está en *trans* entonces los restos en la región E200 están escondidos del anticuerpo de unión mediante la formación correcta del sitio de unión a ATP formado por el empaquetamiento correcto de los monómeros P2X₇. Solamente en *cis* están expuestos estos restos a los anticuerpos selectivos capaces de diferenciar entre trímeros funcionales y no funcionales. Los anticuerpos desarrollados contra los trímeros no funcionales que se dirigen a la interfaz monomérica y se unen a restos en ambas caras opuestas pueden describirse como agentes de unión específicos de trímero, ya que la unión con los monómeros se reduce aproximadamente 50 veces.

Ejemplo 2 Diseño de péptidos

[0177] La selección específica del péptido compuesto que forma una interfaz accesible entre monómeros en los receptores P2X₇ no funcionales implicó reducir las longitudes en cada una de las regiones E200 y E300 para seleccionar con respecto a anticuerpos capaces de formar uniones entre monómeros sobre los seleccionados para unión con una cara del monómero o la otra, es decir E200 o E300. Por esta razón la región E200 se redujo en longitud de 200-216 a 200-211 (de SEQ ID NO: 1), una región aún capaz de unir simultáneamente con dos anticuerpos, y la región E300 se redujo adicionalmente de 297-313 a 296-306 (de SEQ ID NO: 1) para favorecer anticuerpos que unen E200 y E300 en lugar de unirse solamente con E200 o E300. La presencia de los restos 211 y 296 (de SEQ ID NO: 1) se diseñó para complementar los restos AG también añadidos para separación requerida para separar apropiadamente las regiones en el espacio conformacional. La reducción en longitudes individuales de las regiones E200 y E300 combinada con la separación apropiada, como se deduce a partir del modelo de orientación, el resultado de 10 años de trabajo, evitó la formación de anticuerpos que probablemente abarcarían restos separados con demasiada amplitud en el receptor, lo que conduce a distorsión y pérdida de afinidad proporcionada.

[0178] Se preparó un péptido compuesto en forma de una secuencia de GHNYTTRNILPGAGAKYYKENVK por síntesis de fase sólida de acuerdo con técnicas convencionales y se conjugó usando un enlazador de maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS).

Ejemplo 3 Generación de anticuerpos monoclonales

50 3.1 Metodología

[0179] Los ratones se inocularon con diversos péptidos compuestos como se ha descrito anteriormente en forma de conjugado de 200/300 péptidos con toxoide diftérico. Un péptido tuvo la secuencia: GHNYTTRNILPGAGAKYYKENVK. Antes del refuerzo final, los animales se exploraron con respecto a actividad y los mejores animales se reforzaron y después se sacrificaron y se les retiró el bazo. Se aislaron células del bazo y se fusionaron con la línea celular compañera de fusión Sp2/0 a una relación de no menos de 1: 2 y no más de 1:5 dependiendo del formato usado. Las células del bazo restantes se cultivaron en medio durante 3 días y el sobrenadante se mantuvo para su uso como un control positivo en el sistema de ensayo.

[0180] Fusión 1 - Compuesto E200/E300, usando placas de 96 pocillos, 1 placa con capas alimentadoras de macrófagos, otras 4 con medio acondicionado solamente.

[0181] Las placas de macrófagos se numeraron 5 y 10.

Procedimiento de hibridación

[0182]

- 5 1. Preparar un tubo de fusión de 1 hasta 50 ml con EBSS, centrifugar a 600 rpm durante 8 min.
2. Retirar el sobrenadante del tubo 1, +10 ml de EBSS, mezclar, +15 ml de EBSS.
Tubo de fusión 2, etapa 1.
Centrifugar los tubos 1 y 2 a 600 rpm durante 8 min.
- 10 3. Tubo de fusión 2 como para la etapa 2, tubo de fusión 3 como para la etapa 1.
Centrifugar los tubos 2 y 3 a 600 rpm durante 8 min.
4. Tubo de fusión 1, retirar sobrenadante y golpear el tubo para desprender el sedimento.
Ajustar el temporizador a 8 min.
Añadir 0,8 ml de mezcla de PEG en una pipeta de 1 ml, verter en gotas durante 1 min, mezclando suavemente.
Transferir el tubo a baño de agua durante 1 min.
- 15 Añadir 1 ml de I no hepes en una pipeta de 1 ml, dejar caer en gotas durante 1 min, mezclando suavemente.
Añadir 20 ml de I no hepes, dejar caer en gotas de una pipeta de 10 ml, durante 5 min, mezclando suavemente.
5. Tubo 3 como para la etapa 2, después centrifugar los tubos 1 y 3 juntos.
6. Tubo 2 como en la etapa 4.
- 20 7. Tubo 1, retirar sobrenadante, añadir 10 ml de Isc (+FBSI 20 %) +/- HAT,
Resuspender, añadir otros 30 ml.
8. Centrifugar los tubos 1 y 2 juntos.
9. Tubo 3 como para la etapa 4.
10. Tubo 1, retirar sobrenadante, resuspender en 10 ml de Isc (+FBSI 20 %) + HAT y cargar 0,05 ml por pocillo para el formato de 24 pocillos o resuspender en 40 ml y cargar 0,1 ml por pocillo para el formato de 96 pocillos.
- 25 Cargar 0,05 ml por pocillo de las primeras ocho bandejas-24 pocillos, 0,1 ml por pocillo de las primeras 4 bandejas - 96 pocillos.
11. Tubo 2 como para la etapa 7, tubo 3 como para la etapa 4, continuar el proceso hasta que todos los tubos se han cargado en bandejas.

30 ELISAS

[0183] Se recubrió una placa de PVC (polivinil cloruro) con epítomos y se usó para capturar anticuerpos de sobrenadantes celulares. Los desconocidos se compararon con un control positivo y negativo conocido.

- 35 **[0184]** EP200/300 con proteína vehículo BSA unida se usó para recubrir placas de ELISA para ensayo.

Ensayo de sobrenadantes

[0185]

- 40
- A medida que los pocillos se hacen confluyentes, se retiró todo el medio excepto 0,05 ml a un tubo de muestra o placa.
- 45
- Se ensayó con respecto a producción de anticuerpos, se expandieron los positivos, se descartaron los negativos.
 - Los positivos se expandieron en matraces de 25 cm que contenían 2 ml de medio y se dejaron en vertical.
- 50
- Se expandió a matraces de 4 ml, 2x4 ml, 2x75 cm (12 ml). Se expandió el volumen a 30 ml/matraz. Las reservas se congelaron cuando fueron confluyentes.
 - Se volvieron a ensayar los sobrenadantes al congelar.

Protocolo convencional usado durante todos los ensayos de ELISA

55 **[0186]**

- Epítomos aplicados a una concentración de 1 µg/ml, diluidos en PBS, 50 µl/pocillo - agitador a TA durante una noche.
- 60
- Los pocillos se aclararon con PBS (Sin Ca/Mg)
 - Los pocillos se bloquearon durante 1 h con Ovoalbúmina 0,1 % en PBS, 200 µl/pocillo
 - Se aclaró con PBS

- Los sobrenadantes para explorar (por duplicado), 50 µl/pocillo - agitador durante 2 horas a TA
- Aclarar con PBS 3x
- 5 • HRP de Conejo anti Ratón, 1/1000 en bloque, 50 µl/pocillo - agitador durante 1,5 horas a TA
- Aclarar con PBS 4x
- Sustrato Sigma ABTS (2,2'-azino-bis(sal de diamonio de ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) a 1,1 mg/ml en Citrato 0,05 M + 2 µl de Peróxido de Hidrógeno/10 ml para Activar - preparado nuevo.
- 10 • Añadir ABTS a pocillos durante 30 minutos, 100 µl/pocillo, detener con 25 µl/pocillo de ácido oxálico 5 %
- Leer a longitud de onda de ensayo 405/Referencia 490 nm
- 15

3.2 Resultados

[0187] El rendimiento fue muy bajo en todas las placas excepto las que contenían macrófagos. Tres ciclos de exploración de ELISA identificaron 37 clones que secretaban una especificidad contra al péptido compuesto. Muchos de estos clones murieron o pararon de secretar. Los que sobrevivieron se expandieron y se congelaron a 5 ampollas. La serología, incluyendo reactividad cruzada con E200 y E300, se determinó en el siguiente Ejemplo.

Ejemplo 4 Caracterización serológica de anticuerpos

25 **[0188]** Los anticuerpos inducidos contra el péptido compuesto se exploraron frente a péptidos que tenían la secuencia de las regiones E200 o E300. Aunque eran capaces de unirse con esas dianas, se identificó que los anticuerpos tenían unión preferida con el péptido compuesto.

4.1 Ensayo con respecto a reactividad cruzada

30

[0189] Los anticuerpos generados a partir del Ejemplo 3 se exploraron usando ELISA como se ha descrito anteriormente frente al péptido compuesto (COMP), U140 (un péptido que tiene una secuencia de un epítipo que se encuentra en receptores tanto funcionales como no funcionales), 200 (un péptido que tiene la secuencia de la región E200), 300 (un péptido que tiene la secuencia de la región E300) y U80 (un péptido que tiene una secuencia de un epítipo que se encuentra en receptores tanto funcionales como no funcionales). Los resultados se muestran en la siguiente tabla y en la Figura 9.

35

[0190] La reactividad cruzada de U80 se debe probablemente a marcador de DT ya que los animales se inmunizaron con marcador DT y U80 usado en ELISA tenía marcador DT.

40

20 min	sobn T/C	BSA	COMP	U140	200	300	U80
	2A11	0,125	3,625	0,17	0,508	0,194	0,186
	2F6	0,236	1,332	1,615	1,612	1,402	1,411
	3D6	0,326	1,293	1,563	1,427	1,037	1,109
	4F5	0,122	3,265	0,141	0,139	0,124	0,139
	5C5	0,12	0,163	0,155	0,162	0,145	0,146
	5C8	0,155	0,256	0,315	0,304	0,214	0,244
	5D5	0,122	0,814	0,136	0,132	0,137	0,126
	5F3	0,125	3,531	0,165	0,157	0,175	0,146
	5F5	0,292	1,013	1,155	1,215	0,832	0,903
	Isc	0,126	0,144	0,142	0,164	0,128	0,179
	Comp positivo	0,163	3,607	3,62	3,59	2,501	2,916
						2,707	3,597
							3,565

MEDIAS	BSA	Comp	U140	200	300	U80	
2A11	0,131	1,881	3,614	1,886	0,339	0,323	
2F6	0,248	0,796	1,328	1,469	1,614	1,492	
3D6	0,331	0,814	1,256	1,391	1,495	1,221	
4F5	0,122	1,693	3,384	1,822	0,140	0,133	
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Comp	5C5	0,121	0,143	0,165	0,161	0,159	0,151
	5C8	0,156	0,207	0,263	0,293	0,310	0,269
	5D5	0,122	0,468	0,808	0,469	0,134	0,133
	5F3	0,124	1,827	3,551	1,868	0,161	0,148
	5F5	0,288	0,648	1,027	1,098	1,185	1,073
	Isc	0,124	0,133	0,129	0,128	0,153	0,147
	Comp positivo	0,164	1,886	3,610	3,617	3,605	3,134

Ejemplo 5 Unión de anticuerpo monoclonal 2F6 con P2X₇ no funcional en células tumorales vivas

5 **[0191]** Los anticuerpos purificados de la invención se analizaron con respecto a unión con líneas celulares tumorales humanas que expresaban el P2X₇ no funcional y células hematopoyéticas humanas que expresaban el P2X₇ funcional mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). La Tabla 6 resume la unión de un anticuerpo monoclonal (MAb) 2F6 con estas células. El análisis de FACS demostró la unión de MAb 2F6 con la línea celular de tumor de próstata PC3, con una intensidad de fluorescencia media (IFM) de 334,62 en comparación con una IFM de 27,87 para el anticuerpo de control negativo. La unión de MAb 2F6 con la línea celular de tumor de mama MCF-7, también se observó, aunque más débil (IFM de 160,3 y 50,4 para 2F6 y control de 3D6, respectivamente). Sin embargo, prácticamente no se detectó ninguna unión con los linfocitos humanos ensayados (Tabla 6). La Figura 8 ilustra resultados de experimentos de análisis de FACS posteriores y de forma similar demuestra la unión de MAb 2F6 con la línea celular de tumor de próstata PC3 y la línea celular de tumor de mama MCF-7, pero no con la muestra de linfocitos humanos.

Tabla 6: análisis de FACS de la unión de MAb 2F6 con líneas celulares tumorales y linfocitos humanos

MAb	Línea Celular de Tumor de Próstata PC3		Línea Celular de Tumor de Mama MCF-7		Linfocitos Humanos	
	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)	Porcentaje de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)	Porcentaje de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)	Porcentaje de Células Positivas
Control Negativo de IgM (3D6)	27,87	1	50,40	0	17,68	0
Control Positivo de HLA (W6/32)	NT*	NT	1667,92	87	3897,33	100
2F6	334,62	47	160,30	5	22,34	1

* No ensayado

LISTADO DE SECUENCIAS

20

[0192]

<110> Biosceptre International Limited

25

<120> Péptido y epítotos anti P2X₇

<130> 81588191 TP_G
 <150> AU 2008903451
 <151> 04-07-2008

5 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 595

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

15

```

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

ES 2 610 225 T3

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

ES 2 610 225 T3

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> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu
 1 5

10

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

20

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 4

Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu

1

5

10

5 <210> 5
<211> 209
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 5

ES 2 610 225 T3

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
 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

- <210> 6
- <211> 49
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 6

ES 2 610 225 T3

Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala
1 5 10 15

Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val
20 25 30

Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe
35 40 45

Asp

5 <210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 7

Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val
1 5 10 15

10 Phe

15 <210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 8

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

20 <210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
25 <400> 9

Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys
1 5 10

30 <210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
35 <400> 10

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

ES 2 610 225 T3

Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un péptido definido por la fórmula: (A)(X_n)(B), en la que:
 - 5 - (A) es una secuencia de aminoácidos de GHNYTTRNILP (SEQ ID NO: 8);
 - (X_n) es un enlazador de 10 a 40 angstrom de longitud, consistiendo dicho enlazador en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados de glicina, alanina, leucina, serina, valina y treonina;
 - (B) es una secuencia de aminoácidos de AKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 9).
- 10 2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye una región variable que incluye VH y VL y que contiene un único sitio de unión a antígeno que se une tanto con (A) como con (B) de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el fragmento de anticuerpo está en la forma
15 seleccionada del grupo que consiste en Fab, Fd, Fv, F(ab')₂ y scFv.
4. El anticuerpo de la reivindicación 2 ó 3, en el que el anticuerpo está en forma de un dímero, trímero u otro multímero de mayor orden de moléculas de inmunoglobulina monoméricas.
- 20 5. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para uso en un método para determinar si un individuo tiene un cáncer.
6. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para uso en el tratamiento del cáncer en un individuo.

25

Figura 1:

1 MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFS Y VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61 VHTKVKGIAE VKKEIVENG V KKLVHSVFD T ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLCP
121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD
241 NFSDVAIQGG IMGIEIWDC NLDRWFHHC R PKYSFRRLDD KTTNVSLYPG YNFRYAKYYK
301 ENNVEKRTL I KVFGRFDIL VFGTGKFDI IQLVVYIGST LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS
361 NCCRSHIYPW CKCCQPCVN EYYRKKCES IVEPKPTLKY VSFVDESHIR MVNQQLGRS
421 LQDVKGQEV P RPAMDFTDLS RLPLALHDT P PIPGQPEEQ LLRKEATPRS RDSPWCQCG
481 SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKP GACITTS ELFRKLVLSR HVLQFLLLYQ EPLLALDVDS
541 TNSRLRHCA Y RYATWRFGS QDMADFAIL P SCCRWRIRKE FPKSEGQYSG FKSPY

(SEQ ID NO: 1)

Figura 2:

HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 2)

Figura 3:

GHNYTTRNIL (SEQ ID NO: 3)

Figura 4:

DFPGHNYTTRNIL (SEQ ID NO:4)

Figura 5:

1 MPACCCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFSY VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61 VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKL VHSVFD T ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLCP
121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCWHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNIL

(SEQ ID NO:5)

Figura 6:

KTTNVS LYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTLKIVFGIRFDILVFGTGGKFD

(SEQ ID NO: 6)

Figura 7:

KYYKENNVEKRTLKIVF

(SEQ ID NO: 7)

Figura 7a:

GHNYTTRNILP

(SEQ ID NO: 8)

Figura 7b:

AKYYKENNVEK

(SEQ ID NO: 9)

Figura 7c:

GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK

(SEQ ID NO: 10).

Figura 8a: Unión de MAb 2F6 con células PC3 por análisis de FACS

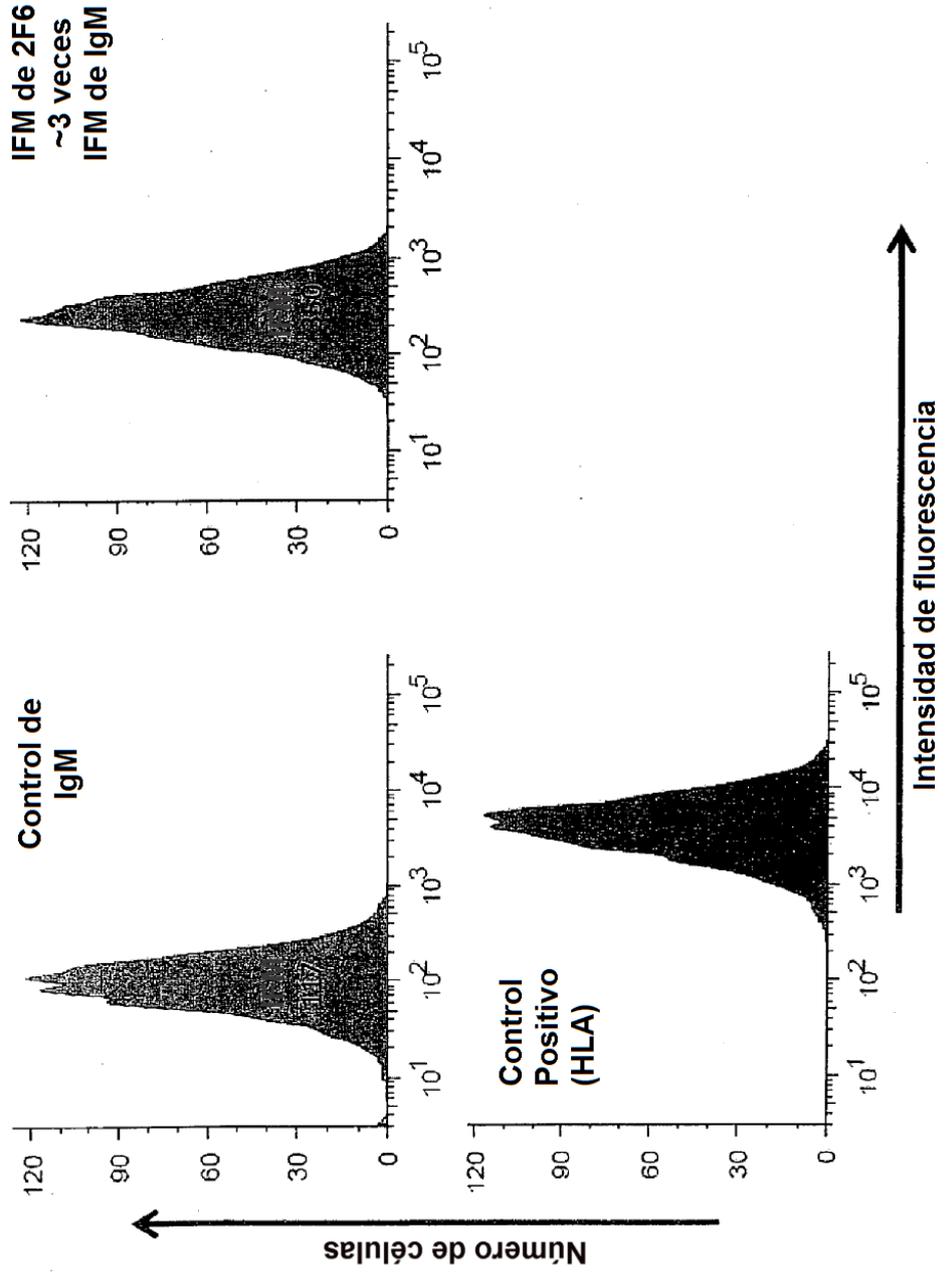


Figura 8b: Unión de MAb 2F6 con células MCF7 por análisis de FACS

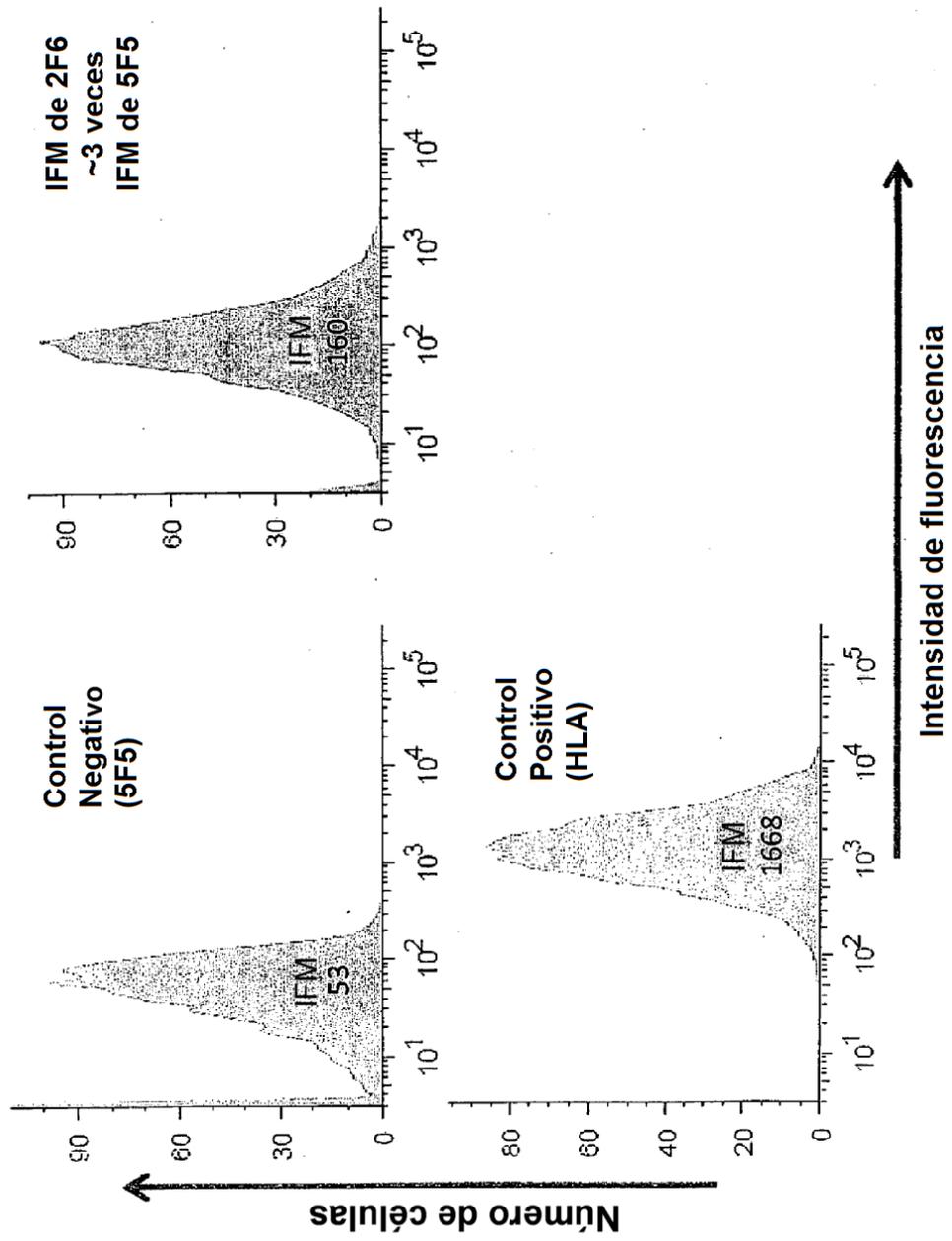
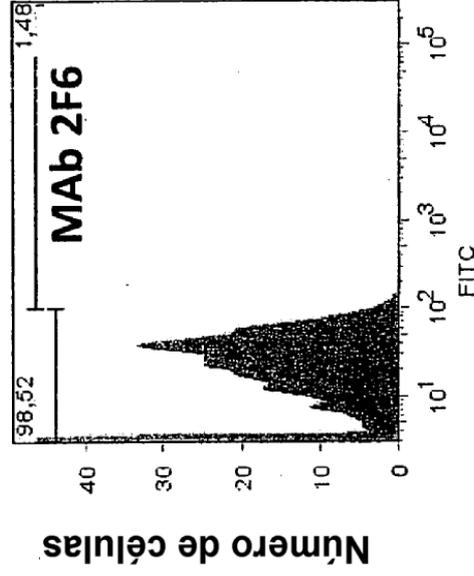
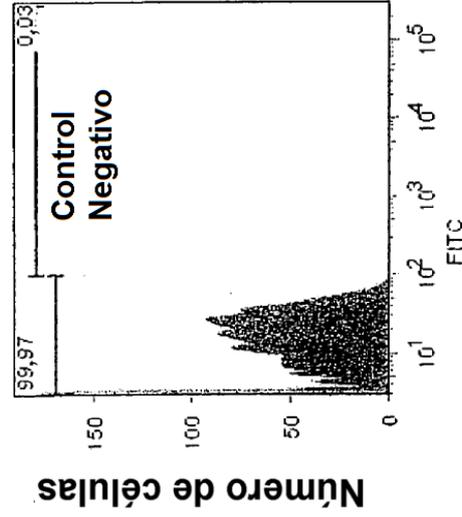


Figura 8c: Ausencia de unión de MAb 2F6 con P2X7 funcional en linfocitos humanos por análisis de FACS



linfocitos de sangre_2F6.fcs
recuento 2021
singletes



linfocitos de sangre_control de ratón.fcs
recuento 7907
singletes



Intensidad de fluorescencia

Figura 9

