

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 003**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2010 PCT/AU2010/001741**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11075789**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010 E 10838429 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2516470**

54 Título: **Anticuerpos para receptores P2X7 oligoméricos no funcionales**

30 Prioridad:

24.12.2009 AU 2009906286

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BARDEN, JULIAN ALEXANDER;
GIDLEY-BAIRD, ANGUS y
PILKINGTON, GLENN RONALD**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 667 003 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para receptores P2X7 oligoméricos no funcionales

5 Campo de la divulgación

La divulgación se refiere a receptores purinérgicos, a anticuerpos y fragmentos relacionados de los mismos para unión con dichos receptores, a la producción de dichos anticuerpos y fragmentos y al uso de dichos anticuerpos y fragmentos para detección y terapia de cáncer.

10

Antecedentes

La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es, y no debería tomarse como, un reconocimiento o ninguna forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o cualquier otra jurisdicción o de que pueda esperarse razonablemente que esta técnica anterior sea determinada, entendida y considerada como relevante por una persona experta en la materia.

15

Los receptores purinérgicos (P2X) son canales selectivos de cationes abiertos por ATP. Cada receptor está compuesto por 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.

20

Los receptores P2X₇ son particularmente interesantes ya que se entiende que la expresión de estos receptores está limitada a células que tienen potencial para 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.

25

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) y que está desprovisto de función de unión a ATP en células que se entiende que son incapaces de experimentar muerte celular programada, tales como células preneoplásicas y células neoplásicas. Esta isoforma del receptor se ha denominado receptor "no funcional".

30

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. Por consiguiente, estos anticuerpos son útiles para detectar selectivamente muchas formas de carcinoma y cánceres hemopoyéticos y para el tratamiento de algunas de estas afecciones.

35

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 WO 2008/043145 enseña la producción de Ab anti receptor P2X₇ que se ha inducido en ratones inmunizados con el péptido que consiste en los restos 200-216. Hasta la fecha ha sido muy difícil obtener reactivos serológicos que se unan con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas con afinidad deseable. Son en general deseables reactivos de mayor afinidad en aplicaciones para la detección y el tratamiento del cáncer.

40

Existe la necesidad de reactivos mejorados para unión con receptores P2X₇, particularmente para nuevos anticuerpos y fragmentos de los mismos que son capaces de diferenciar entre receptores P2X₇ que se unen a ATP y que no se unen a ATP en células vivas. También existe la necesidad de anticuerpos y fragmentos de los mismos que muestran unión preferente con un receptor P2X₇ como se expresa en células vivas con capacidad reducida para unirse con un receptor P2X₇ una vez que la célula diana ha muerto.

45

50 Sumario

La invención se define por las reivindicaciones. Esos aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

55 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **1**:

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

60 en la que:

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

65 en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: (con carga/polar/aromático) (con carga/aromático)XXX_Y(aromático/alifático)(con carga/neutro)(neutro/alifático).
X a lo largo de la memoria descriptiva representa cualquier aminoácido.

5 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 2:

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

10 en la que:

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

15 en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: N(Y/F)XXX_Y(Y/F)EX.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 3:

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

en la que:

25

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

en la que:

30

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: N(Y/F)(neutro)(con carga)(neutro)Y(Y/F)E(neutro).

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 4:

35

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

en la que:

40

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

en la que:

45

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: NFLESYFEA.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 5:

50

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

en la que:

55

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

en la que:

60

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: N(Y/F)(con carga)(neutro)(con carga)Y(Y/F)E(neutro).

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 6:

65

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

en la que:

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

5

en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: NYRGDYYET.

10 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 7:

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

15 en la que:

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

20 en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: H(aromático)XXXYYNI.

25 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 8:

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

en la que:

30

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

en la que:

35

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: H(Y/F)(neutro)(con carga)(con carga)YYNI.

40 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 9:

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

en la que:

45

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

en la que:

50

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: H(Y/F)(neutro)(con carga)(neutro)YYNI.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general 10:

55

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

en la que:

60

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

en la que:

65

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: HYSKEYYNI.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **11**:

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

5

en la que:

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

10

en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: HFQRGYYNI.

15 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **12**:

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

20 en la que:

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

25 en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: (Y/N)(aromático)XXXYY(con carga)(neutro).

30 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **13**:

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

en la que:

35

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

en la que:

40

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: (Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYDV.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **14**:

45

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

en la que:

50

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

en la que:

55

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: (Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYEV.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **15**:

60

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

en la que:

65

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

en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: YFPLVYYDV.

5 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **16**:

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

10 en la que:

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

15 en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: NYLPMYYEV.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **17**:

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

en la que:

25

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

en la que:

30

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: Y(con carga)XXXY(neutro)(neutro)(neutro).

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **18**:

35

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

en la que:

40

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

en la que:

45

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: YHVIQYLGP.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **19**:

50

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

en la que:

55

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

en la que:

60

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: HYSSRFFDV, NFKLMYYNV, NYRGDYYET, HFSRGGYDV, NFLESYFEA, NYLPMYYEV, HYIKVYYEA, HYSSRFFEY, NFRVMFFKA, HFQRGYYNI, HYSSRFFEY, YHVIQYLGP, HYSKEYYNI, YFPLVYYDV, DFTVVPFYNA, NYDKKYFDV, YFPLVYYDV.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **20**:

65

ES 2 667 003 T3

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

en la que:

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

en la que:

- 10 CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de KASQNVGTNVA.
CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **21**:

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

en la que:

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

en la que:

- 25 CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de SYYMS.
CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **22**:

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

en la que:

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

en la que:

- 40 CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de SASFRYS.
CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **23**:

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

en la que:

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

en la que:

- 55 CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de AINSNGGSTYYPDTVKG.
CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **24**:

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

en la que:

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

ES 2 667 003 T3

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

en la que:

- 5 CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de KASQNVGTNVA
CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de SASFRYS
CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de
10 unión a antígeno por fórmula general **25**:

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

en la que:

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

en la que:

- 20 CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de SYYSMS
CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de AINSNGGSTYYPDTVKG
CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3.

25 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno de acuerdo con cualquier caso descrito anteriormente en el
que FR1 es MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC o DVKLVESGGGLVKGSLKLSAASGFTFS.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno de acuerdo con cualquier caso descrito anteriormente en el
que FR2 es WYQQKPGQSPKALY o WVRQTPEKRLELVA.

30 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno de acuerdo con cualquier caso descrito anteriormente en el
que FR3 es GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFC o RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTR.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno de acuerdo con cualquier caso descrito anteriormente en el
35 que FR4 es FGSGTRLEIK o WGAGTTVTVSS.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de
unión a antígeno por fórmula general **26**:

40 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - enlazador - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a -
FR3a - CDR3a - FR4a

en la que:

- 45 FR1, FR2, FR3, FR4, FR1a, FR2a, FR3a y FR4a son cada una regiones marco conservadas;
CDR1, CDR2, CDR3, CDR1a, CDR2a, CDR3a son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en la que:

50 CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de KASQNVGTNVA CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de
SASFRYS

55 CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3 o
QQYNSYPFT.

CDR1a tiene una secuencia de aminoácidos de SYYSMS

CDR2a tiene una secuencia de aminoácidos de AINSNGGSTYYPDTVKG

60 CDR3a tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que describe una secuencia de CDR3 o
QQYNSYPFT (SEQ ID NO: 33) cuando CDR3 es una secuencia de aminoácidos de cualquier caso previo que
describe una secuencia de CDR3

65 FR1 tiene una secuencia de aminoácidos de MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC (SEQ ID NO: 25)

FR2 tiene una secuencia de aminoácidos de WYQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO: 26)

FR3 tiene una secuencia de aminoácidos de GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEFFC (SEQ ID NO: 27)

5 FR4 tiene una secuencia de aminoácidos de FGSGTRLEIK (SEQ ID NO: 28)

FR1a tiene una secuencia de aminoácidos de DVKLVESGGGLVKLGGSLKLSAASGFTFS (SEQ ID NO: 29)

10 FR2a tiene una secuencia de aminoácidos de WVRQTPEKRLELVA (SEQ ID NO: 30)

FR3a tiene una secuencia de aminoácidos de RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTR (SEQ ID NO: 31)

FR4a tiene una secuencia de aminoácidos de WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 32).

15 En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **27**:

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

20 en la que:

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

25 en la que:

CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de:

30 (con carga/polar/aromático)(aromático)(con carga/neutro)(con carga)(con carga/neutro)Y(aromático)(con carga)(neutro).

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **28**:

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

en la que:

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

en la que:

45 CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de:

(con carga/polar/aromático)(F/Y)(con carga/neutro)(R/K)(con carga/neutro)(Y)(Y/F)(E/D)V.

En un caso se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión con un receptor P2X₇, definiéndose el sitio de unión a antígeno por fórmula general **30**:

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

en la que:

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

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

en la que:

60 CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: (H/N)(F/Y)(S/D)(R/K)(G/K)Y(Y/F)DV.

En un caso el enlazador de fórmula general 26 tiene una secuencia de aminoácidos de 15 restos de aminoácidos. Típicamente, el enlazador comprende predominantemente restos de glicina y serina. Preferentemente, el enlazador
65 es GGGGSGGGGSGGGGS.

En un caso, el sitio de unión a antígeno de la divulgación tiene una secuencia de aminoácidos de CDR3 que comprende HFSRGYYDV o NYDKKYFDV.

5 En un caso, el sitio de unión a antígeno de la divulgación tiene una secuencia de aminoácidos de CDR3 que consiste en HFSRGYYDV o NYDKKYFDV.

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

10

En otro caso se proporciona un sitio de unión a antígeno como se describe en el presente documento en el que una secuencia de aminoácidos que forma una o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 es una secuencia humana.

15 En otro caso se proporciona un sitio de unión a antígeno como se describe en el presente documento en el que una secuencia de aminoácidos que forma una o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 es una secuencia canina o felina.

20 El sitio de unión a antígeno puede modificarse técnicamente para tener secuencias de un animal particular, por ejemplo puede ser quimérico (es decir que contiene algunas pero no todas las secuencias halladas en el individuo que recibe el anticuerpo). Como alternativa, puede consistir en secuencias alogénicas o singénicas. Un ejemplo de estas últimas es un anticuerpo de perro para su uso en el tratamiento de un perro.

25 El animal del que se obtiene el anticuerpo puede incluir un animal doméstico, de compañía o de granja, incluyendo perros, gatos, vacas, cerdos, caballos y ovejas.

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

30

En otro caso se proporciona un diacuerpo o triacuerpo que incluye un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia como se describe en el presente documento o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento.

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

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

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

45

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

50 En otro caso se proporciona un vector que incluye un ácido nucleico descrito en el presente documento.

En otro caso se proporciona una célula que incluye un vector o ácido nucleico descrito en el presente documento.

55 En otro caso se proporciona un animal o tejido obtenido del mismo que incluye una célula descrita en el presente documento.

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

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

En otro caso se proporciona un kit o artículo de fabricación que incluye un sitio de unión a antígeno o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en el presente documento.

5

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

10 En otro caso se proporciona un uso de un sitio de unión a antígeno o una secuencia de CDR y/o FR como se describe en el presente documento para producir un sitio de unión a antígeno anti receptor P2X₇ que tiene afinidad aumentada por el receptor P2X₇.

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

20 En otro caso se proporciona un método para producir un sitio de unión a antígeno anti P2X₇ como se describe en el presente documento que incluye expresar un ácido nucleico como se describe en el presente documento en una célula o un animal como se describe en el presente documento.

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

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

35 En otro caso se proporciona un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se describe en el presente documento para el tratamiento de cáncer o una afección o enfermedad asociada con expresión de receptor P2X₇ no funcional.

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

45

Típicamente los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación se unen con receptores P2X₇ no funcionales, especialmente receptores en los que Pro210 de P2X₇ está en conformación cis. En ciertos casos los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación no se unen con receptores P2X₇ funcionales, especialmente receptores en los que Pro210 de P2X₇ está en conformación trans.

50

Típicamente los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación se unen con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas. En algunos casos, los sitios de unión a antígeno no se unen o se unen con afinidad muy baja o indetectable con receptores no funcionales en células muertas o moribundas. Si un sitio de unión a antígeno de la divulgación se une o no con un receptor P2X₇ puede determinarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

55

60 En un caso, los sitios de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación se unen con receptores P2X₇ en células vivas con afinidades (K_D) en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 μM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de un IgM la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 1 nM, preferentemente de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 50 pM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de un IgG la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 1 nM, preferentemente de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 100 pM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de un Fab la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es de entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 100 nM, preferentemente de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 nM. Típicamente, cuando el sitio de unión

65

a antígeno es parte de un scFv la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es de entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 1 μM, preferentemente de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de un dab la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es de entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 10 μM, preferentemente de aproximadamente 100 nM a 5 aproximadamente 1 μM.

En ciertos casos, los sitios de unión a antígeno de las divulgaciones y moléculas que los comprenden son capaces de inducir apoptosis.

10 En ciertos casos, los sitios de unión a antígeno de la divulgación y moléculas que los comprenden son capaces de inducir activación de caspasa.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1. Receptor P2X₇ humana de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

Figura 2. Una secuencia de dominio extracelular del receptor P2X₇. El receptor P2X₇ (47-306) (SEQ ID NO: 2) (ECD2) es los aminoácidos 47 a 306 de SEQ ID NO: 1. Los aminoácidos tachados designan los aminoácidos que están suprimidos de la secuencia del receptor P2X₇ de longitud completa.

20 Figura 3. Una secuencia de dominio extracelular del receptor P2X₇. El receptor P2X₇ (47-332) (SEQ ID NO:3) (ECD1) es los aminoácidos 47 a 332 de SEQ ID NO: 1. Los aminoácidos tachados designan los aminoácidos que están suprimidos de la secuencia del receptor P2X₇ de longitud completa.

25 **Figura 4.** Estructura de vector de expresión para 2F6 V_H.

Figura 5. Estructura de vector de expresión para 2F6 V_L.

30 **Figura 6. (a)** secuencia de scFv 2F6 con marcador de His añadido para detección (SEQ ID NO: 4). La secuencia de scFv 2F6 mostrada tiene la siguiente estructura organizativa (en orden del extremo N al extremo C) FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - enlazador - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a - AAA - marcador epitópico Flag® (DYKDDDDK) - AAA - marcador His. (b) Purificación de IgG_{2a} 2F6 recombinante mediante HPLC de exclusión por tamaño. El IgG_{2a} recombinante se separó mediante HPLC y se muestra un cromatograma de HPLC ejemplar.

35 **Figura 7.** HP-SEC de purificación de mIgG_{2a} 2F6.

Figura 8. SDS PAGE que muestra la pureza del producto de anticuerpo final.

40 **Figura 9. (a)** Ensayos de inhibición celular *in vitro*. Se ha descubierto que la forma IgM del anticuerpo original para la forma trimérica del receptor P2X₇ no funcional expresado en células cancerosas inhibe el crecimiento celular usando el ensayo Cell Titer Blue. Se muestra un ejemplo en el que el anticuerpo IgM de control no tiene ningún efecto en el crecimiento celular (columnas izquierdas) para concentraciones crecientes de 2,5 a 40 μg/ml mientras que el 2F6 inhibió el crecimiento celular (columnas derechas) sobre el mismo intervalo de dosis en un ensayo de crecimiento de 3 días. (b), (c), (d) Otros tipos celulares fueron inhibidos de forma similar por incubación con la forma IgM del anticuerpo. El crecimiento durante 5 días es inhibido en mayor grado que durante 3 días. Los datos de crecimiento se representan en relación con las curvas de crecimiento de control obtenidas usando el anticuerpo IgM de control. El crecimiento de COLO205 fue inhibido significativamente durante 3 días y las células se eliminaron durante 5 días incluso a dosis baja de 2,5 μg/ml. Esto indica que diferentes líneas celulares que expresan niveles ligeramente diferentes de receptor son más o menos susceptibles a la unión a anticuerpo. (e) Por el contrario, la forma IgG_{2a} recombinante del anticuerpo mostró inhibición celular más débil como se muestra en las siguientes figuras obtenidas durante 3 días. El ensayo de inhibición del crecimiento celular (Cell Titer Blue) mostró que la forma IgG_{2a} del anticuerpo tenía inhibición del crecimiento celular tumoral reducida en comparación con la inhibición inducida usando la forma IgM del anticuerpo, en línea con la afinidad de unión reducida del IgG que contiene dos dominios de unión en lugar de diez.

55 **Figura 10.** Reacción de bloqueo en el ensayo de destrucción celular. El ensayo de inhibición del crecimiento celular Cell Titer Blue se usa durante tres días de crecimiento celular con la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Obsérvese que las células de control viables en la columna derecha no tienen anticuerpo o péptido. La columna izquierda es la señal derivada de las células incubadas con anticuerpo IgM 2F6 10 μg/ml que contienen epítipo peptídico 500 μg/ml (epítipo E200-300 descrito como 200/300 en la Figura), suficiente para bloquear la inhibición del crecimiento celular demostrada por los datos en las tres columnas centrales que muestran que la inhibición del crecimiento no está afectada por la presencia de péptido 50 μg/ml, 5 μg/ml o 0 μg/ml respectivamente. Se produce inhibición total del crecimiento celular después de 5 días de exposición a 2F6.

60

65

Figura 11. Mecanismo de muerte celular inducida por 2F6 con activación de caspasa 3/7 asociada con reactivación de apoptosis. En este experimento el efecto del fármaco de control Gemcitabina se muestra a la izquierda, y se sabe que activa caspasas mediante la inducción de apoptosis en células cancerosas COLO205. Por el contrario, la ausencia de fármaco o anticuerpo no tiene ningún efecto (columna solamente con células). La presencia de IgM de control a dosis de hasta 40 µg/ml de forma similar no tiene ningún efecto en la activación de caspasa mientras que cantidades crecientes de anticuerpo 2F6 muestran un aumento continuo en la activación de caspasa 3/7 asociada con inducción de apoptosis por el anticuerpo durante el ciclo temporal de 3 días del experimento.

Figura 12. Destrucción celular directa por IgM 2F6. Imágenes de microscopio confocal de células MCF-7 en presencia de anticuerpo IgM de control (a) e IgM 2F6 (b) durante 24 h.

Figura 13. (a) hFc 2-2-1 unido a células tumorales 4T1 que muestran algo de unión membranosa (obj x40). (b) hFc 2-2-1 unido a células moribundas junto con el residuo membranoso de células ya destruidas. (c) hFc 2-2-1 unido a células tumorales LL vivas que muestran clara unión membranosa. (d) hFc 2-2-1 unido a residuo membranoso de células ya destruidas.

Figura 14. (a) hlgG1 2F6 unido a células tumorales 4T1 que muestran clara unión membranosa (obj x40). (b) hlgG1 2F6 unido solamente a células moribundas. (c) hlgG1 2F6 unido a células tumorales LL vivas que muestran clara unión membranosa. (d) hlgG1 2F6 unido a células moribundas sin unión con glóbulos rojos adyacentes que expresan receptor P2X₇ con capacidad de función.

Figura 15. Inhibición del número de metástasis pulmonares el día 14 en el modelo de xenoinjerto singénico 4T1 por 2F6hlgG1. La reducción general en el volumen tumoral fue del 89 % con la mayoría de metástasis en el grupo de tratamiento mucho menor que en el grupo no tratado.

Figura 16. Inhibición del número de metástasis pulmonares en el modelo de xenoinjerto singénico de pulmón de Lewis (LL) el día 11. Los cinco grupos son el control no tratado (Grupo 1), E200-300 policlonal de oveja a 10 mg/kg (Grupo 2), 2F6hlgG1 a 1 mg/kg (Grupo 3) y a 10 mg/kg (Grupo 4) y Sorafenib a 5 ml/kg diariamente (Grupo 5). hlgG1 tanto policlonal de oveja como 2F6 fueron equipotentes con Sorafenib con 96 % de inhibición.

Figura 17. Maduración de afinidad de secuencias de CDR3 de 2F6. Las secuencias de aminoácidos de derivados de scFv/Fab de afinidad madurada se enumeraron como clones mutantes con la secuencia de CDR3 2F6 de tipo silvestre (WT) en la parte superior de la lista.

Figura 18. ELISA de candidatos de IgM, IgG_{2a} y Fab. ELISA de Fab derivado de 2F6 de afinidad madurada de candidatos (escala 0,01-12,5 µg/ml para IgM e IgG_{2a}; 0,1-100 µg/ml para Fab). Los valores de CE₅₀ para el IgM original y el IgG_{2a} recombinante se midieron como 0,14 y 1,6 µg/ml respectivamente. El Fab WT mostró una CE₅₀ muy baja mientras que la especie de Fab de afinidad madurada de candidatos seleccionada de exploración de ScFv (n.º 10, n.º 21, n.º 42 y n.º 66) se unió mucho más estrechamente con una CE₅₀ en el intervalo de 2-4 µg/ml o aproximadamente 125 veces más fuerte que WT, que coincide con la afinidad del anticuerpo IgG_{2a} completamente formado.

Figura 19. (a) Resultados de citometría de flujo para unión de Fab recombinantes con células tumorales COLO205 colorrectales vivas. Se usó un anticuerpo secundario anti FLAG Sigma (n.º F4049) para detectar la unión de los anticuerpos primarios. Fab 2F6 WT se unió débilmente sobre el mismo intervalo de concentraciones. La CE₅₀ para los cuatro Fab candidatos es muy similar a los valores obtenidos a partir de mediciones de ELISA. (b) Se obtuvieron resultados de unión mejorados muy similares para células PC3 de próstata.

Figura 20. Se realizó una comparación con diversas preparaciones de IgG_{2a} 2F6 recombinante para determinar la fuerza de unión relativa del anticuerpo con formato WT para células PC3 en comparación con los Fab de afinidad madurada. Se usó IgG_{2a} Rockland n.º 010-001-332 para control para determinar el fondo (rombo). La unión del anticuerpo WT con formato completo fue comparable a la unión inducida por los Fab candidatos.

Figura 21. La verificación de la falta de unión con el receptor P2X₇ funcional en linfocitos humanos por los Fab candidatos se determinó por citometría de flujo. El anticuerpo anti FLAG Sigma n.º F4049 se usó como el secundario. El anticuerpo de HLA Abcam se usó como un control. No se detectó unión por encima del fondo como se determinó mediante la señal solo secundaria en la columna izquierda. El orden del anticuerpo primario de izquierda a derecha a lo largo del eje x es el mismo que el orden de la leyenda de arriba a abajo.

Figura 22. Resultados de citometría de flujo para unión de anticuerpo policlonal de oveja purificado de alta afinidad con células PC3 que muestra unión significativamente más fuerte que hlgG_{2a} 2F6 WT e indica las mejoras que pueden esperarse de una serie de Fab de afinidad madurada una vez convertidos en agentes de unión de IgG divalentes.

Descripción detallada

Se hará ahora referencia en detalle a ciertos casos de la divulgación. Al mismo tiempo la divulgación se describirá junto con los casos.

5

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

- 10 La divulgación proporciona sitios de unión a antígeno que son capaces de unirse con receptores P2X₇ no funcionales expresados por células vivas. Estos receptores están en una forma oligomérica de orden superior. Esta forma oligomérica es dos o más monómeros del receptor P2X₇ que se han asociado. Típicamente, la forma oligomérica es un trímero de tres monómeros del receptor P2X₇. Una ventaja de los sitios de unión a antígeno de la divulgación que se unen con formas oligoméricas de P2X₇ de orden superior es que el secuestro por formas monoméricas del receptor P2X₇ liberado de células lisadas o apoptóticas se reducirá en comparación con anticuerpos que se unen solamente con receptores P2X₇ monoméricos.

Con el fin de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, siempre que sea adecuado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En caso de que cualquier definición expuesta entre en conflicto con cualquier documento, prevalecerá la definición expuesta a continuación.

20

"Receptor purinérgico" se refiere en general a un receptor que usa una purina (tal como ATP) como un ligando.

25 *"Receptor P2X₇"* se refiere en general a un receptor purinérgico formado a partir de tres subunidades o monómeros proteicos, teniendo al menos uno de los monómeros una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en SEQ ID NO:1 (véase Figura 1). 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 incluyendo 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 ella), 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 varios de los aminoácidos en la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 pueden sustituirse, suprimirse o puede insertarse un resto.

30

35

"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 homeostasis normal, la expresión de receptores P2X₇ funcionales está limitada en general a células que experimentan muerte celular programada tales como timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos y monocitos. También puede haber algo de expresión de receptores P2X₇ funcionales en eritrocitos.

40

45 *"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 a ATP. En estas 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.

50

"Dominio extracelular" (ECD) usado en el presente documento son receptor P2X₇ (47-306) (SEQ ID NO: 2, véase Figura 2) (ECD2) y receptor P2X₇ (47-332) (SEQ ID NO:3) (ECD1). El receptor P2X₇ (47-306) (SEQ ID NO: 2) es los aminoácidos 47 a 306 de SEQ ID NO: 1. El receptor P2X₇ (47-332) (SEQ ID NO:3, véase Figura 3) es los aminoácidos 47 a 332 de SEQ ID NO: 1.

55

"Anticuerpos" o *"inmunoglobulinas"* o *"Ig"* son proteínas gamma globulinas que se encuentran en sangre u otros fluidos corporales de vertebrados que actúan en el sistema inmunitario para unirse con el antígeno, identificando y neutralizando de este modo objetos extraños.

60

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 separados de forma regular.

65

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 los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}).

Pueden asignarse anticuerpos 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.

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

El emparejamiento de un V_H y V_L entre sí forma "*región variable*" o "*dominio variable*" incluyendo 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 separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "*regiones hipervariables*" (generalmente aproximadamente 3) que son cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Las FR adoptan en gran medida una configuración de lámina β y las regiones hipervariables de bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina β .

"*Región hipervariable*", "*HVR*" o "*HV*" se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el V_H ($H1$, $H2$, $H3$) y tres en el V_L ($L1$, $L2$, $L3$). Están en uso varias delimitaciones de regiones hipervariables y están abarcadas en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencias y son las más habitualmente usadas (Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

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.

"*Un péptido para formar un sitio de unión a antígeno*" se refiere en general a un péptido que puede formar una conformación que confiere la especificidad de un antígeno por antígeno. Los ejemplos incluyen anticuerpo completo o estructuras relacionadas con anticuerpo completo, fragmentos de anticuerpos completos que incluyen un dominio variable, dominios variables y fragmentos de los mismos, incluyendo cadenas ligeras y pesadas, o fragmentos de cadenas ligeras y pesadas que incluyen algunas pero no todas de las regiones hipervariables o regiones constantes.

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, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de secuencia de aminoácidos de los mismos.

Las "*estructuras relacionadas con anticuerpo completo*" incluyen formas multimerizadas de anticuerpo completo.

Los "*fragmentos de anticuerpos completos que incluyen un dominio variable*" incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; dímeros; anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fab consiste 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 Fav es monovalente con respecto a unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno.

Un fragmento Fab' difiere de los fragmentos Fab por tener pocos restos adicionales en el extremo carboxilo 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.

Un fragmento $F(ab')_2$ corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún tiene capacidad de entrecruzamiento con antígeno.

Un "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo.

5 Este fragmento consiste en un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente, estrecha.

En una especie de Fv monocatenario (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 ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga de la de una especie de Fv bicatenario. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que aportan los restos de aminoácidos para unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

10 "Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden 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.

Un "dominio variable sencillo" es la mitad de un Fv (que comprende solamente tres CDR específicos para un antígeno) que tiene la capacidad de reconocer y unirse con un antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

"Diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($VH-VL$). Los fragmentos de anticuerpos pequeños se preparan construyendo fragmentos sFv (véase párrafo anterior) con enlazadores cortos (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.

30 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.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente preexistente. Los componentes contaminantes son materiales que interferirían con usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos.

Un "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a una provocación antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado.

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 se reemplazan restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, perro, gato o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. 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 anticuerpo. 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 se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

"Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir 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, que se dirigen contra un único sitio antigénico o determinante

en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse no contaminados por otros anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por la metodología de hibridoma o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales. Los "*anticuerpos monoclonales*" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "*quiméricos*" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas son idénticas a u homólogas de secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable obtenidas de un primate no humano (por ejemplo mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

La expresión "*anticuerpo anti receptor P2X₇*" o "*un anticuerpo que se une con el receptor P2X₇*" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con el receptor P2X₇ con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección al receptor P2X₇, típicamente receptor P2X₇ no funcional. Preferentemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti receptor P2X₇ a una proteína receptora no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo al receptor P2X₇ según se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertos casos, un anticuerpo que se une con el receptor P2X₇ tiene una constante de disociación (K_d) de < 1 μM, < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM o < 0,1 nM. Un anticuerpo anti receptor P2X₇ es en general 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.

Un anticuerpo "*de afinidad madurada*" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha alteración o dichas 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.

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.

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.

La "*afinidad de unión*" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). En general, la "*afinidad de unión*" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero de unión Y se puede representar en general por su constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los antígenos de baja afinidad en general se unen 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 tienen a permanecer unidos más tiempo. Se conocen 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.

Como se usa en el presente documento, las propiedades de los aminoácidos se definen en la siguiente tabla:

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Propiedades
Alanina	Ala	A	alifático hidrófobo neutro
Arginina	Arg	R	polar hidrófilo con carga (+)
Asparagina	Asn	N	polar hidrófilo neutro
Aspartato	Asp	D	polar hidrófilo con carga (-)
Cisteína	Cys	C	polar hidrófobo neutro
Glutamina	Gln	Q	polar hidrófilo neutro
Glutamato	Glu	E	polar hidrófilo con carga (-)
Glicina	Gly	G	alifático neutro

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Propiedades
Histidina	His	H	aromático polar hidrófilo con carga (+)
Isoleucina	Ile	I	alifático hidrófobo neutro
Leucina	Leu	L	alifático hidrófobo neutro
Lisina	Lys	K	polar hidrófilo con carga (+)
Metionina	Met	M	hidrófobo neutro
Fenilalanina	Phe	F	aromático hidrófobo neutro
Prolina	Pro	P	hidrófobo neutro
Serina	Ser	S	polar hidrófilo neutro
Treonina	Thr	T	polar hidrófilo neutro
Triptófano	Trp	W	aromático hidrófobo neutro
Tirosina	Tyr	Y	aromático polar hidrófobo
Valina	Val	V	alifático hidrófobo neutro

Los inventores han determinado las secuencias de CDR de varios clones de dominio variable que han descubierto que se unen con el receptor P2X₇ no funcional. Estas secuencias de CDR se muestran en la Tabla 1a posterior.

- 5 En un caso se proporciona un péptido que tiene una secuencia como se muestra en la Tabla 1a o b. Estos péptidos son particularmente útiles para construir sitios de unión a antígeno, dominios variables, anticuerpos y fragmentos relacionados.

Tabla 1a: Secuencias de CDR

10

CDR1	CDR2	CDR3
KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 5)	SASFRYS (SEQ ID NO: 6)	(con carga/polar/aromático) (con carga/aromático) XXXY (aromático/alifático)(con carga/neutro) (neutro/alifático)
		N(Y/F)XXX(Y/F)EX
		N(Y/F)(neutro)(con carga)(neutro)Y(Y/F)E(neutro)
		NFLESYFEA (SEQ ID NO: 7)
		N(Y/F)(con carga)(neutro)(con carga)Y(Y/F)E(neutro)
		NYRGDYYET (SEQ ID NO: 8)
		H(aromático)XXXYYNI
		H(Y/F)(neutro)(con carga)(neutro)YYNI
		H(Y/F)(neutro)(con carga)(con carga)YYNI
		HYSKEYYNI (SEQ ID NO: 9)
		HFQRGYYNI (SEQ ID NO: 10)
		(Y/N)(aromático)XXXYY(con carga)(neutro)
		(Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYDV
		(Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYEV
		YFPLVYYDV (SEQ ID NO: 11)
		NYLPMYYEV (SEQ ID NO: 12)
		Y(con carga)XXX(Y(neutro)(neutro)(neutro))
		NFKLMYYNV (SEQ ID NO: 13)
		(con carga/polar/aromático)(aromático)(con carga/neutro) (con carga)(con carga/neutro)Y(aromático)(con carga)(neutro)
		(con carga/polar/aromático)(F/Y)(con carga/neutro)(R/K) (con

ES 2 667 003 T3

CDR1	CDR2	CDR3
		carga/neutro)(Y)(Y/F)(E/D)V
		(H/N)(F/Y)(S/D)(R/K)(G/K)Y(Y/F)DV
		HFSRGYYDV (SEQ ID NO: 14)
		HYIKVYYEA (SEQ ID NO: 15)
		HYSSRFFEY (SEQ ID NO: 16)
		NFRVMFFKA (SEQ ID NO: 17)
		HYSSRFFEY (SEQ ID NO: 18)
		YHVIQYLG (SEQ ID NO: 19)
		DFTVPFYNA (SEQ ID NO: 20)
		NYDKKYFDV (SEQ ID NO: 21)
		YFPLVYYDV (SEQ ID NO: 22)
		HYSSRFFDV (SEQ ID NO: 34)
SYYS (SEQ ID NO: 23)	AINSGG STYYPDT VKG (SEQ ID NO: 24)	(con carga/polar/aromático) (con carga/aromático) XXXY (aromático/alifático)(con carga/neutro) (neutro/alifático)
		N(Y/F)XXX(Y/F)EX
		N(Y/F)(neutro)(con carga)(neutro)Y(Y/F)E(neutro)
		NFLESYFEA
		N(Y/F)(con carga)(neutro)(con carga)Y(Y/F)E(neutro)
		NYRGDYYET
		H(aromático)XXXYYNI
		H(Y/F)(neutro)(con carga)(neutro)YYNI
		H(Y/F)(neutro)(con carga)(con carga)YYNI
		HYSKEYYNI
		HFQRGYYNI
		(Y/N)(aromático)XXXYY(con carga)(neutro)
		(Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYDV
		(Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYEV
		YFPLVYYDV
		NYLPMYYEV
		Y(con carga)XXXYY(neutro)(neutro)(neutro)
		YHVIQYLG
		NFKLMYYNV
		(con carga/polar/aromático)(aromático)(con carga/neutro) (con carga)(con carga/neutro)Y(aromático)(con carga)(neutro)
		(con carga/polar/aromático)(F/Y)(con carga/neutro)(R/K) (con carga/neutro)(Y)(Y/F)(E/D)V
		(H/N)(F/Y)(S/D)(R/K)(G/K)Y(Y/F)DV
		HFSRGYYDV
		HYIKVYYEA

<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
		HYSSRFFEY
		NFRVMFFKA
		HYSSRFFEY
		DFTVPFYNA
		NYDKKYFDV
		YFPLVYYDV
		HYSSRFFDV

Tabla 1b

Sitio de unión a antígeno	V _H	V _L	scFV
2F6 (WT)	DVKLVESGGGLVKLG GSLKLSAASGFTFSS YYMSWVRQTPEKRLE LVAAINSNGGSTYYPD TVKGRFTISRDNKNT LYLQMSSLKSEDFAFY YCTRHYSRFFDVWG AGTTVTVSS (SEQ ID NO: 35)	MADIVMTQSQKFMSTSV GDRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLA EFFCQQYNSYPFTFGSG TRLEIK (SEQ ID NO: 36)	MADIVMTQSQKFM STSVGDRVSVTCK ASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRF TGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEFFCQ QYNSYPFTFGSGT RLEIKGGGGSGGG GSGGGGSDVKLV ESGGGLVKLGGSL KLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEK
			RLELVAAINSNGG STYYPDTVKGRFTI SRDNKNTLYLQM SSLKSEDFAFYC TRHYSRFFDVW GAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 37)

Sitio de unión a antígeno	V _H	V _L	scFV
Mutante n.º 18	<p>DVKLVESGGGLVKLG GSLKLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEKRLE LVAAINSNGGSTYYPD TVKGRFTISRDNKNT LYLQMSSLKSEDYFY YCTRHFSRGGYYDWWG AGTTVTVSS (SEQ ID NO: 38)</p>	<p>MADIVMTQSQKFMSTSV GDRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLA EFFCQQYNSYPFTFGSG TRLEIK</p>	<p>MADIVMTQSQKFM STSVGDRVSVTCK ASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRF TGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEFFCQ QYNSYPFTFGSGT RLEIKGGGGSGGG GSGGGGSDVKLV ESGGGLVKLGGSL KLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEK RLELVAAINSNGG STYYPDTVKGRFTI SRDNKNTLYLQM SSLKSEDYFYCYC TRHFSSRGGYYDWW GAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 39)</p>
Mutante n.º 78	<p>DVKLVESGGGLVKLG GSLKLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEKRLE LVAAINSNGGSTYYPD</p>	<p>MADIVMTQSQKFMSTSV GDRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRFTGSG</p>	<p>MADIVMTQSQKFM STSVGDRVSVTCK ASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIY</p>

Sitio de unión a antígeno	V _H	V _L	scFV
	TVKGRFTISRDNKNT LYLQMSSLKSEDYFY YCTRNYDKKYFDVWG AGTTVTVSS (SEQ ID NO: 40)	SGTDFTLTISNVQSEDLA EFFCQQYNSYPFTFGSG TRLEIK	SASFRYSGVPDRF TGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEFFCQ QYNSYPFTFGSGT RLEIKGGGGSGGG GSGGGGSDVKLV ESGGGLVKLGSSL KLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEK RLELVAAINSNGG STYYPDTVKGRFTI SRDNKNTLYLQM SSLKSEDYFYCYC TRNYDKKYFDWW GAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 41)

En ciertos casos el sitio de unión a antígeno es uno que tiene al menos 75 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 85 %, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 %, más preferentemente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con un sitio de unión a antígeno descrito anteriormente.

5

En ciertos casos la CDR es una que tiene al menos 75 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 85 %, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 %, más preferentemente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una CDR mostrada en la Tabla 1a.

10 En ciertos casos el sitio de unión a antígeno comprende o consiste en una secuencia de V_H, V_L o scFv mostrada en la Tabla 1b o tiene una secuencia que tiene 75 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 85 %, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 %, más preferentemente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de V_H, V_L o scFV descrita en la Tabla 1b.

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

20 En ciertos casos los sitios de unión a antígeno de la divulgación y moléculas que los comprenden se unen con un epítipo que se expresa exclusivamente en receptores P2X₇ que se unen con ATP (conocidos de otro modo como "receptores no funcionales"). Se ha descubierto que el epítipo y péptidos que lo forman son útiles para generar anticuerpos monoclonales que se unen con receptores P2X₇ no funcionales expresados en células vivas.

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

El epítipo se encuentra solamente en el receptor P2X₇ es decir el trímero formado a partir de 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 por lo tanto no contienen el epítipo. Esto permite provechosamente estadificar tumores. Esto es más difícil de hacer con anticuerpos que se unen con el receptor tanto P2X₇ monomérico como trimérico.

Por lo tanto en ciertos casos los sitios de unión a antígeno de la divulgación se unen con un epítipo de un receptor P2X₇ estando el epítipo formado por:

- 10 - 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;

- 15 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 a las primera y segunda regiones que forman el epítipo.

Típicamente el epítipo es un epítipo conformacional. En estos casos, las primera y segunda regiones definen cada una un espacio molecular que incluyen cada uno, 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 tienen 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 pueden ser menos, por ejemplo, 2 o 3, dependiendo de cuántos restos se presenten en la segunda región. En un caso, la primera región incluye al menos 1 par de restos mostrados en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

30

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

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

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 con un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de isomerización en *cis* de Pro210 de un monómero que tienen 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 de, pero no

40

ES 2 667 003 T3

como alternativa a por ejemplo uno o más de los restos Gly 200, His 201, Asn 202, Tyr 203, Thr 204, Thr 205, Arg 206, Asn 207, Ile 208, Leu 209.

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 con un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de isomerización en *cis* de Pro210 de un monómero que tienen 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 pueden ser menos, por ejemplo, 2 o 3, dependiendo de cuántos restos se presenten en la primera región. En un caso, la segunda región incluye al menos 1 par de restos mostrados en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3

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	Thr 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

15 En ciertos casos la segunda región incluye 2 o más pares de restos mostrados en la Tabla 3.

La segunda región puede contener adicionalmente uno o más restos periféricos que están implicados de forma íntima 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 con un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de isomerización en *cis* de Pro210 de un monómero que tienen una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. En este contexto, los Arg 307 y Lys 311 se proporcionan solamente 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.

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 4:

30

Tabla 4

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

En estos casos, la segunda región del epítopo puede incluir una de las siguientes secuencias de SEQ ID NO: 1 en la tabla 5:

Tabla 5

5

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

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 La primera región y la 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 sucede al revés.

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 epítopo. En más detalle, los inventores han descubierto que aunque se localizan en monómeros separados, las primera y segunda regiones en combinación forman un epítopo que puede unirse con un único sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. En general, las primera y segunda regiones del epítopo están a una distancia de no más de aproximadamente 40 ángstroms. Si la distancia es mayor que esta, la afinidad de unión del anticuerpo tiende a reducirse ya que el sitio de unión a antígeno tiene que recorrer una distancia mayor entre los monómeros dentro del receptor en cuyo caso se unen menos restos. En general las primera y segunda regiones están a una distancia de aproximadamente 10 ángstroms, aunque son posibles mayores distancias de menos de 40 ángstroms tales como 15, 20, 25, 30, 35 ángstroms.

25 El epítopo 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 o recombinante.

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

En otro caso se proporciona un sitio de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente en el que una secuencia de aminoácidos que forma una o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 se obtiene de una secuencia humana o en forma de una secuencia humana.

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

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

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

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

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

En otro caso se proporciona un dominio variable de inmunoglobulina anti receptor P2X₇, anticuerpo, Fab, dab o scFv que incluye un sitio de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente.

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

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

En ciertos casos, el sitio de unión a antígeno se proporciona en forma de un fragmento Fv monocatenario (scFv). Fv
 35 y scFv son adecuados para unión inespecífica reducida durante el uso *in vivo* ya que tienen sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes. Pueden construirse proteínas de fusión que incluyen scFv para producir fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo de un scFv. Preferentemente el scFv está en forma de un dominio V_H fusionado por un enlazador con un dominio V_L. En un caso el enlazador es de al
 40 menos 15 aminoácidos de longitud. Típicamente, el enlazador es de al menos 10 aminoácidos de longitud. En un caso el enlazador está comprendido en general por restos de glicina o serina. Típicamente, el enlazador es GGGGSGGGGSGGGGS.

En un caso el scFv tiene la secuencia:

45

**MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASFRY
 SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFCQQYNSYPFTFGSGRLEIKGGGGSG
 GGGSGGGGSDVKLVESGGGLVKLGGSLKLSAASGFTFSSYYMSWVRQTPEKRLEL
 VAAINSNGGSTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTRHYSSRFF
 DWGAGTTVTVSS**

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

En otro caso se proporciona un dominio de fusión o una proteína heteróloga que incluye un sitio de unión a antígeno,
 55 dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo o triacuerpo como se ha descrito anteriormente.

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

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

En casos preferidos, una secuencia de aminoácidos marcadora tal como un péptido de hexahistidina es útil para purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros incluyen, pero sin limitación, el marcador "HA", que corresponde a un epítipo obtenido de la proteína hemaglutinina de la gripe y el marcador "flag". Por ejemplo, un scFv de la divulgación puede estar tanto marcado con flag como marcado con His con la siguiente secuencia:

**MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNAVWYQQKPGQSPKALIYSASFRY
SGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEFFCQQYNSYPFTFGSGTRLEIKGGGGSG
GGGSGGGGSDVKLVESGGGLVKLGGSLKLSAASGFTFSSYYMSWVRQTPEKRL
VAAINSNGGSTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTRHYSRRF
DWWGAGTTVTVSSAAADYKDDDDKAAAHHHHHH**

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

20 Los sitios de unión a antígeno de la divulgación pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los sitios de unión a antígeno de la divulgación pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Dichas modificaciones se describen bien en textos básicos, así como en

25 la bibliografía de investigación. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte en el sitio de unión a antígeno, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino y carboxilo, o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o diversos grados en varios sitios en un sitio de unión a antígeno dado. Además, un sitio de unión a antígeno dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Un sitio de unión a antígeno puede ramificarse, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y puede ser cíclico, con o sin ramificación. Los sitios de unión a antígeno cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos postraduccionales naturales o pueden prepararse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, 35 ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación.

40 En otro caso se proporciona un conjugado en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFsv, diacuerpo, triacuerpo o proteína de fusión como se ha descrito anteriormente conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, 45 vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un marcador tal como un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la divulgación proporciona además métodos para usar los inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los dominios variables anteriores unidos covalentemente con un agente citotóxico o un agente detectable.

50 En otro caso se proporciona un anticuerpo para unión con un sitio de unión a antígeno de un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se ha descrito anteriormente.

En otro caso se proporciona un ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno, dominio variable de 55 inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se ha descrito anteriormente.

Un polinucleótido que codifica una CDR o FR de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas generales descritas anteriormente, o un sitio de unión a antígeno comprendido por las mismas, puede generarse a partir de un ácido nucleico de cualquier fuente, por ejemplo, por síntesis química o aislamiento de una biblioteca de ADNc o genómica. Por ejemplo una biblioteca de ADNc puede generarse a partir de una célula productora tal como un linfocito B, célula

5 plasmática o célula de hibridoma y el ácido nucleico relevante aislado por amplificación por PCR usando oligonucleótidos dirigidos al clon particular de interés. Pueden después clonarse ácidos nucleicos aislados en vectores usando cualquier método conocido en la técnica. La secuencia de nucleótidos relevante puede después mutarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A

10 Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar sitios de unión a antígeno que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos.

15 En otro caso se proporciona un vector que incluye un ácido nucleico descrito anteriormente. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector por una diversidad de procedimientos. En general, se inserta ADN en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados usando técnicas conocidas en este campo. Los componentes de vector incluyen en general, pero sin limitación, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más

20 genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales que son conocidas por los expertos en la materia.

El sitio de unión a antígeno puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un

25 polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector o puede ser parte del ADN codificante de sitio de unión a antígeno que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina termoestable II. Para secreción de levadura la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, líder de factor alfa o líder de fosfatasa

30 ácida o el líder de glucoamilasa de *C. albicans*. En la expresión de células de mamífero, pueden usarse secuencias señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o una especie relacionada, así como líderes secretores víricos.

35 Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del sitio de unión a antígeno de la divulgación usando técnicas recombinantes convencionales como se ha descrito anteriormente. Pueden sintetizarse polinucleótidos usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Pueden usarse muchos vectores que están disponibles y

40 son conocidos en la técnica para el fin de la presente divulgación. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo o ambos) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside.

45 En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que se obtienen de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicar en una o más células hospedadoras seleccionadas, así como marcar secuencias que son capaces de proporcionar selección

50 fenotípica en células transformadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322, que contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por lo tanto proporciona medios fáciles para identificar células transformadas, es adecuado para la mayoría de bacterias gramnegativas, el origen de plásmido de 2 µm es adecuado para levadura y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de

55 mamífero. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófago también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas.

Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y control que son compatibles con

60 el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, puede utilizarse bacteriófago tal como λGEM.TM.-11 para preparar un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la divulgación puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón (siendo un cistrón

65 un segmento de ADN que contiene toda la información para la producción de un polipéptido individual). Un promotor

es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas típicamente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

5

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la divulgación. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos

10

promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunos casos se utilizan promotores heterólogos, ya que en general permiten mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana expresado en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo.

Se conocen bien promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor de PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor de tac o el de trc. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica un sitio de unión a antígeno de la divulgación. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como promotores bacterianos o de fagos

15

20

conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo a un experto en la materia unirlos operativamente con cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la divulgación, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector o puede ser parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el fin de la presente divulgación debería ser una que sea reconocida y procesada (es decir escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos

25

30

heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina termoestable II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En un caso de la divulgación, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la divulgación puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A ese respecto, se expresan cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas de *E. coli trxB*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de

35

40

enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de subunidades proteicas expresadas.

La presente divulgación proporciona un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar la producción de sitios de unión a antígeno secretados y

45

ensamblados de forma apropiada de la divulgación. Dicha modulación se consigue al menos en parte modulando simultáneamente fuerzas de traducción para los componentes polipeptídicos.

Con respecto a expresión en células hospedadoras eucariotas, los componentes de vector incluyen en general, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes

50

marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Un vector para uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que sea reconocida y procesada (es

55

decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal del herpes simple gD.

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

60

En general, no es necesario un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse típicamente solamente porque contiene el promotor temprano.

Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente un gen de selección, también denominado marcador

65

seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteína que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras

toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica racemasa de D-alanina para bacilos.

- 5 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.
- 10 Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica sitio de unión a antígeno, tales como DHFR o timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096), preparada y propagada.
- 15 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Como alternativa, células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH)
- 20 pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418.

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor unido operativamente con la secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de unión a antígeno para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien
25 promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales.

Los genes eucariotas generalmente tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3'
30 de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los
35 promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas incluyendo enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción
40 controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

La transcripción de sitios de unión a antígeno de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por
45 ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sea compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

50 La transcripción de un ADN que codifica el sitio de unión a antígeno por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Las secuencias potenciadoras incluyen las conocidas de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levadura, hongos, insecto, planta, animal, ser humano o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias
60 para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un sitio de unión a antígeno.

65 En otro caso se proporciona una célula que incluye un vector o ácido nucleico descrito anteriormente. La molécula

de ácido nucleico o vector puede estar presente en la célula hospedadora o el hospedador modificado genéticamente como una molécula independiente fuera del genoma, preferentemente como una molécula que tiene capacidad de replicación, o puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula hospedadora o el hospedador.

5

La célula hospedadora de la presente divulgación puede ser cualquier célula procariota o eucariota.

Son ejemplos de células procariotas las usadas en general para clonación como *E. coli* o *Bacillus subtilis*. Además, las células eucariotas comprenden, por ejemplo, células fúngicas o animales.

10

Son ejemplos de células fúngicas adecuadas células levaduras, preferentemente las del género *Saccharomyces* y más preferentemente las de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

15

Son ejemplos de células animales, por ejemplo, células de insecto, células de vertebrado, preferentemente células de mamífero, tales como por ejemplo HEK293, NSO, CHO, MDCK, U2-OS, Hela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A. Estas células hospedadoras, por ejemplo células CHO, pueden proporcionar modificaciones postraduccionales a las moléculas de anticuerpo de la divulgación, incluyendo retirada del péptido líder, plegamiento y ensamblaje de cadenas H (pesada) y L (ligera), glucosilación de la molécula en lados correctos y secreción de la molécula funcional.

20

Pueden obtenerse líneas celulares adecuadas adicionales conocidas en la técnica de depósitos de línea celular, como la colección americana de cultivos tipo (ATCC).

25

En otro caso se proporciona un animal que incluye una célula descrita anteriormente. En ciertos casos, los animales y tejidos de los mismos que contienen un transgén son útiles en la producción de los sitios de unión a antígeno de la divulgación. La introducción de las moléculas de ácido nucleico como transgenes en hospedadores no humanos y su expresión posterior pueden emplearse para la producción de los sitios de unión a antígeno, por ejemplo, la expresión de dicho transgén en la leche del animal transgénico proporciona medios para obtener los sitios de unión a antígeno en cantidades cuantitativas. Los transgenes útiles a este respecto comprenden las moléculas de ácido nucleico de la divulgación, por ejemplo, secuencias codificantes de los sitios de unión a antígeno descritos en el presente documento, unidas operativamente a estructuras promotoras y/o potenciadoras de un gen específico de glándulas mamarias, como caseína o betalactoglobulina. El animal puede ser mamíferos no humanos, más preferentemente ratones, ratas, ovejas, terneros, perros, monos o simios.

35

En otro caso se proporciona una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se ha descrito anteriormente y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40

Los expertos en la materia conocen bien o determinan fácilmente métodos para preparar y administrar sitios de unión a antígeno de los mismos a un sujeto que lo necesite. La vía de administración del sitio de unión a antígeno puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica.

45

El término parenteral como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal.

50

Aunque todas estas formas de administración se contemplan claramente como dentro del alcance de la divulgación, una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para inyección o goteo intravenoso o intraarterial. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo albúmina humana), etc.

55

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. En la divulgación objeto, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina 0,8 %. Otros vehículos parenterales habituales incluyen soluciones de fosfato sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de líquidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

60

Más en particular, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones (cuando sean solubles en agua) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles, en esos casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida

65

en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente se conservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un 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 dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se describen formulaciones adecuadas para uso en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16ª ed. (1980).

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

15 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (por ejemplo, sitio de unión a antígeno) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básica 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 previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se cargan en recipientes tales como ampollas, bolsas, frascos, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de un kit. Dichos artículos de fabricación tendrán preferentemente etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un objeto que padece o está predisuesto a trastornos.

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

Para el tratamiento de ciertos trastornos con un sitio de unión a antígeno, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedador. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser 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 pueden administrar a sujetos dichas dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes 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, se administran de forma simultánea dos o más sitios de unión a antígeno con especificidades de unión diferentes, en cuyo caso la dosificación de cada sitio de unión a antígeno administrado está incluida dentro de los intervalos indicados.

Un sitio de unión a antígeno desvelado en el presente documento puede administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre de polipéptido diana o molécula diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de polipéptidos en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Como alternativa, pueden administrarse sitios de unión a antígeno como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del sitio de unión a antígeno en el paciente. La semivida de un sitio de unión a antígeno también puede prolongarse mediante fusión con un polipéptido o resto estable, por ejemplo, albúmina o PEG. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguidos de anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. En un caso, el sitio de unión a antígeno de la divulgación puede administrarse en forma no conjugada. En otro caso los sitios de unión a antígeno para uso en los métodos desvelados en el presente documento pueden administrarse múltiples veces en forma conjugada. En otro caso más, los sitios de unión a antígeno de la divulgación pueden administrarse en forma no conjugada, después en forma conjugada, o viceversa.

La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que comprenden anticuerpos o un cóctel de los mismos a un paciente que no tiene aún la patología o un estado preenfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas

- 5 dependen de nuevo del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero en general varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.
- 10 En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de molécula de unión, por ejemplo, sitio de unión a antígeno por dosis, usándose dosificaciones de 5 a 25 mg más habitualmente para radioinmunoconjugados y dosis mayores para moléculas conjugadas con fármacos citotóxicos) a intervalos relativamente cortos es necesaria en ocasiones hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el paciente muestra alivio parcial o completo de los síntomas de la
- 15 enfermedad. A continuación, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

En un caso, puede tratarse un sujeto con una molécula de ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno (por ejemplo, en un vector). Las dosis para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores víricos

20 infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por medio parenteral, 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

25 receptor P2X₇ no funcional, por ejemplo inyección intracraneal. Se prefiere inyección intramuscular o infusión intravenosa para administración de anticuerpo, en algunos métodos, se inyectan anticuerpos terapéuticos particulares directamente en el cráneo, en algunos métodos, se administran anticuerpos como una composición o un dispositivo de liberación sostenida.

30 Un sitio de unión a antígeno de la divulgación puede opcionalmente administrarse en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o la afección que necesite tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico).

En otro caso se proporciona una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio

35 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.

En ciertos casos, los sitios de unión a antígeno o molécula que los incluye se marcan de forma detectable. Pueden usarse muchos marcadores diferentes incluyendo enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos

40 fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Se usan habitualmente fluorocromos (fluoresceína, rodamina, Texas Red, etc.), enzimas (peroxidasa de rábano rústico, β-galactosidasa, fosfatasa alcalina etc.), isótopos radiactivos (³²P o ¹²⁵I), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos quimio o bioluminiscentes (dioxetanos, luminol o acridinios).

45 Los métodos de detección dependen del tipo de marcador usado e incluyen autorradiografía, microscopia de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas. Los ejemplos incluyen transferencia de Western, ensayos de superposición, RIA (radioinmunoensayo) e IRMA (ensayo inmunitario radioinmuno-métrico), EIA (inmunoensayo enzimático), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), FIA (inmunoensayo fluorescente) y CLIA (inmunoensayo quimioluminiscente).

50 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.

55 En otros casos se proporciona un kit para uso en una aplicación terapéutica mencionada anteriormente, incluyendo el kit:

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

en ciertos casos el kit puede contener uno o más principios activos o ingrediente adicionales para el tratamiento de

65 un cáncer o para prevenir una complicación relacionada con cáncer descrita anteriormente, o una afección o

enfermedad asociada con expresión del receptor P2X₇ no funcional.

El kit o "artículo de fabricación" puede comprender un recipiente y una etiqueta o un prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, envases de blíster, etc. Los recipientes pueden estar hechos de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición terapéutica que es eficaz para tratar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja para inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indica que la composición terapéutica se usa para tratar la afección seleccionada. En un caso, la etiqueta o el prospecto incluye instrucciones de uso e indica que la composición terapéutica puede usarse para tratar un cáncer o para prevenir una complicación que surja de cáncer.

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 la composición terapéutica 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. Además puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

En ciertos casos la composición terapéutica puede proporcionarse en forma de un dispositivo, desechable o reutilizable, incluyendo un receptáculo para contener la composición terapéutica. En un caso, el dispositivo es una jeringa. El dispositivo puede contener 1-2 ml de la composición terapéutica. La composición terapéutica puede proporcionarse en el dispositivo en un estado que está listo para su uso o en un estado que requiere mezcla o adición de componentes adicionales.

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 de diagnóstico como se ha descrito anteriormente.

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

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

El kit o "artículo de fabricación" puede comprender un recipiente y una etiqueta o un prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, envases de blíster, etc. Los recipientes pueden estar hechos de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de diagnóstico que es eficaz para la detección del cáncer y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja para inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indica que la composición de diagnóstico se usa para detectar la afección seleccionada. En un caso, la etiqueta o el prospecto incluye instrucciones de uso e indica que la composición de diagnóstico puede usarse para tratar un cáncer o una enfermedad o afección caracterizada por la expresión de receptor P2X₇ no funcional.

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. Además puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, etc.

En otro caso se proporciona un método para producir un sitio de unión a antígeno anti P2X₇ como se ha descrito anteriormente que incluye expresar un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente en una célula o un animal como se ha descrito anteriormente.

La producción de un sitio de unión a antígeno de la divulgación generalmente requiere un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el sitio de unión a antígeno de la divulgación. Puede obtenerse un polinucleótido que codifica un sitio de unión a antígeno de la divulgación y subclonarse en un vector para la producción de un sitio de unión a antígeno por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en este campo, incluyendo técnicas descritas en el presente documento. Se contemplan muchos sistemas de expresión diferentes incluyendo el uso de células de mamífero incluyendo células humanas para la producción y secreción de sitios de unión a antígeno. Los ejemplos de células incluyen 293F, CHO y la línea celular NSO.

Pueden construirse vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de proteínas y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas usando métodos conocidos en la técnica. Estos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. En ciertos casos se proporciona un vector replicable que tiene un ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno unido operativamente con un promotor.

Las células transfectadas con un vector de expresión pueden cultivarse por técnicas convencionales para producir un sitio de unión a antígeno. Por lo tanto, en ciertos casos, se proporcionan células hospedadoras o transfectantes celulares que contienen un polinucleótido que codifica un sitio de unión a antígeno de la divulgación unido operativamente a un promotor. El promotor puede ser heterólogo. Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión y en ciertos sistemas la maquinaria de transcripción del sistema de vector se adapta particularmente a la célula hospedadora. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) pueden transfectarse con un vector que incluye el elemento promotor de gen temprano inmediato principal de citomegalovirus humano. Adicionalmente o como alternativa, puede usarse una célula hospedadora que modula la expresión de secuencias insertadas o modifica y procesa el producto génico según se requiera, incluyendo diversas formas de modificación postraducciona. Los ejemplos de células hospedadoras de mamíferos que tienen procesos de modificación postraducciona particulares incluyen CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NSO, CRL7030 y células HsS78Bst.

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

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

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

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

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

Pueden producirse grandes cantidades del sitio de unión a antígeno de la divulgación por un proceso

redimensionable partiendo de un sistema de expresión piloto en un laboratorio de investigación que se aumenta de escala hasta un biorreactor de escala analítica (típicamente biorreactores de 5 l a aproximadamente 50 l) o biorreactores de escala de producción (por ejemplo, pero sin limitación 75 l, 100 l, 150 l, 300 l o 500 l). Los procesos redimensionables deseables incluyen aquellos en los que hay niveles de agregación de bajos a indetectables como se mide mediante HPSEC o rCGE, típicamente no más de 5 % de agregación en peso de proteína hasta no más de 0,5 % en peso de agregación de proteína. Adicionalmente o como alternativa, pueden ser deseables niveles indetectables de fragmentación medidos con respecto al área pico total que representa el sitio de unión a antígeno conjugado en un proceso redimensionable de modo que al menos 80 % y hasta 99,5 % o más del área pico total representa sitio de unión a antígeno. En otros casos, el proceso redimensionable de la divulgación produce sitios de unión a antígeno a eficacia de producción de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 300 mg/l o más.

En otro caso se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por la expresión de receptor P2X₇ no funcional en un individuo que incluye la etapa de proporcionar un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente a un individuo que requiera tratamiento para dicha afección. Típicamente la afección es cáncer, especialmente un cáncer epitelial como se describe en el presente documento. En ciertos casos, el individuo tiene cáncer metastásico o tiene el potencial de que metastatice un cáncer.

Las enfermedades preneoplásicas y neoplásicas son ejemplos particulares a los que pueden aplicarse los métodos de la divulgación. Los ejemplos generales incluyen tumores de mama, tumores colorrectales, adenocarcinomas, mesotelioma, tumores de vejiga, tumores de próstata, tumor de células germinales, hepatoma/colongio, carcinoma, tumores neuroendocrinos, neoplasia de la hipófisis, tumor de 20 células pequeñas y redondas, cáncer de células escamosas, melanoma, fibroxantoma atípico, seminomas, no seminomas, tumores de células de Leydig del estroma, tumor de células de Sertoli, tumores cutáneos, tumores de riñón, tumores testiculares, tumores de cerebro, tumores ováricos, tumores de estómago, tumores orales, tumores de vejiga, tumores óseos, tumores de cuello uterino, tumores esofágicos, tumores laríngeos, tumores de hígado, tumores de pulmón, tumores vaginales y tumor de Wilms.

Los ejemplos de cánceres particulares incluyen pero sin limitación adenocarcinoma, adenoma, adenofibroma, adenolinfoma, adontoma, cánceres relacionados con SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma alveolar de las partes blandas, ameloblastoma, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, apudoma, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, tumores de cerebro y SNC, cáncer de mama, branquioma, tumores de SNC, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, tumores de cerebro de la infancia, cáncer de la infancia, leucemia de la infancia, sarcoma de tejidos blandos de la infancia, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma cutáneo de linfocitos T, carcinoma (por ejemplo de Walker, de células basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, Krebs 2, de células de Merkel, mucinoso, de pulmón no microcítico, de células en grano de avena, papilar, cirroso, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas y de células transicionales), carcinosarcoma, displasia del cuello uterino, cistosarcoma filoides, cementoma, cordoma, coristoma, condrosarcoma, condroblastoma, craneofaringioma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, dermatofibrosarcoma protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, carcinoma ductal, disgerminoma, cánceres endocrinos, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer extrahepático de conducto biliar, cáncer de ojo, melanoma de ojo, retinoblastoma, cáncer de trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibroma, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, tumores de células gigantes, ganglioneuroma, glioma, glomangioma, tumor de células de la granulosa, ginandroblastoma, tumores malignos hematológicos, leucemia por tricoleucitos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, hamartoma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, hemangiosarcoma, trastornos histiocíticos, histiocitosis maligna, histiocitoma, hepatoma, hidradenoma, hondrosarcoma, pequeño inmunoproliferativo, opoma, melanoma ontraocular, cáncer de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer laríngeo, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leiomiomasarcoma, leucemia (por ejemplo de linfocitos B, de células mixtas, de células nulas, de linfocitos T, de linfocitos T crónica, asociada a HTLV-II, linfangiosarcoma, linfocítica aguda, linfocítica crónica, de mastocitos y mieloide), leucosarcoma, tumor de células de Leydig, liposarcoma, leiomioma, leiomiomasarcoma, linfangioma, linfangiocitoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, mucosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, síndrome carcinoide maligno, enfermedad carcinoide cardíaca, meduloblastoma, meningioma, melanoma, mesenquimoma, mesonefoma, mesotelioma, mioblastoma,

mioma, miosarcoma, mixoma, mixosarcoma, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de Nijmegen, cáncer de piel distinto de melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (nsclc), neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibromatosis, neurofibroma, neuroma, neoplasias (por ejemplo de hueso, de mama, de sistema digestivo, colorrectal, de hígado), cánceres oculares, cáncer de esófago, 5 cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer ovárico de ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de glándulas parótidas, cáncer peniano, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de la hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, osteoma, osteosarcoma, carcinoma ovárico, papiloma, paraganglioma, paraganglioma no cromafínico, pinealoma, plasmacitoma, protooncogén, cánceres poco habituales y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomioma, síndrome de 10 Rothmund-Thomson, reticuloendoteliosis, rhabdomioma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico (sclc), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, sarcoma (por ejemplo sarcomas experimental de Ewing, de Kaposi y de mastocitos), tumor de células de Sertoli, sinovioma, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer tiroideo, cáncer de células transicionales (vejiga), cáncer de células transicionales (pelvis renal/uréter), 15 cáncer trofoblástico, teratoma, tumor de células de la teca, timoma, tumor trofoblástico, cáncer uretral, cáncer de aparato urinario, uroplaquias, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Otras enfermedades y afecciones incluyen diversas afecciones inflamatorias. Los ejemplos pueden incluir un 20 componente proliferativo. Los ejemplos particulares incluyen acné, angina, artritis, neumonía por inhalación, enfermedad, empiema, gastroenteritis, inflamación, gastroenteritis vírica, nee, enterocolitis necrotizante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, pid, pleuritis, irritación de garganta, rojez, rubor, dolor de garganta, gastroenteritis vírica epidémica e infecciones del tracto urinario, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica o 25 polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

En otro caso se proporciona un uso de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFsv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. 30

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

En otro caso se proporciona un método para el diagnóstico de cáncer que incluye la etapa de poner en contacto 35 tejidos o células para los que la presencia o ausencia de cáncer debe determinarse con un reactivo en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición de diagnóstico como se ha descrito anteriormente y detectar la unión del reactivo con los tejidos o células. El método puede realizarse *in vivo* o *in vitro*.

Para diagnóstico *in situ*, el sitio de unión a antígeno puede administrarse al organismo para diagnosticar por 40 inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial u otras vías de modo que pueda producirse una unión específica entre un sitio de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación con una región epítópica 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 45 de detección conocido en la técnica.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico de acuerdo con la divulgación y como se describen en el presente documento, se basan típicamente en antígenos marcados, anticuerpos o reactivos secundarios para 50 detección. Estas proteínas o reactivos pueden marcarse con compuestos conocidos en general por los expertos habituales en la materia incluyendo enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo, pero sin limitación partículas coloreadas, tales como perlas coloidales de oro y 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 son necesarios resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren equipamiento caro para su uso, proporcionan un 55 método muy sensible de detección. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

Como alternativa, el sitio de unión a antígeno puede marcarse indirectamente por reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad por inmunoglobulina, tales como proteína A o G o anticuerpos secundarios. El sitio de unión 60 a antígeno puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tiene una afinidad por la segunda sustancia conjugada con el sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno puede conjugarse con biotina y el conjugado de sitio de unión a antígeno-biotina detectarse usando avidina o estreptavidina marcada. De forma similar, el sitio de unión a antígeno puede conjugarse con un hapteno y el conjugado de sitio de unión a antígeno-hapteno detectarse usando anticuerpo antihapteno marcado. 65

En ciertos casos, los inmunoensayos utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en el que, el sitio de unión a antígeno se marca indirectamente por reactividad con un 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 se obtiene el sitio de unión a antígeno. En otras palabras, si el sitio de unión a antígeno es un anticuerpo de ratón, entonces el segundo anticuerpo, marcado, es un anticuerpo anti ratón. Para usar el sitio de unión a antígeno 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 ensayo descrito en el presente documento, el marcador es preferentemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

También puede emplearse un sistema de doble anticuerpo alternativo, denominado con frecuencia sistemas de formato rápido debido a que se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito, dentro del alcance de la presente divulgación. El sistema requiera 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 un "sitio de unión a antígeno" 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 a antígeno 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 el sitio de unión a antígeno de captura de forma irreversible en un soporte sólido. El sitio de unión a antígeno detector contendría un marcador detectable, para identificar la presencia del sándwich de sitio de unión a antígeno-analito y por lo tanto la presencia del analito.

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

Se pretende que los ejemplos a continuación ilustren la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación y purificación de anticuerpo 2F6

Objetivo: Los experimentos descritos aquí detallan la generación y purificación de un anticuerpo que se une con el receptor P2X₇ expresado en células vivas. En particular, los experimentos describen la generación y purificación de un anticuerpo con la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 4 (2F6).

Antecedentes: Se conocen sitios de unión a antígeno que se unen con un monómero de receptor P2X₇, sin embargo, hasta la fecha no se conoce ningún anticuerpo que se una específicamente con epítomos conformacionales en receptores P2X₇ expresados en células vivas en una forma trimérica, específicamente que abarcan la interfaz entre monómeros adyacentes. Los sitios de unión a ATP se forman en la interfaz empaquetada correctamente entre monómeros con los restos 200-210 en un monómero y restos 296-306 en el monómero adyacente expuesto cuando los receptores son incapaces de unirse con ATP como sucede en células cancerosas.

Materiales y métodos: Generación de péptido E200 y E300. El epítopo peptídico complejo E200-300 formado parcialmente a partir de un péptido E200 (restos 200-211 en la secuencia de receptor P2X₇ humano) y un péptido E300 (restos 295-306 en la secuencia de receptor P2X₇ humano) separados con la adición del dipéptido GA se preparó por síntesis de fase sólida en Chiron Mimotopes. Se sintetizó una serie de conjugados para identificar los que más probablemente sean útiles para fines de exploración. Estos incluyeron conjugados proteicos BSA, DT, ovoalbúmina y KLH unidos con el resto Cys C terminal en el péptido E200-300 mediante maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS). Una cuarta variante implicó biotinar el péptido E200-300 en el extremo C.

Se inmunizaron ratones BALB-C con E200-300 conjugado con toxina diftérica (E200-300DT) usando 25 µg/dosis los días 0, 16, 37, 56, 88 y 162. El día 0 se proporcionó una inyección por vía subcutánea (sc) en adyuvante de CpG (ImmunoEasy, Lote n.º 11547836, 11235150 y 11549008, Qiagen). El día 16, 37 y 88 se proporcionaron inyecciones, la mitad sc y la mitad por vía intramuscular (im). El día 56 y 162 se proporcionaron inyecciones por vía intravenosa (iv). Cuatro días después del refuerzo iv final, se tomaron muestras de sangre de los ratones inmunizados y sus sueros se exploraron con respecto a actividad de E200-300 anti P2X₇ por ELISA. Los tres animales que mostraban

el mayor título de E200-300 anti P2X7 se sacrificaron y se retiraron sus bazos. Las células del bazo se aislaron y se fusionaron con células de la línea celular de mieloma de ratón Sp2/0 a una relación de 5:1. Se sembraron células fusionadas en placas en medio RPMI 1640. Se seleccionaron hibridomas sucesivamente en HAT seguido de HT, complementado con IL-6 de ratón. Los clones candidatos adecuados se identificaron inicialmente como positivos para ELISA en exploraciones tanto de fase sólida como de fase de solución. Se extrajeron agentes de unión de baja afinidad y el ADN se secuenció después a partir de los clones candidatos antes de silenciamiento inducido por los efectos del producto de anticuerpo clonal en la supervivencia de la célula hospedadora.

Resultados: Después de sembrar las células fusionadas en 8 placas x 96 pocillos y dos etapas de clonación, por dilución a 0,3 células por pocillo, un clon reactivo con conjugado de albúmina de suero bovino (BSA) E200-300 de P2X₇ por ELISA, sobrevivió y se designó 2F6. El clon se subclonó y se secuenciaron cada uno de los 24 productos designados 2F61-2F24. Los anticuerpos en cada caso fueron de clase IgM con cadenas ligeras kappa.

Se confirmó que cada subclón tenía una secuencia idéntica. Las cadenas V_H y V_L se extrajeron y se cortaron y empalmaron en una secuencia de IgG2a de ratón (Figuras 2 y 3) para el fin de desarrollo molecular adicional mientras que IgM se cultivó en líquido ascítico de ratón para caracterización adicional.

La figura 6 muestra la secuencia del scFv 2F6 con marcadores de FLAG y HIS C-terminales para caracterizaciones bioquímicas.

El ratón IgG2a-2F6 se dejó crecer en células HEK293 parentales transfectadas con pcDNA3.1-mlgG2a-2F6 que portan resistencia a G418. Las células se seleccionaron en G418 durante 21 días para crear el grupo resistente.

Se realizó expresión estable durante un cultivo discontinuo de siete días a 37 °C en un biorreactor Wave con una CultiBag Sartorius de 20 l. La expresión se realizó en medio de expresión Invitrogen Freestyle 293 con pH mantenido entre 7,3 y 6,8 con control de CO₂. El cultivo se centrifugó para retirar las células y el sobrenadante recogido se procesó inmediatamente.

Tabla 6: Sumario de cultivo celular

	Proceso	Resultado/comentario
Línea celular	Células HEK293	Línea celular estable que expresa IgG2a-2F6 de ratón
Medio	Invitrogen Freestyle 293	Invitrogen Freestyle 293
Volumen de cultivo diana	10 l	10 l
Densidad de inoculación	0,2x10 ⁶ células/ml	0,2x10 ⁶ células/ml
Recogida	Después de 7 días de duración del cultivo	2,9x10 ⁶ células/ml 71 % viable
<i>Recuentos celulares realizados por exclusión con azul de tripano en Cedex HiRes, Innovatis</i>		

Se ajustó el pH del sobrenadante recogido a 7,1 y se filtró a 0,2 µm antes de cargar durante una noche en una columna de proteína A de 61 ml (GE Healthcare, rProteína A Sepharose FF). La columna se limpió con 2 VC de Triton X-100 0,1 % seguido de limpieza con ácido acético 0,1 M en etanol 20 % antes de su uso. El anticuerpo se eluyó de la columna en la dirección inversa con un gradiente por etapas hasta ácido acético 0,1 M. El pico eluido se neutralizó con acetato sódico 1 M hasta pH 5.

Tabla 7: Sumario de cromatografía de proteína A

	Proceso	Resultado/comentario
Sobrenadante recogido	Ajuste de pH a 7,1 con Tris 1 M, pH 8,3	Adición de 10 ml
		pH inicial = 7,03
		pH final = 7,08
Equilibrado	≥ 5 VC DPBS 1x, pH ~7,4	6,8 VC
Carga	≥ 1 min de tiempo de residencia	10 ml/min (6,1 min de tiempo de residencia)
Lavado	≥ 3 VC DPBS 1x	5,3 VC
Elución	≥ 3 VC ácido acético 0,1 M	3,4 VC
Pico	Recogido manualmente	35 ml
Neutralización	Acetato sódico 1,0 M	3,5 ml

El pico neutralizado se filtró por 0,2 µm para retirar cualquier partícula antes del intercambio aniónico. El pico neutralizado por filtración se cargó en una columna de intercambio aniónico de 54 ml (GE Healthcare, Q Sepharose FF). La columna se limpió y esterilizó con hidróxido sódico 0,5 M antes de un lavado de alta salinidad y equilibrado en ácido acético 0,1 M, pH 5,0. El tampón de ejecución fue ácido acético 0,1 M, pH 5,0. Se recogió el flujo continuo de la etapa de intercambio aniónico.

Tabla 8: Sumario de cromatografía de intercambio aniónico

	Proceso	Resultado/comentario
Lavado de alta salinidad	≥ 1 VC ácido acético 0,1 M, NaCl 2 M, pH 5,0	1 VC
Equilibrado	≥ 5 VC de ácido acético 0,1 M, pH 5,0	5,3 VC
Carga	No especificado	10 ml/min (5,4 min de tiempo de residencia)
Flujo continuo	Recogido manualmente	64,8 ml
Producto concentrado	Producto de retención de ultrafiltración	23 ml

10 El flujo continuo de intercambio aniónico concentrado se cargó directamente en una columna de desalación de 140 ml (GE Healthcare, Sephadex G-25 fine). La columna se limpió y esterilizó con hidróxido sódico 0,2 M antes de equilibrado en DPBS 1x. El tampón de ejecución fue DPBS 1x.

En un armario de bioseguridad, el producto desalado se filtró a través de un filtro de 0,2 µm en un recipiente estéril.

15 Las muestras de producto final se retiraron asépticamente del volumen filtrado. Las muestras de volumen filtrado y producto final se almacenaron a 4 °C.

Tabla 9: Sumario de intercambio de tampón

	Proceso	Resultado/comentario
Equilibrado	DPBS 1x, pH ~ 7,4 (hasta que la conductividad alcance un nivel estable y el pH sea neutro)	Como el patrón
Carga	Máximo de 28 ml	23 ml cargados
Pico	Recogido manualmente	39,9 ml
Filtración	filtro de 0,2 µm en armario de bioseguridad	Millex GV, filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm, 33 mm
Producto final	Masa o volumen	37,6 ml

20

El producto final se ensayó con respecto a concentración de proteínas, endotoxina, contenido de ADN, pureza y agregación. El producto se almacenó a 4 °C antes del análisis.

Tabla 10: Sumario de resultados de ensayo para producto final

25

Ensayo	Método de ensayo	Especificación	Resultado	Aprobado/suspenso
Concentración de proteínas	Absorbancia a 280 nm, CE = 1,4	≥ 1,0 mg/ml	1,6 mg/ml	Aprobado
ADN	kit Invitrogen Quant-iT PicoGreen	≤ 380 ng/ml	15 ± 1 ng/ml	Aprobado
Endotoxina	Cartucho Charles River Endosafe PTS 0,05 - 5 UE/ml	< 3 UE/ml	0,121 UE/ml (0,076 UE/mg)	Aprobado
Agregación y pureza	SE-HPLC TOSOH Biosciences TSKgel G3000 SWXL	≤5 % de agregación ≥ 95 % puro	< 1 % agregado > 98 % puro (Figura 7)	Aprobado
SDS-PAGE	NuPAGE gel Bis-Tris 4-12 %, tampón MOPS, SimplyBlue Safe Stain	Para información	(Figura 8)	N/D

El mismo scFv de ratón de 2F6 se injertó en un formato humano de tipo IgG1 y se expresó de forma similar en células HEK293.

Conclusión: Se identificaron sitios de unión a antígeno en forma de candidatos para unión de alta afinidad con receptores P2X₇ en células vivas. Los sitios de unión a antígeno se seleccionaron para que abarcaran la interfaz entre monómeros adyacentes que forman el receptor trimérico cuando se expone el sitio de unión a ATP subyacente en conformación de receptor no funcional. El epítipo de compuesto diana debía permanecer inaccesible en la conformación sencilla del receptor ensamblado con capacidad de función para evitar toda la reactividad cruzada con células normales que expresan el receptor P2X₇.

Ejemplo 2 - Caracterización bioquímica de formas del anticuerpo 2F6

Objetivo: Determinar si las formas del anticuerpo 2F6, incluyendo la IgM e IgG2a de ratón, se unen con receptores no funcionales en la superficie de células vivas. Además, para determinar si las formas del anticuerpo 2F6 inhiben una propiedad de una célula, por ejemplo una célula cancerosa, que expresa receptores P2X₇ no funcionales.

Antecedentes: Se sabe que las células cancerosas expresan receptores no funcionales que consisten en un trímero de monómeros del receptor P2X₇. Cuando son capaces de actuar, los receptores P2X₇ en la superficie celular se unen con ATP con el efecto de que el canal formado entre los monómeros ensamblados en un trímero experimenta una transición a un poro más amplio capaz de aumentar en gran medida la entrada de iones de calcio en la célula para iniciar la actividad caspasa que conduce a apoptosis y muerte celular. La apoptosis se detiene o se inhibe en células cancerosas que son incapaces de morir incluso aunque el receptor P2X₇ se despliegue en la superficie celular. Estos receptores se denominan P2X₇ no funcionales y se han descubierto en una amplia diversidad de cánceres.

Resultados: Las formas del anticuerpo 2F6, tanto IgM (Figuras 9a-d) como IgG2a (Figura 9e), inhibieron el crecimiento celular en una serie de líneas celulares de cáncer incluyendo PC3 de próstata, COLO205 de colon, MDAMB231 de mama, A375 de melanoma y MCF7 de mama como se determina en un ensayo Cell Titer Blue de crecimiento celular. Las células se sembraron a densidad apropiada y se cultivaron durante un periodo de 3 días o 5 días hasta alcanzar un nivel cercano a la confluencia al final del periodo de ensayo en presencia de anticuerpos de control y en presencia de anticuerpos de ensayo, de tipos bien IgM o bien IgG2a de 2F6 sobre el intervalo de concentración 0-40 µg/ml. Se realizó ensayo de crecimiento de línea celular con densidades de siembra que varían de 100-2000 células/pocillo. En comparación con los anticuerpos de control que no tenían ningún efecto en el crecimiento de los diversos tipos de células tumorales, una concentración creciente de tipos IgM o IgG2a de 2F6 inhibió el crecimiento celular.

La Figura 10 muestra datos de crecimiento de células MCF7 en presencia o ausencia de 10 µg/ml de anticuerpo IgM 2F6. La presencia del anticuerpo inhibe en gran medida el crecimiento celular durante 3 días mientras que la preincubación del anticuerpo con epítipo peptídico soluble a 5-50 µg/ml no tiene ningún efecto en la inhibición. Sin embargo, a 500 µg/ml del péptido, el anticuerpo ya no es capaz de afectar al crecimiento celular ya que el péptido secuestra eficazmente el anticuerpo disponible, evitando que se una con los receptores en la superficie celular.

Un modo de acción por el que el 2F6 es capaz de inhibir el crecimiento celular se determinó por un ensayo de apoptosis ApoOne en el que la actividad caspasa 3/7 se midió en combinación con crecimiento celular mediante el ensayo Cell Titer Blue. Se cultivaron células Colo205 en un ensayo de crecimiento de 3 días con 2F6 creciente de 0-40 µg/ml. El control positivo de gemcitabina se añadió para establecer el grado de apoptosis que puede inducirse por la presencia de anticuerpo unido. La Figura 11 revela claramente que se inicia apoptosis en presencia de anticuerpo creciente, siendo 20-40 µg/ml suficiente para iniciar la actividad completa.

La apariencia de células MCF7 cultivadas en 20 µg/ml del IgM 2F6 en comparación con anticuerpo de control que no se une con las células se muestra en las imágenes confocales en la Figura 12 en la que muchas células ya están muertas después de solo 24 horas de exposición.

Conclusión: La interacción de formas del anticuerpo 2F6, tanto IgM como IgG2a, con receptores P2X₇ no funcionales en células cancerosas provoca inhibición del crecimiento celular e inducción de la apoptosis y muerte celular.

Ejemplo 3 - Unión de anticuerpo con tejido tumoral vivo

Objetivo: Establecer si anticuerpos dirigidos a un epítipo compuesto accesible único que abarca monómeros adyacentes dentro del trímero de P2X₇ expresado en superficies de células cancerosas son más capaces de unirse diferencialmente a la diana en la superficie de células cancerosas vivas en comparación con diana residual en células cancerosas muertas.

Antecedentes: El anticuerpo 2F6 se une entre monómeros adyacentes en receptores P2X₇ expresados en células cancerosas pero no en receptores que se expresan en células normales que expresan receptores P2X₇ funcionales o con capacidad de función tales como los que están en glóbulos blancos y rojos. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente con receptores P2X₇ no funcionales dirigiéndose a un epítipo confinado a un monómero del

receptor también es capaz de unirse con dichas dianas monoméricas que pueden liberarse del compartimento citoplasmático de células muertas, reduciendo de este modo el potencial terapéutico a medida que se une parcialmente con receptores P2X₇ de células muertas además de receptores P2X₇ de células vivas que necesitan un aumento de la dosificación eficaz.

5

Materiales y métodos: Se trataron ratones BALB/c hembra inoculados con los tumores mamarios murinos 4T1 ortotópicos singénicos en sus tercetos panículos adiposos mamarios o ratones hembra NOD/SCID inoculados con el tumor de xenoinjerto Hep3b ortotópico humano en sus hígados por vía intravenosa con un anticuerpo de dominio humano (2-2-1 hFc) dirigido a una diana monomérica (epítipo E200 en P2X₇) o 2F6-hlgG1 dirigido al epítipo compuesto E200-300. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética animal en la Universidad de Adelaida (M46-2008). Se midió la penetración de anticuerpos en los tumores usando anticuerpo de cabra antihumano de Jackson Immunosearch en secciones tumorales que se retiraron de los ratones dos días después del tratamiento con anticuerpo. Los tumores se fijaron en formalina tamponada neutra 10 % durante 48 horas, se incluyeron en parafina, se cortaron hasta 5 µm, se desparafinizaron y se tiñeron para anticuerpo humano. Se usó el sistema de detección secundaria Biocare Mach 4, que comprende una sonda de anticuerpo de cabra específica seguido de un polímero con HRP y después se tiñó con DAB.

Resultados: Los anticuerpos que se dirigen al sitio de unión a monómero E200 dentro del trímero se unen con células vivas dentro de los tumores 4T1 (Figura 13a) aunque se unen de forma similar con células que están muertas y que mueren junto con residuos celulares (Figura 13b). En el caso de los tumores de pulmón de Lewis, la unión a células vivas (Figura 13c) parece moderada y membranosa pero las células ya destruidas (Figura 13d) siguen siendo capaces de secuestrar dichos anticuerpos (2-2-1 hFc).

Se investigaron los mismos tipos tumorales con respecto a unión residual a células vivas y muertas usando hlgG1 2F6. La unión con células vivas en 4T1 mostró marcador membranoso claro (Figura 14a) y a diferencia del agente de unión 2-2-1 hFc, se inhibió en gran medida la unión del anticuerpo que se unía con la interfaz entre monómeros con residuos celulares aunque permaneció unido a células moribundas (Figura 14b). De forma similar la unión a tumores de pulmón de Lewis mostró unión membranosa fuerte (Figura 14c). Las células moribundas tuvieron marcaje de anticuerpo residual pero los residuos celulares permanecieron claros (Figura 14d). La figura también muestra glóbulos rojos que permanecen totalmente sin marcar, incluso aunque expresan receptores P2X₇, aunque en una conformación con capacidad de función que no expone el epítipo E200-300 al anticuerpo.

Conclusión: Se produjeron sitios de unión a antígeno de modo que un anticuerpo dirigido contra la diana compleja que abarca la interfaz entre monómeros tuvo una ventaja sobre los anticuerpos restringidos a un sitio de unión en el monómero porque mucho menos del anticuerpo 2F6 se dirigió erróneamente por la unión con residuos celulares creados a partir de la muerte de células vivas reduciendo de este modo la dosis terapéutica requerida.

Ejemplo 4 - Eficacia terapéutica de hlgG1 2F6

Objetivo: La eficacia terapéutica de hlgG1 2F6 se determinó en modelos de tumores de xenoinjertos de ratón y se comparó con un anticuerpo policlonal de oveja de alta afinidad inducido para la misma diana y purificado por afinidad.

Antecedentes: Los anticuerpos dirigidos a la diana epítópica monomérica E200 en P2X₇ no funcional expresado en células cancerosas han mostrado efectos terapéuticos de destrucción de células tumorales e inhibición del crecimiento tumoral. Estos anticuerpos terapéuticos se unieron en el intervalo subnanomolar, constante de unión dos log mayor que la que muestra hlgG1 2F6. Se desarrolló un anticuerpo policlonal de oveja de afinidad similarmente alta con el mismo epítipo E200-300 compuesto para examinar la eficacia probable de un anticuerpo de la forma de 2F6 después de maduración de afinidad para mejorar la constante de unión.

50

Materiales y métodos:

Se obtuvieron reactivos para cultivo de células de tumor de mama 4T1 de los siguientes proveedores: medio de cultivo celular RPMI 1640, FCS, Glutamax, HBSS y penicilina-estreptomina de Invitrogen Australia (Mt Waverley, VIC, Australia); y azul de tripano de Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia). Se obtuvo Matrigel™ de BD Biosciences (North Ryde, NSW, Australia).

Se obtuvo solución salina estéril (solución de cloruro sódico acuosa 0,9 %) de Baxter Healthcare Australia (Old Toongabbie, NSW, Australia). Se obtuvo solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Sigma-Aldrich. Se obtuvo formalina (formalina tamponada neutra 10 %) de Australian Biostain (Traralgon, VIC, Australia).

Se obtuvieron materiales para tinción por hematoxilina y eosina de secciones tumorales de los siguientes proveedores: portaobjetos Superfrost Plus de Menzel (Alemania); hematoxilina y eosina de alumbre de HD Scientific (NSW, Australia); Etanol, ácido clorhídrico concentrado y carbonato de litio de Sigma Aldrich; medio de montaje DePex de BDH (Reino Unido). Las células tumorales se obtuvieron de la colección americana de cultivos tipo

65

(ATCC) (Rockville, MD, EE.UU.).

Las células tumorales (pase 2 de reserva de trabajo) se cultivaron en medio de cultivo celular RPMI 1640, complementado con FCS 10 %, Glutamax 1 % y penicilina-estreptomicina 1 %. Las células se recogieron por
5 tripsinización, se lavaron dos veces en HBSS y se contaron. Después las células se resuspendieron en HBSS:Matrigel™ (1:1, v/v) hasta una concentración final de 5×10^7 células/ml.

Se realizó dosificación cada 3 días a concentraciones de anticuerpo de 1 o 10 mg/kg i.v. o con PBS para control del
10 tratamiento o Sorafenib a 5 ml/kg diariamente como un control positivo en el modelo de pulmón de Lewis. Los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos iguales de 10 ratones, basándose en el volumen tumoral el día 0 de los estudios.

Cualquier animal debió retirarse del estudio si su volumen tumoral alcanzó 2.000 mm^3 . El tratamiento de cualquier
15 animal cesaría si su peso corporal descendiera hasta menos del 85 % de la entrada en el estudio. Los animales también se sacrificaron si se observó reacción adversa grave al tratamiento.

Los ratones se anestesiaron para recogida de sangre y se sacrificaron por exsanguinación mediante hemorragia
cardíaca terminal 48 horas después de la dosis final, los días 11 o 14 después del tratamiento inicial.

20 Se recogió sangre completa mediante punción cardíaca de todos los ratones en todos los grupos en el momento de la terminación.

Se permitió que las muestras coagularan a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido de 2 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$,
25 después se centrifugaron ($2000 \times g$) durante 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El componente de suero se recogió en crioviales nuevos y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

El tumor se escindió de todos los ratones en todos los grupos, se pesó y se conservó en formalina tamponada neutra
10 %.

30 Los pulmones se escindieron de todos los ratones. Las metástasis de superficie pulmonar se contaron y se clasificaron según el tamaño: pequeñas ($< 1 \text{ mm}$), medias ($\geq 1 \text{ mm}$ y $< 3 \text{ mm}$) y grandes ($\geq 3 \text{ mm}$). Los pulmones escindidos se conservaron en formalina tamponada neutra 10 %.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron usando SigmaStat 3.0 (SPSS Australasia, North Sydney, NSW,
35 Australia).

Se usó un ensayo de t para muestras relacionadas para determinar la significación en el cambio de peso corporal
dentro de un grupo de tratamiento entre el día 0 y el día de medición final para el grupo. Solamente se incluyeron en
40 el análisis los ratones que sobrevivieron hasta el día de terminación.

Se realizó un ensayo de t sobre pesos tumorales, tamaño tumoral histológico y recuentos de metástasis de pulmón e
hígado en todos los animales.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía sobre pesos tumorales, tamaños tumorales histológicos y
45 recuentos de metástasis de pulmón e hígado en todos los grupos que sobreviven hasta los días de terminación de los estudios (día 14 para 4T1 y día 11 para pulmón de Lewis)

Cuando se encontraron diferencias significativas usando el ANOVA de una vía, se realizaron múltiples
50 procedimientos de comparación frente a grupo de control (método de Holm-Sidak). El control preinmunitario (grupo 2) se usó como el grupo de control el día 9. Como los ratones en este grupo habían muerto se usó el control de vehículo (grupo 1) como el grupo de control el día 14. Aunque en algunos casos los datos suspendieron el ensayo de normalidad o ensayo de igual varianza, se realizaron análisis estadísticos usando valores absolutos.

Un p valor de menos de 0,05 se consideró significativo.

55 **Resultados:** Después de 14 días los pulmones de ratón 4T1 se escindieron de los ratones BALBc para medir el número de metástasis de pulmón. El grupo de control de 10 ratones tuvo $6,4 \pm 1,0$ mientras que el grupo tratado con hlgG1 2F6 mostró $3,4 \pm 0,7$ o 53 % de control como se muestra en la Figura 15. El volumen de metástasis promedio en los dos grupos se redujo adicionalmente de $5,77$ a $1,28 \text{ mm}^3$ o 22 % y el volumen de metástasis total se redujo en
60 88 % de 369 a 43 mm^3 u 11,8 % del control.

El modelo de pulmón de Lewis singénico se usó con grupos de control adicionales. Además del grupo de control de
PBS de diez ratones (grupo 1), se incluyó un grupo de control positivo usando diariamente Sorafenib a 5 ml/kg
(grupo 5) junto con grupo de tratamiento de anticuerpo que consistían en anticuerpo policlonal E200-300 de oveja de
65 afinidad purificada a 10 mg/kg (grupo 2), hlgG1 2F6 a 1 mg/kg (grupo 3) y hlgG1 2F6 a 10 mg/kg (grupo 4). Los

resultados obtenidos fueron:

	Metástasis de superficie pulmonar medias	ETM
Grupo 1	2,3	0,4
Grupo 2	0,1	0,1
Grupo 3	0,9	0,2
Grupo 4	0,2	0,1
Grupo 5	0,1	0,1

Estos resultados se resumen en la Figura 16. La reducción en metástasis tumorales entre el grupo de control 1 y todos los otros grupos es significativa a $p < 0,001$. El anticuerpo de oveja de alta afinidad inhibió la formación tumoral igualmente bien con el 2F6 monoclonal de afinidad mucho menor a 10 mg/kg, ambos iguales al control positivo de Sorafenib, todos con 96 % de inhibición en relación con control de PBS.

Conclusión: El sitio de unión de epítipo entre monómeros complejo diana es accesible en células tumorales. Los anticuerpos con una K_d que varía de 0,5 nM (policlonal purificado por afinidad de oveja) a 50 nM (hIgG1 2F6) muestran eficacia similar, lo que sugiere que una constante de unión óptima para un producto terapéutico humano está en el intervalo de nM bajo.

Ejemplo 5 - Generación y purificación de sitios de unión a antígeno de afinidad madurada

Objetivo: Los experimentos descritos aquí fueron para desarrollar formas de anticuerpos (es decir scFv/Fab) que mostraban constantes de unión aumentadas para mejorar la unión específica con los receptores P2X₇ en células cancerosas sin receptores funcionales de unión en cualquier célula normal tales como linfocitos y por lo tanto obtener inhibición del crecimiento de células cancerosas a una concentración de anticuerpos menor que lo que se consiguió con el monoclonal 2F6 recombinante WT.

Antecedentes: Las formas del anticuerpo 2F6 mostraron unión específica con receptores P2X₇ en células cancerosas vivas sin embargo para su uso como un producto de diagnóstico o terapéutico un anticuerpo puede requerir afinidad mejorada.

La secuencia de CDR3 HYSSRFFDV de 2F6 se usó como un punto de partida para ciclos iterativos de selección aleatoria y exploración debido a que se creyó más probable producir candidatos a anticuerpo con afinidades aumentadas que podrían explorarse para fines de ensayo en modelos de ensayo terapéuticos.

Materiales y métodos: Los fragmentos de genes V_H y V_L de 2F6 se amplificaron y se ensamblaron en un vector de expresión/secreción de *E. coli*. Tanto el scFv 2F6 como Fab se transformaron en *E. coli* y se indujo la expresión de la construcción génica. Los cultivos de *E. coli* se recogieron 5 horas después de la inducción y los scFv y Fab se analizaron con respecto a unión usando ELISA y Biacore contra antígeno inmovilizado E200-300.

Se combinaron métodos de exploración incluyendo SDS-PAGE y secuenciación N-terminal con ELISA, Biacore y citometría de flujo contra células cancerosas para determinar las características biofísicas del sitio de unión a antígeno en los dominios de unión de anticuerpo de control antes de la maduración de afinidad.

Se introdujo mutagénesis del scFv 2F6 mediante una combinación de PCR propensa a errores, selección aleatoria de NNK y variación de longitud de secuencia de HCDR3. Una biblioteca mutada en el vector de fagémido fue del orden 1×10^7 . La exploración de la biblioteca con respecto a mutantes de mayor afinidad empleó una combinación de presentación en fagos con ensayos de expresión de filtros usando antígeno E200-300 biotinilado. Una selección de clones de fagos candidatos de scFv de mayor afinidad experimentaron expresión a pequeña escala de fragmentos de anticuerpos solubles con afinidades medidas usando ELISA y Biacore.

Resultados: Las secuencias de HCDR3 de derivados de scFv/Fab obtenidos de la maduración de afinidad que mostraron unión potenciada sobre el 2F6 se muestran en la Figura 17.

Se muestran constantes de unión en el ELISA y la tabla sumario en la Figura 18. El IgM multivalente tiene una CE_{50} mayor que el formato IgG para la diana de epítipo. El Fab recombinante 2F6 muestra unión mucho menor (2 log) que los candidatos de afinidad madurada seleccionados.

Conclusión: Se produjeron sitios de unión a antígeno murinos de modo que en un formato Fab se mejoró la afinidad en relación con el anticuerpo monoclonal 2F6 recombinante.

Ejemplo 6 - Caracterización bioquímica de Fab de afinidad madurada

Objetivo: Determinar si los Fab de afinidad madurada mostraron especificidad por receptores P2X₇ no funcionales en células vivas.

5

Antecedentes: El anticuerpo 2F6 parental forma IgM e IgG2a solamente se unió con receptores P2X₇ no funcionales en células vivas con alta afinidad, no receptores P2X₇ monoméricos ni receptores P2X₇ funcionales. Se realizaron experimentos para confirmar que esta especificidad no se perdió durante maduración de afinidad.

10 **Materiales y métodos:** Se usó citometría de flujo para medir la unión potenciada de Fab recombinantes de afinidad madurada seleccionados en líneas celulares COLO-205 y PC3 humanas sobre la de la secuencia de 2F6 de partida. Los Fab marcados con FLAG recombinantes se unieron con células y se detectaron usando un anticuerpo anti FLAG monoclonal murino F4049 de Sigma conjugado con FITC usado a una concentración de 1:75. El anticuerpo 200-300 de oveja purificado por afinidad se examinó para comparación directa con el mlgG2a 2F6 WT por Flow a células
15 PC3.

Resultados: Los Fab se unieron selectivamente a receptores no funcionales en células COLO-205 vivas (Figura 19a) y células PC3 (Figura 19b) con mayor afinidad que el Fab 2F6 WT. Se observaron afinidades similares usando diversos preps de formato mlgG2a 2F6 que muestran afinidad potenciada sobre la secuencia WT (Figura 20). Por el
20 contrario, Cuando estos mismos Fab purificados por afinidad recombinantes se ensayaron frente a linfocitos humanos que expresaban receptores P2X₇ funcionales, se produjo unión insignificante. Se añadió un control de HLA positivo (Figura 21). En comparación con mlgG2a 2F6 WT, la unión con células PC3 por Flow usando el E200-300 policlonal de oveja purificado por afinidad mostró unión mucho mayor (Figura 22), en línea con las mejoras esperadas de maduración de afinidad.

25

Conclusión: Se han generado Fab y scFv selectivos, de alta afinidad, que son útiles para fines de diagnóstico y terapéuticos, en línea con el nivel obtenido de un título de antisuero de oveja policlonal que ha mostrado en sí mismo eficacia terapéutica significativa como se muestra en estudios de xenoinjertos de ratón.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biosceptre International Limited

35

<120> Anticuerpos para receptores P2X7 oligoméricos no funcionales

<130> P39112EP-PCT

<140> EP10838429.8

<141> 23/12/2010

40

<150> AU2009906286

<151> 24/12/2009

<160> 41

45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 595

50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

55

<400> 1

ES 2 667 003 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
 100 105 110

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

ES 2 667 003 T3

Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160

Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175

Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190

Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205

Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220

Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240

Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255

Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270

Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285

Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300

Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320

Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335

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

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

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

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

ES 2 667 003 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590

Ser Pro Tyr
 595

<210> 2
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 2

5

10

ES 2 667 003 T3

Ser Asp Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His
1 5 10 15

Thr Lys Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn
20 25 30

Gly Val Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr
35 40 45

Phe Pro Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys
50 55 60

Thr Glu Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg
65 70 75 80

Thr Leu Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro
85 90 95

Gln Ser Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn
100 105 110

Gln Lys Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu
115 120 125

Glu Ala Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val
130 135 140

Leu Ile Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg
145 150 155 160

Asn Ile Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln
165 170 175

Asn Pro Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr
180 185 190

Gly Asp Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile
195 200 205

Glu Ile Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg
210 215 220

Pro Lys Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser
225 230 235 240

Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn
245 250 255

ES 2 667 003 T3

Asn Val Glu Lys
260

5 <210> 3
<211> 287
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 3

Val Ser Asp Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val
1 5 10 15

His Thr Lys Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu
20 25 30

Asn Gly Val Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr
35 40 45

Thr Phe Pro Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu
50 55 60

Lys Thr Glu Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg
65 70 75 80

Arg Thr Leu Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp
85 90 95

Pro Gln Ser Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly
100 105 110

Asn Gln Lys Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val
115 120 125

Glu Glu Ala Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr
130 135 140

Val Leu Ile Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr
145 150 155 160

Arg Asn Ile Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr
165 170 175

Gln Asn Pro Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu
180 185 190

ES 2 667 003 T3

Thr Gly Asp Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly
 195 200 205

Ile Glu Ile Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys
 210 215 220

Arg Pro Lys Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu
 245 250 255

Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe
 260 265 270

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

<210> 4
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 4

Met Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
 1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly
 20 25 30

Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
 65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
 85 90 95

Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 100 105 110

5

10

ES 2 667 003 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Lys Leu
 115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly Ser Leu Lys Leu
 130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Met Ser Trp
 145 150 155 160

Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Ala Ile Asn
 165 170 175

Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser
 195 200 205

Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys Thr Arg His Tyr
 210 215 220

Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val
 225 230 235 240

Ser Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Ala Ala Ala
 245 250 255

His His His His His His
 260

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

10 <220>
 <223> péptido
 <400> 5

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

15 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido
 <400> 6

ES 2 667 003 T3

Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Ser
1 5

5 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido
<400> 7

Asn Phe Leu Glu Ser Tyr Phe Glu Ala
1 5

15 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido
<400> 8

Asn Tyr Arg Gly Asp Tyr Tyr Glu Thr
1 5

30 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> péptido
<400> 9

His Tyr Ser Lys Glu Tyr Tyr Asn Ile
1 5

40 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido
<400> 10

His Phe Gln Arg Gly Tyr Tyr Asn Ile
1 5

50 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> péptido
<400> 11

ES 2 667 003 T3

Tyr Phe Pro Leu Val Tyr Tyr Asp Val
1 5

5 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 12

Asn Tyr Leu Pro Met Tyr Tyr Glu Val
1 5

15 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 13

Asn Phe Lys Leu Met Tyr Tyr Asn Val
1 5

25 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> péptido

<400> 14

His Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Asp Val
1 5

35 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> péptido

<400> 15

His Tyr Ile Lys Val Tyr Tyr Glu Ala
1 5

45 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> péptido

<400> 16

60

ES 2 667 003 T3

His Tyr Ser Ser Arg Phe Phe Glu Val
1 5

5 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido

<400> 17

Asn Phe Arg Val Met Phe Phe Lys Ala
1 5

15 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido

<400> 18

25 **His Tyr Ser Ser Arg Phe Phe Glu Val**
1 5

30 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido

<400> 19

Tyr His Val Ile Gln Tyr Leu Gly Pro
1 5

40 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido

<400> 20

50 **Asp Phe Thr Val Pro Phe Tyr Asn Ala**
1 5

55 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> péptido

ES 2 667 003 T3

<400> 21

Asn Tyr Asp Lys Lys Tyr Phe Asp Val
1 5

5 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 22

Tyr Phe Pro Leu Val Tyr Tyr Asp Val
1 5

15 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 23

Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5

30 <210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> péptido

<400> 24

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

40 <210> 25
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 25

50 Met Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
20 25

55 <210> 26
<211> 15
<212> PRT

ES 2 667 003 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

5 <400> 26

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr
1 5 10 15

10 <210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> péptido

<400> 27

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Phe Phe Cys
20 20 25 30

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> péptido

30 <400> 28

Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

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

35 <220>
<223> péptido

40 <400> 29

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

45 <210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> péptido

ES 2 667 003 T3

<400> 30

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

5

<210> 31
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> péptido

<400> 31

15

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

Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> péptido

25

<400> 32

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> péptido

<400> 33

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

40

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> péptido

50

<400> 34

His Tyr Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val
1 5

55

<210> 35
<211> 118

ES 2 667 003 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido

<400> 35

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg His Tyr Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 36
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> péptido

20

<400> 36

ES 2 667 003 T3

Met Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
 1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly
 20 25 30

Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
 65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
 85 90 95

Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37
 <211> 242
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

10 <400> 37

Met Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser

ES 2 667 003 T3

1				5						10					15
Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly
			20					25					30		
Thr	Asn	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ala
		35					40					45			
Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe
	50					55					60				
Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val
65					70					75					80
Gln	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Phe	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr
				85					90					95	
Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly
			100					105					110		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Lys	Leu
		115					120					125			
Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu
	130					135					140				
Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Met	Ser	Trp
145					150					155					160
Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Asn
				165					170					175	
Ser	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
			180					185					190		
Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser
		195					200					205			
Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	His	Tyr
	210					215					220				
Ser	Ser	Arg	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
225					230					235					240
Ser	Ser														

ES 2 667 003 T3

<210> 38
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido

<400> 38

10

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg His Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> péptido

20

<400> 39

ES 2 667 003 T3

Met Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly
20 25 30

Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
85 90 95

Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Lys Leu
115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly Ser Leu Lys Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Met Ser Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Ala Ile Asn
165 170 175

Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser
195 200 205

Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys Thr Arg His Phe
210 215 220

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

ES 2 667 003 T3

<210> 40
 <211> 118
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 40

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

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

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

 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Thr Arg Asn Tyr Asp Lys Lys Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41
 15 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> péptido

 <400> 41

ES 2 667 003 T3

Met Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly
20 25 30

Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Phe Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr

ES 2 667 003 T3

				85					90					95			
Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly		
			100					105					110				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Lys	Leu		
		115					120					125					
Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu		
	130					135						140					
Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Met	Ser	Trp		
145					150					155					160		
Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Asn		
				165					170						175		
Ser	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe		
		180						185					190				
Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser		
		195					200						205				
Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Asn	Tyr		
	210					215					220						
Asp	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val		
225					230					235							240
Ser	Ser																

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ no funcional, que comprende un sitio de unión a antígeno definido por una fórmula general:

5 FR1 a - CDR1 a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a - enlazador - FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que:

10 FR1, FR2, FR3, FR4, FR1a, FR2a, FR3a y FR4a son cada una regiones marco;
CDR1, CDR2, CDR3, CDR1 a, CDR2a, CDR3a son cada una regiones determinantes de complementariedad;

en la que:

15 CDR1 a tiene una secuencia de aminoácidos de KASQNVGTNVA;
CDR2a tiene una secuencia de aminoácidos de SASFRYS; y
CDR3a tiene una secuencia de aminoácidos de QQYNSYPFT;

20 en la que:

CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de: SYYSMS;
CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de: AINSNGGSTYYPDVTKG; y
25 CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: HFSRGYYDV, HFQRGYYNI, HYSKEYYNI y NFKLMYYNV.

2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 en el que CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: HFSRGYYDV.

30 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 en el que CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: HFQRGYYNI.

4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 en el que CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: HYSKEYYNI.

35 5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 en el que CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: NFKLMYYNV.

6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que FR1 tiene una secuencia de aminoácidos de: DVKLVESGGGLVKLGGSLKLSAASGFTFS.

7. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que FR2 tiene una secuencia de aminoácidos de: WVRQTPEKRLELVA.

45 8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que FR3 tiene una secuencia de aminoácidos de: RFTISRDNKNTLYLQMSSSLKSEDTAFYYCTR.

9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que FR4 tiene una secuencia de aminoácidos de: WGAGTTVTVSS.

50 10. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9:

en el que

FR1a tiene una secuencia de aminoácidos de MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC;
55 FR2a tiene una secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQSPKALIY;
FR3a tiene una secuencia de aminoácidos de GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFC; y
FR4a tiene una secuencia de aminoácidos de FGSGRLEIK.

11. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 10 en el que el enlazador tiene una secuencia de aminoácidos de 15 residuos aminoácidos.

12. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 11 en el que el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGS-GGGGS.

65 13. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el fragmento de

anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un dominio variable de inmunoglobulina, Fab, Fab', F(ab')₂, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo monocatenario, fragmento de anticuerpo multiespecífico o Fv.

- 5 14. Uso de un sitio de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o el diagnóstico de cáncer o una afección o enfermedad asociada con la expresión del receptor P2X₇ no funcional.
- 10 15. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en el tratamiento o diagnóstico de cáncer o una afección o enfermedad asociada con la expresión del receptor P2X₇ no funcional.
- 15 16. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 15 o uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el diagnóstico incluye la etapa de poner en contacto tejidos o células para los que la presencia o ausencia de cáncer debe determinarse con un reactivo en forma de un sitio de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes y detectar la unión del reactivo con los tejidos o células.
- 20 17. Un método in vitro para el diagnóstico del cáncer o de una enfermedad o afección asociada con la expresión del receptor P2X₇ no funcional, que incluye la etapa de poner en contacto tejidos o células para los que la presencia o ausencia del cáncer debe determinarse con un reactivo en forma de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y detectar la unión del reactivo con los tejidos o células.

Figura 1

SEQ ID NO:1

```

1      MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFSY VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61     VHTKVKGIAE VKEEIVENGV KKLVHSVFDI ADYTFPLQGN SFFVMTNFKL TEGQEQRLLCP
121    EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181    LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD
241    NFSDVAIQGG IMGIEIYWDC NLDLRFHHR PKYSFRRLDD KTTNVSLLYPG YNFRYAKYYK
301    ENNVEKRTLI KVFGRFDIL VFGTGGKFDI IQLVVYIGST LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS
361    NCCRSHIYPW CKCCQPCVVN EYYRKKCES IVEPKPTLKY VSFVDESHIR MVNQQLGRS
421    LQDVKGQEVV RPAMDFTDLS RLPLALHDTL PIPGQPEEQ LLRKEATPRS RDSVWCQCG
481    SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPACITTS ELFRKLVLSR HVLQFLLLYQ EPLALDVDS
541    TNSRLRHCAV RCYATWRFVS QDMADFAILP SCCRWIRKE FPKSEGQYSG FKSPY

```

Figura 2

SEQ ID NO:2

~~1 MPACCSGSDV FQYETNKVTR IQSMNYCTIK WFFHVIIFSY VGFALVSDKL YORKEPVISS~~
~~61 VHTKVKGIAE VKEEIVENGV KKLVSVEFDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEORLCP~~
~~121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA~~
~~181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD~~
~~241 NFSDVAIQGG IMGIEIYWDC NLDLRFHHCN PKYSFRRLDD KTTNVSLYPG YNFRYAKYYK~~
~~301 ENNVEKRTLI KVFCIREFIDL VEGTGGKFDI IQLVVYIGST LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS~~
~~361 NCCRSHIYPW CKCCQPCVVN EYYRKKCES IVEPKPTLKY VSEVDESHIR MVNQQLGRS~~
~~421 LQDVKGQEVV RPAMDFDLS RLPLALHDFP DIPGQPEEIQ LLRKEATPRS RDSFVWCQCG~~
~~481 SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPACITTS ELFRKLVLSR HVLQFLLLYQ EPLLALDVDS~~
~~541 TNSRLRHCAV RYATWRFGS QDMADFAILL SCCRWRIRKE FPKSEGOYSG FKSPY~~

Figura 3

SEQ ID NO:3

~~1 MPACCSGSDV FQYETNKVTR IQSMNYCTIK WFFHVIFSY VCFALVSDKL YQRKEPVISS~~
~~61 VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKLVHSVFD T ADYTFPLQGN SFFVMTNFK TEGQEQLCP~~
~~121 EYPTRTLCS SDRGCKKGWM DPOSKGIQTG RCVVHEGNOK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA~~
~~181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNLP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD~~
~~241 NFSDVAIQGG IMGIEIYWDC NLD RWFHCR PKYSFRRLDD KTTNVS LYPG YNFRYAKYYK~~
~~301 ENNVEKRTLI KVFGIRFDIL VFGTGGKFDI IQLVVYIGST LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS~~
~~361 NCCRSHIYPW CKCCQPCVVN EYYRKKCES IVEPKPTLY VSFVDESHIR MVNQQLCRS~~
~~421 IQDVKQEV P RPAMDFTDLS RLPLALHDTF PIPCQPEEQ LLRKEATPRS RDSVWCQCG~~
~~481 SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPCACITTS ELFRKLVLSR HVLQFLLLYQ EPLLALDVDS~~
~~541 TNSRLRHICAY RYATWRFGS QDMADFAILP SCCRWRIRKE FPKSECQYSC FKSPY~~

Figura 4

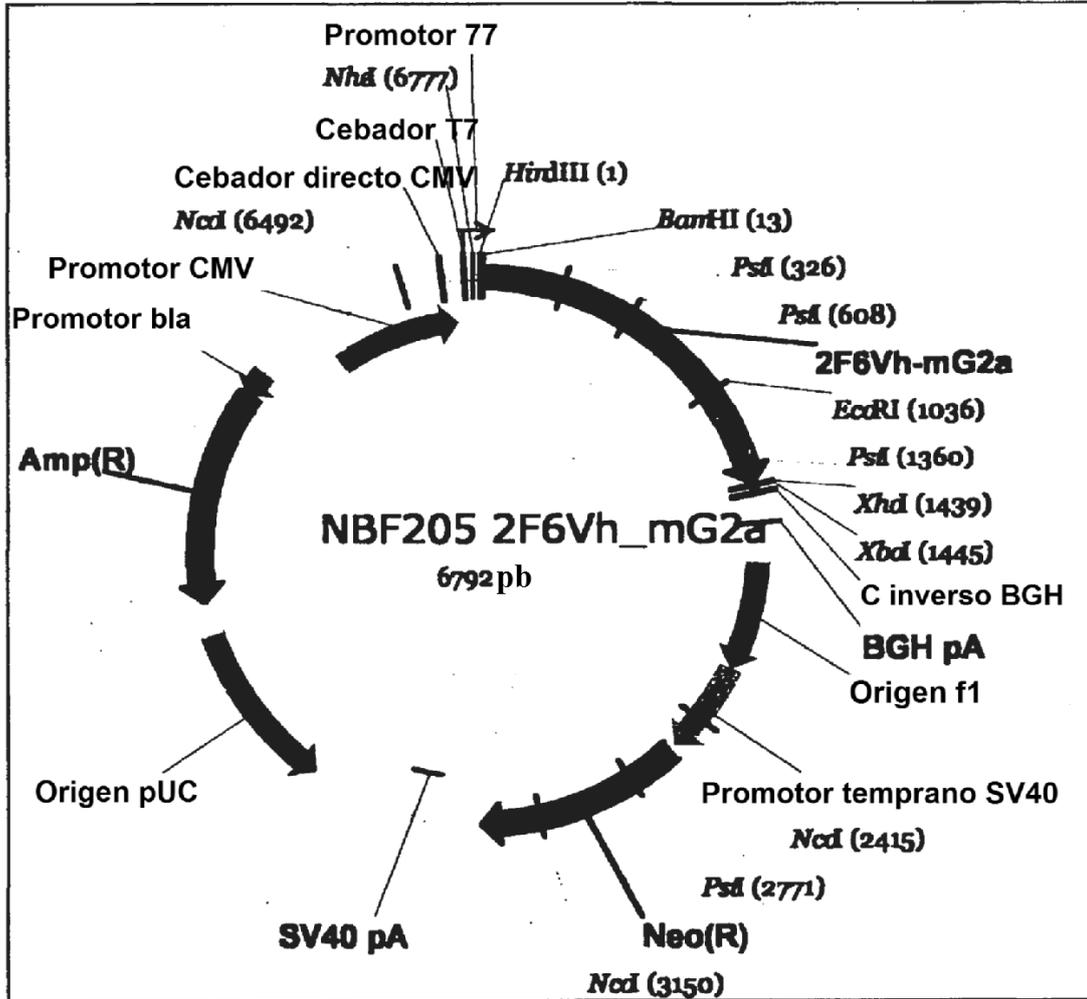


Figura 5

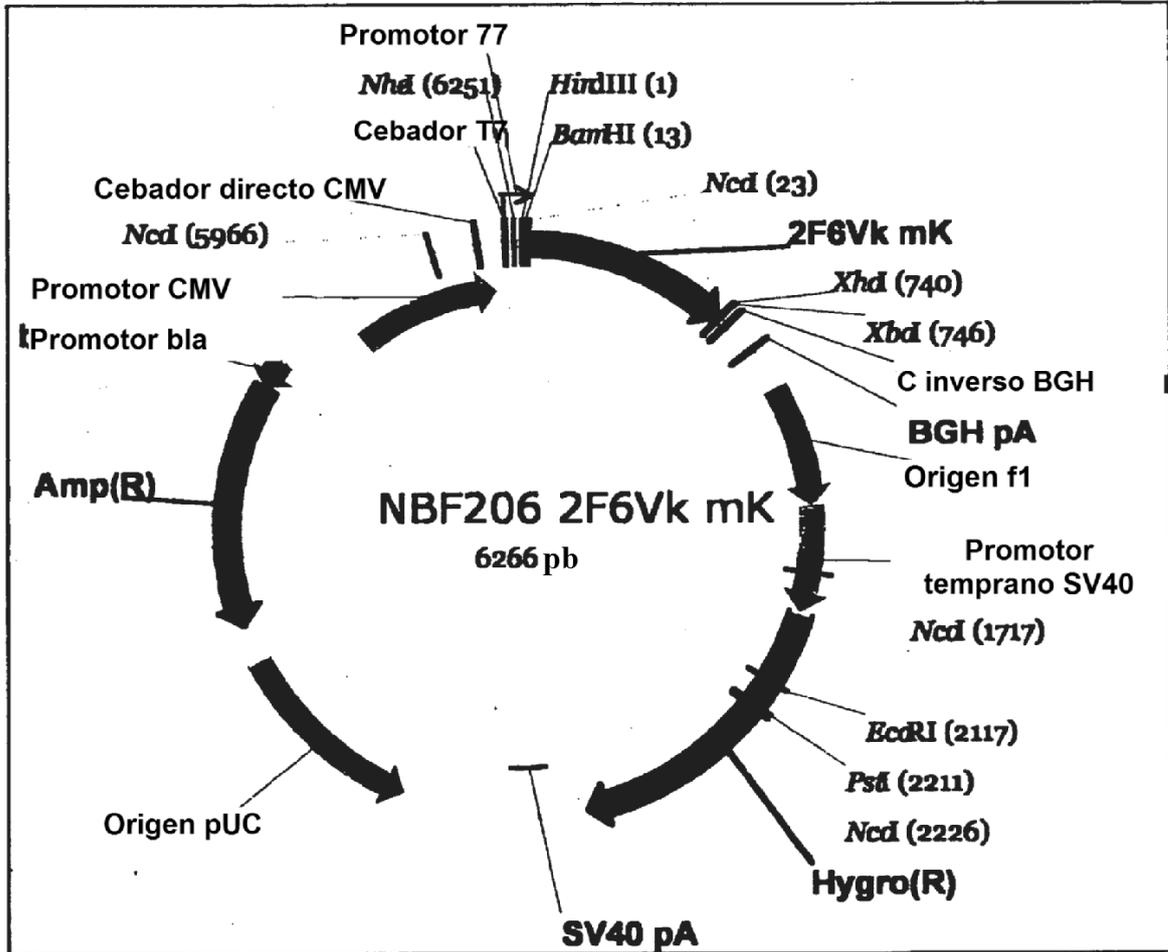


Figura 6

(a)

SEQ ID NO: 4

MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASFRY
 SGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEFFCQQYNSYPFTFGSGTRLEIKGGGGSG
 GGGSGGGGSDVKLVESGGGLVKLGGSLKLSCAASGFTFSSYYMSWVRQTPEKRLEL
 VAAINSNGGSTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTRHYSSRFF
 DVWGAGTTVTVSSAAADYKDDDDKAAAHHHHHH

(b)

IgG2a 2F6, #AIBN20090907

	Nombre	Tiempo de retención	Área	% de área	Altura
1	Pico1	5,985			
2	Pico2	8,473	823930	100,00	33247
3	Pico3	8,933			

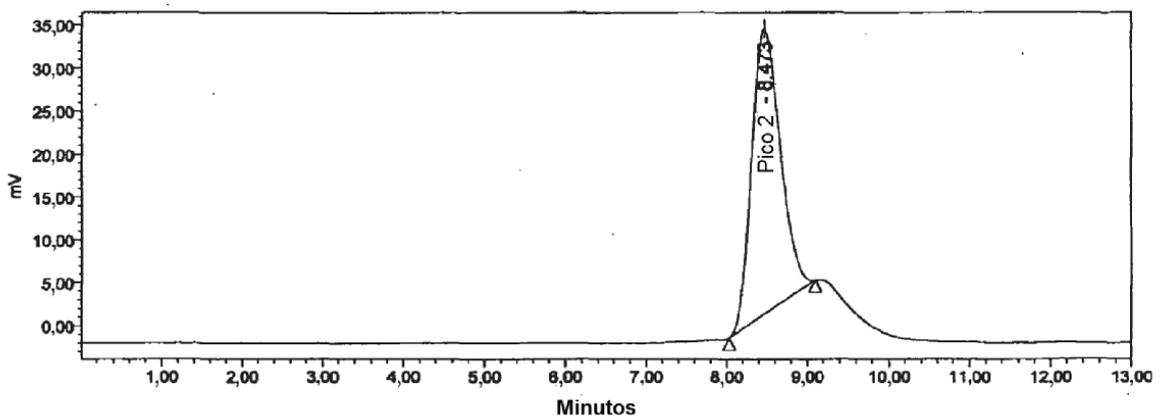


Figura 7

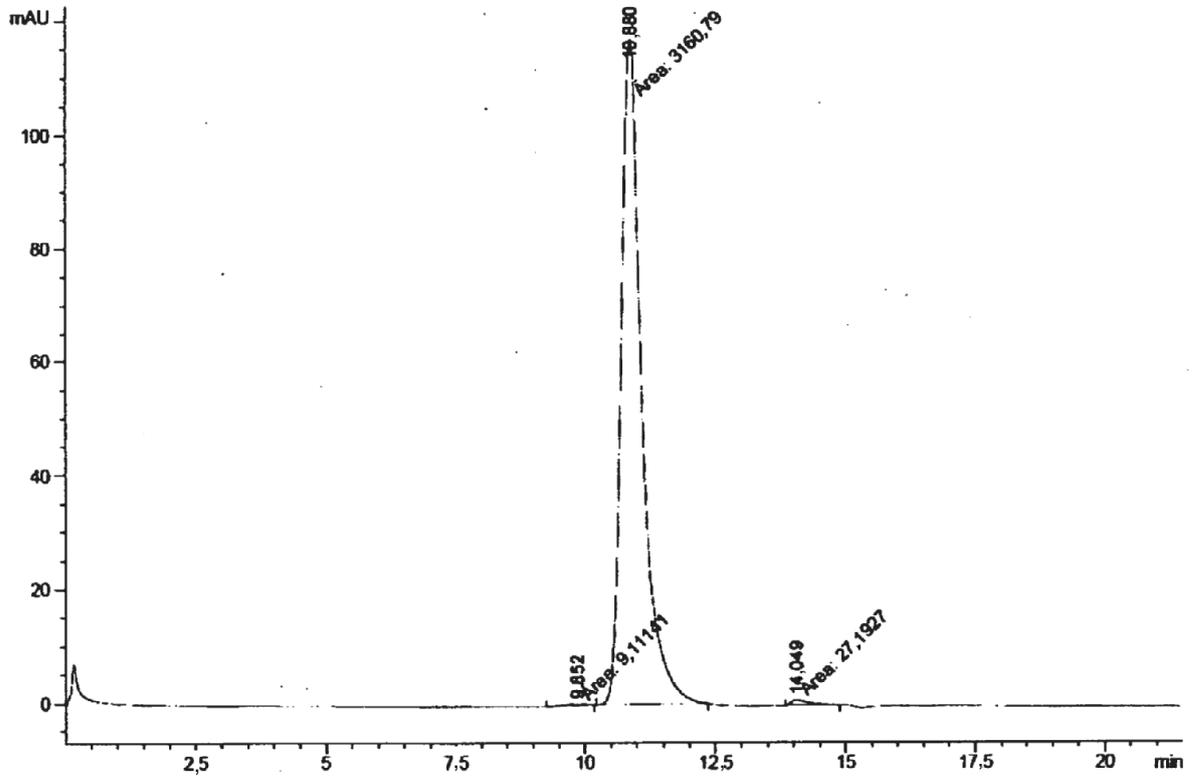


Figura 8

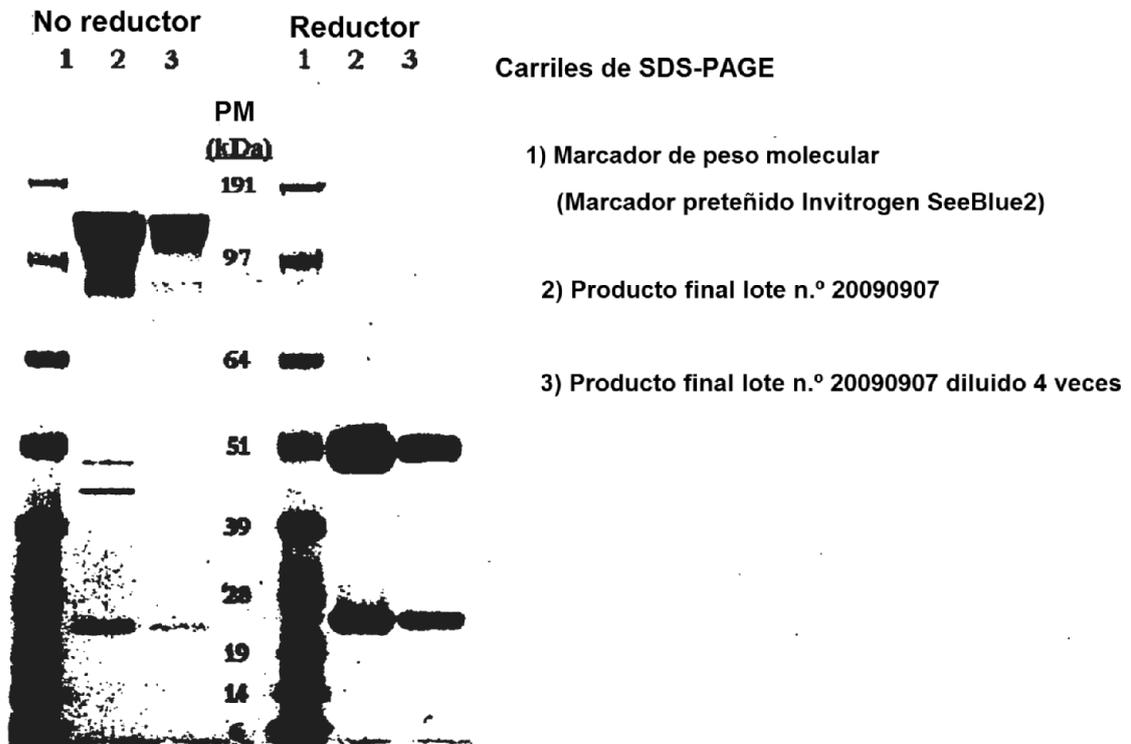


Figura 9a

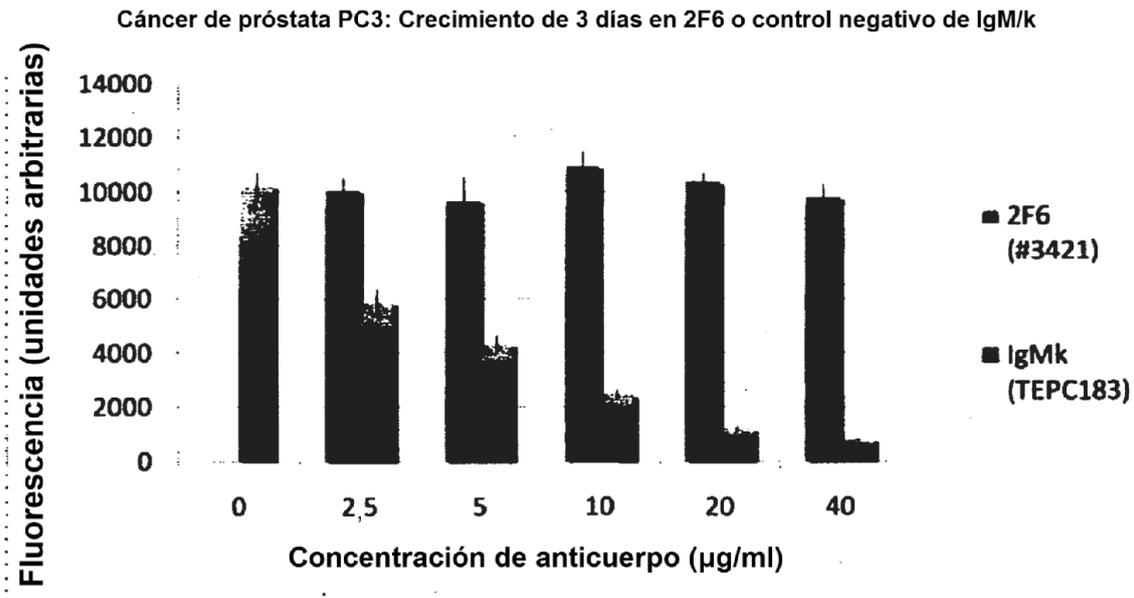


Figura 9b

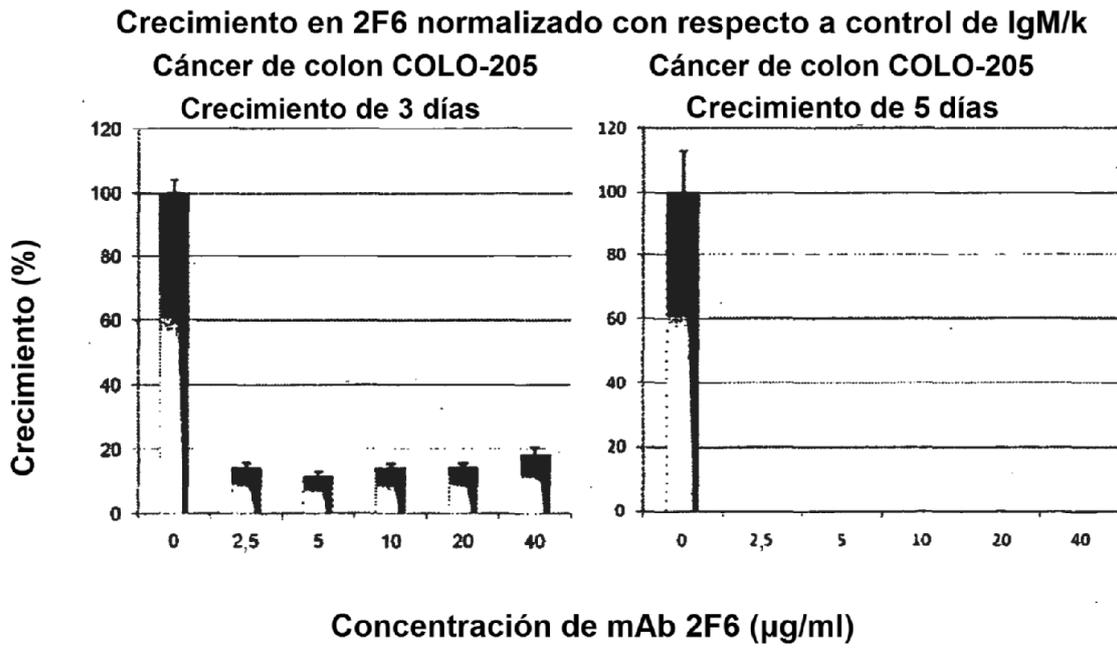


Figura 9c

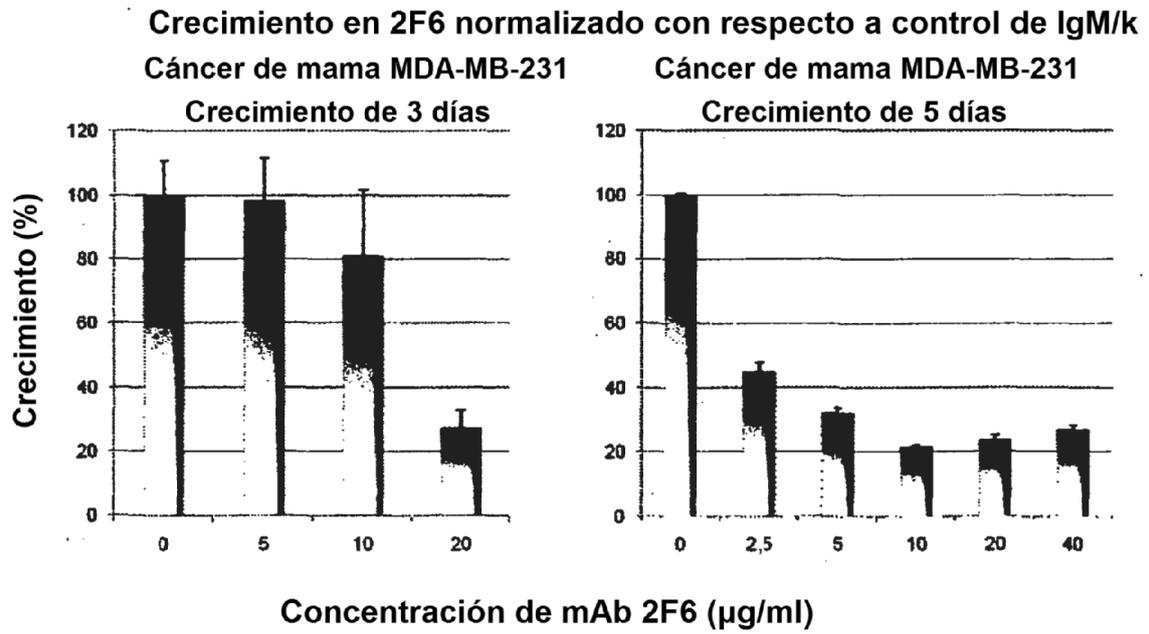


Figura 9d

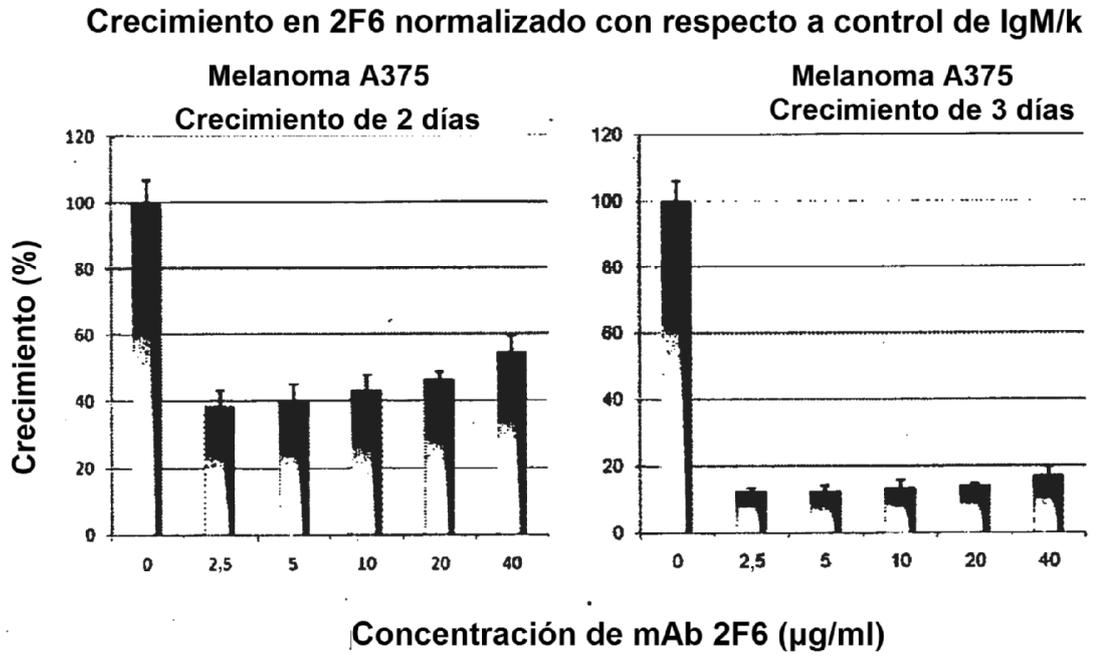


Figura 9e

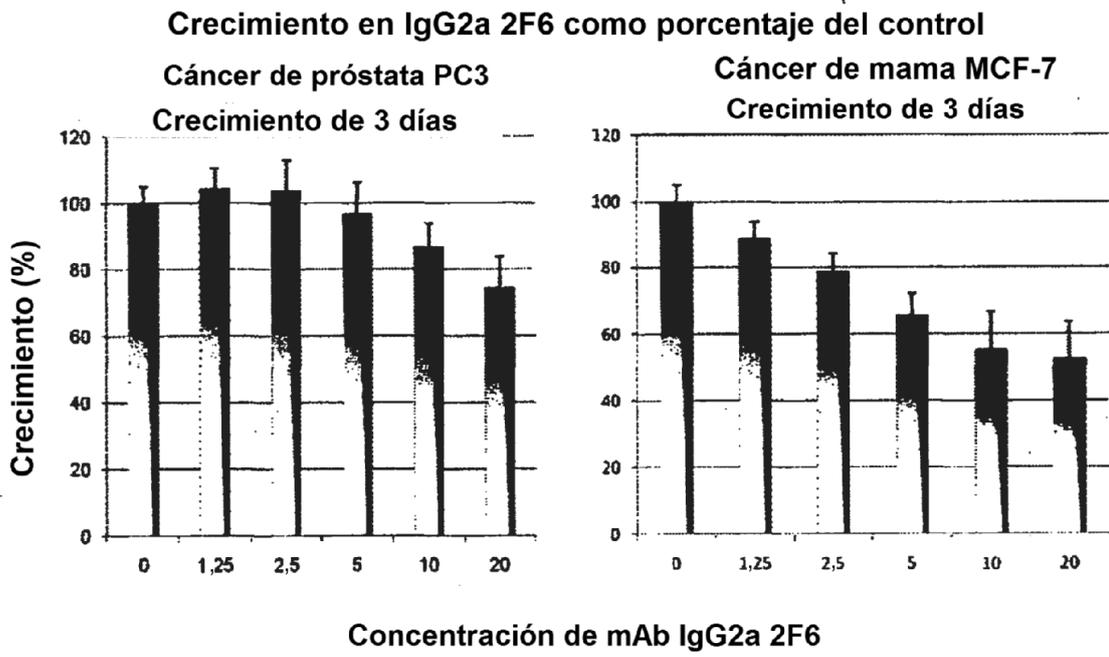
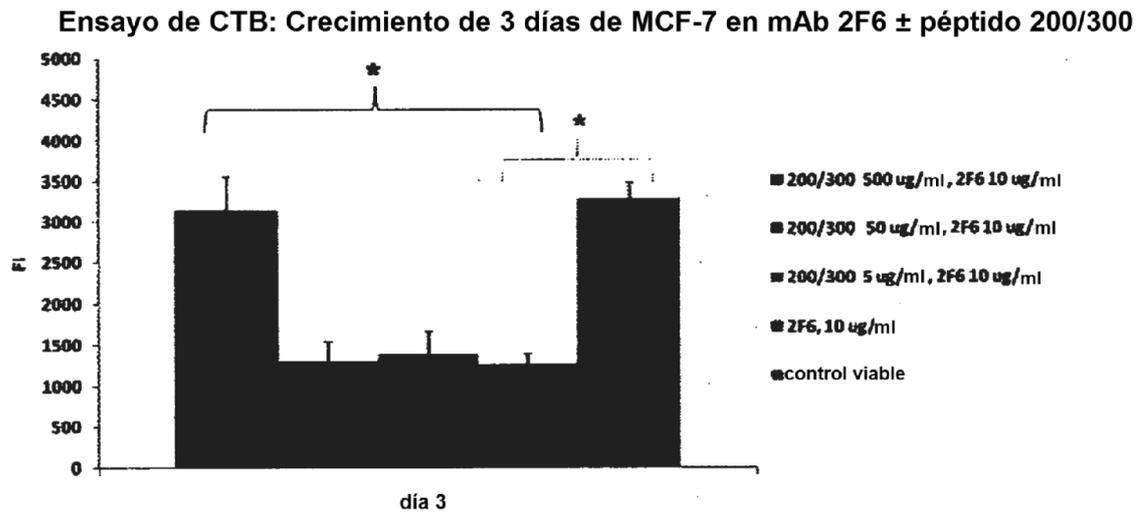


Figura 10



*Valores significativamente diferentes, ensayo de t, cola = 2, tipo = 2, P<0,05

Figura 11

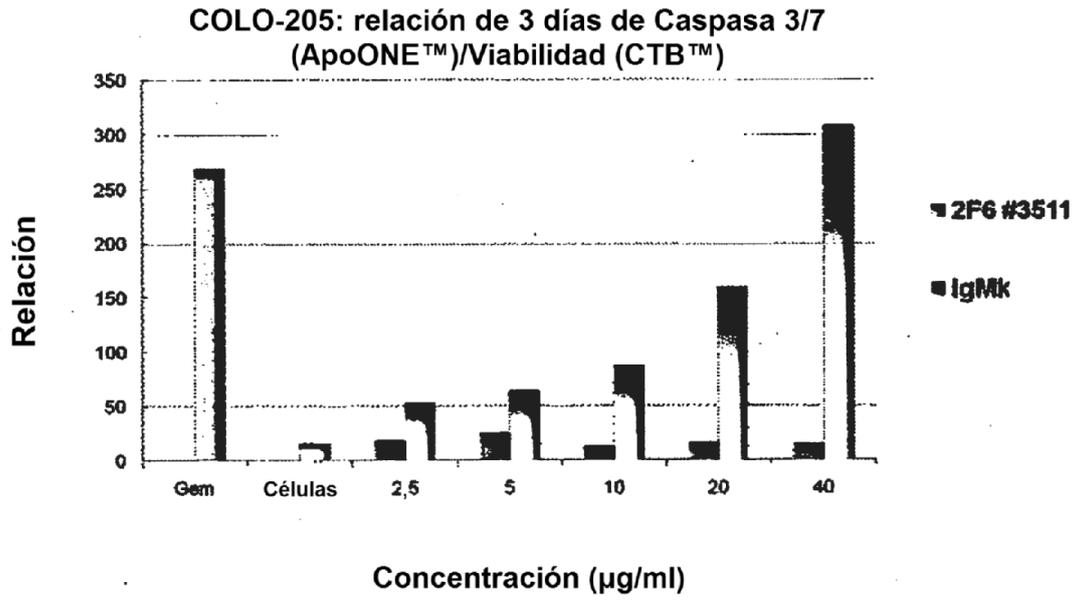


Figura 12



Células de control MCF-7 (día 1)

Microfotografía de contraste de fases con objetivo 20x

viables



MCF-7, 2F6 20 µg/ml (día 1)

Microfotografía de contraste de fases con objetivo 20x

muertas

Figura 13a

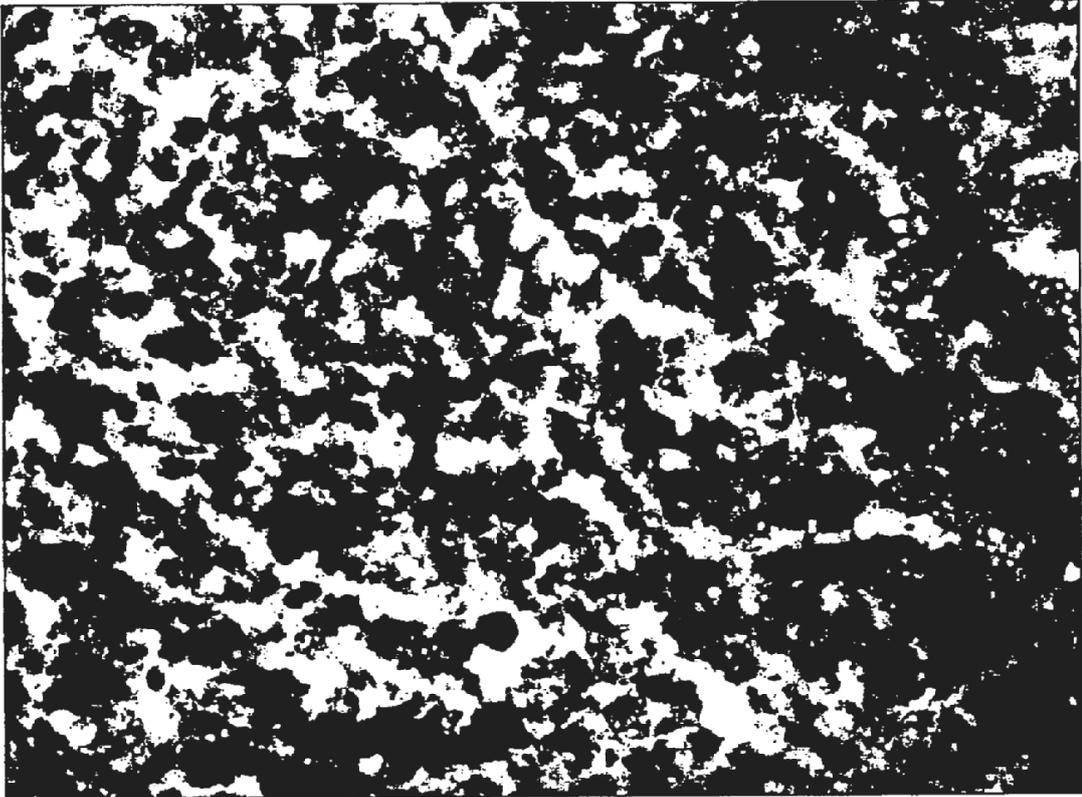


Figura 13b

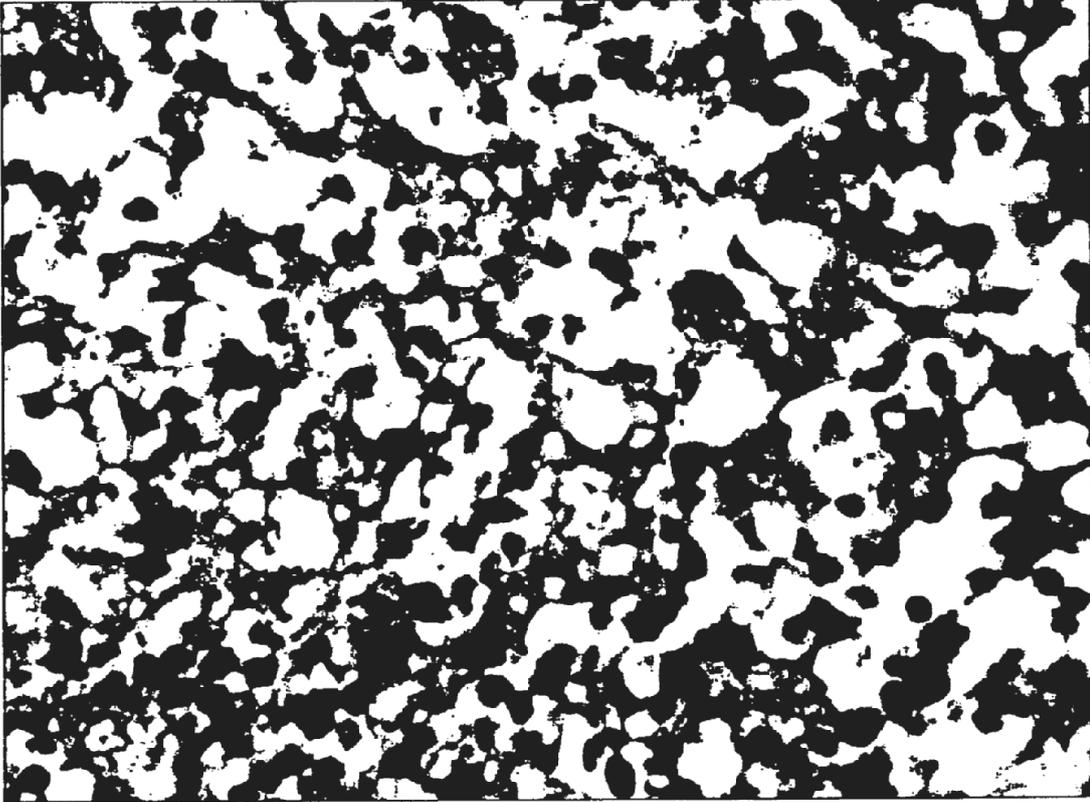


Figura 13c

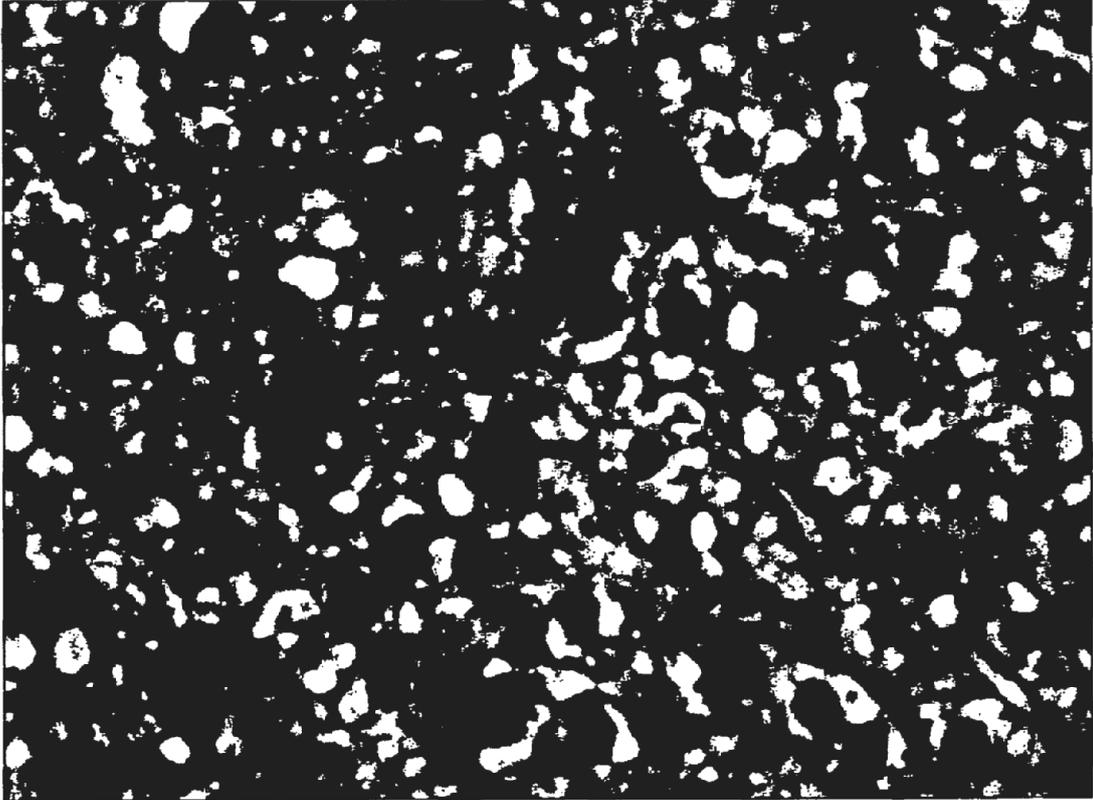


Figura 13d

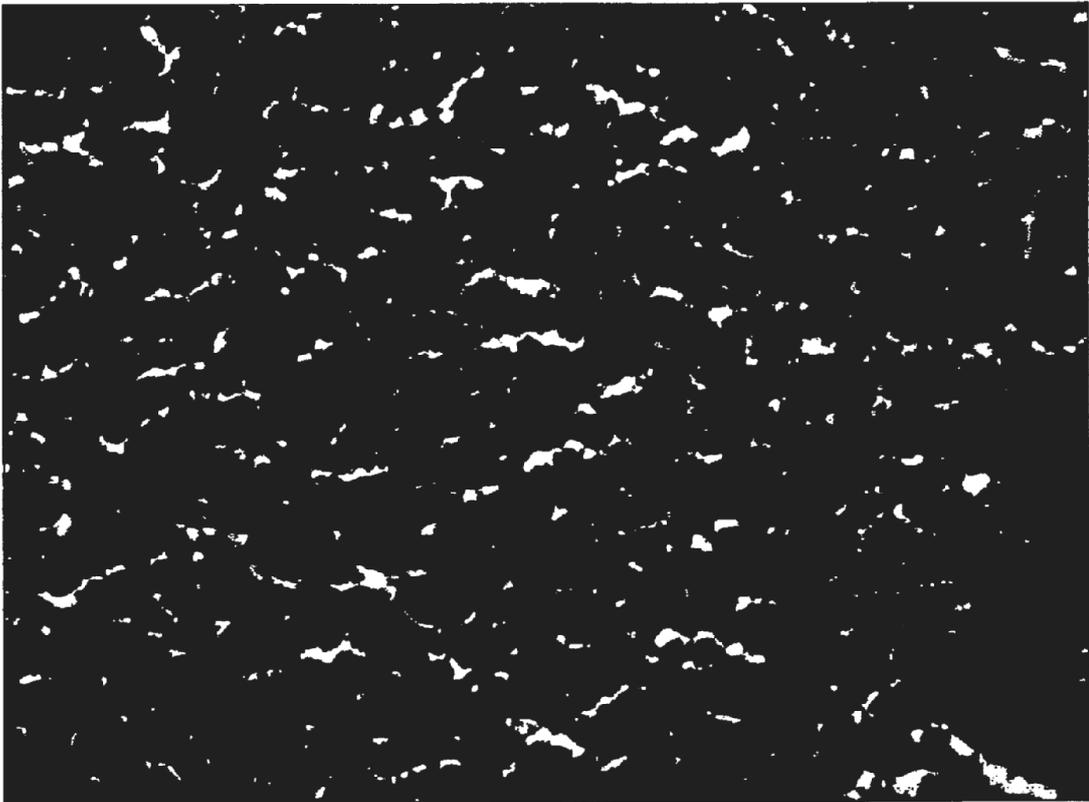


Figura 14a

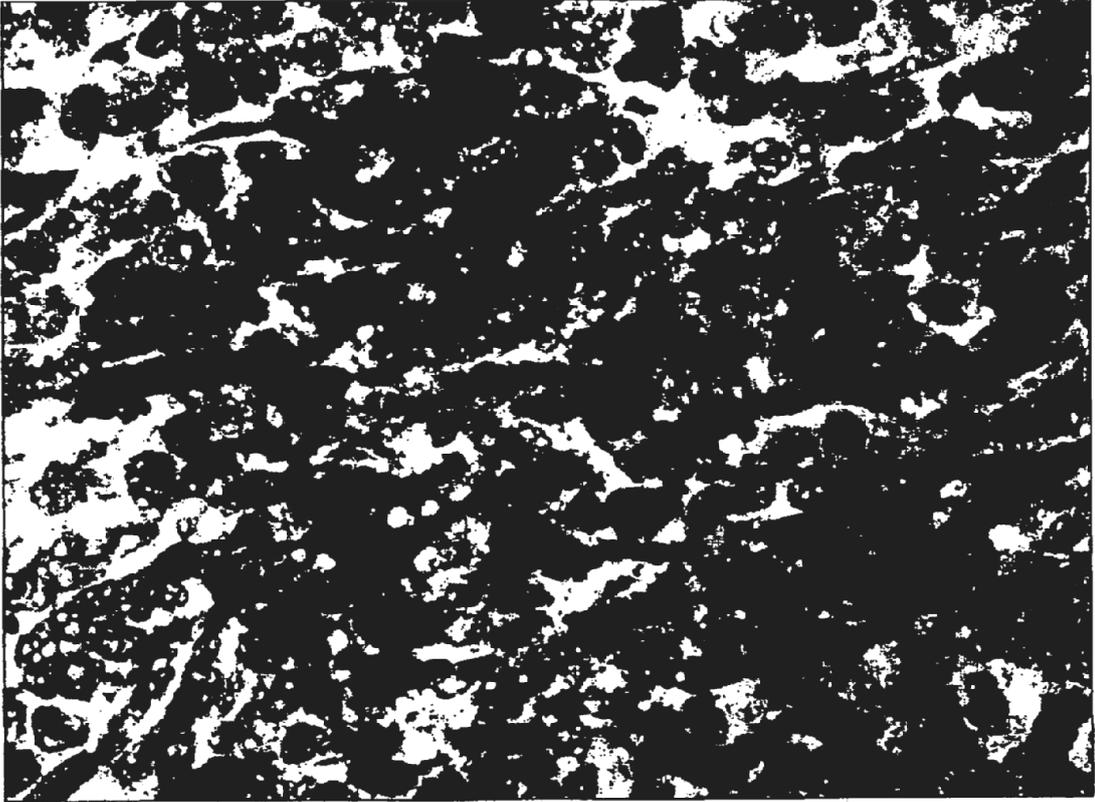


Figura 14b



Figura 14c

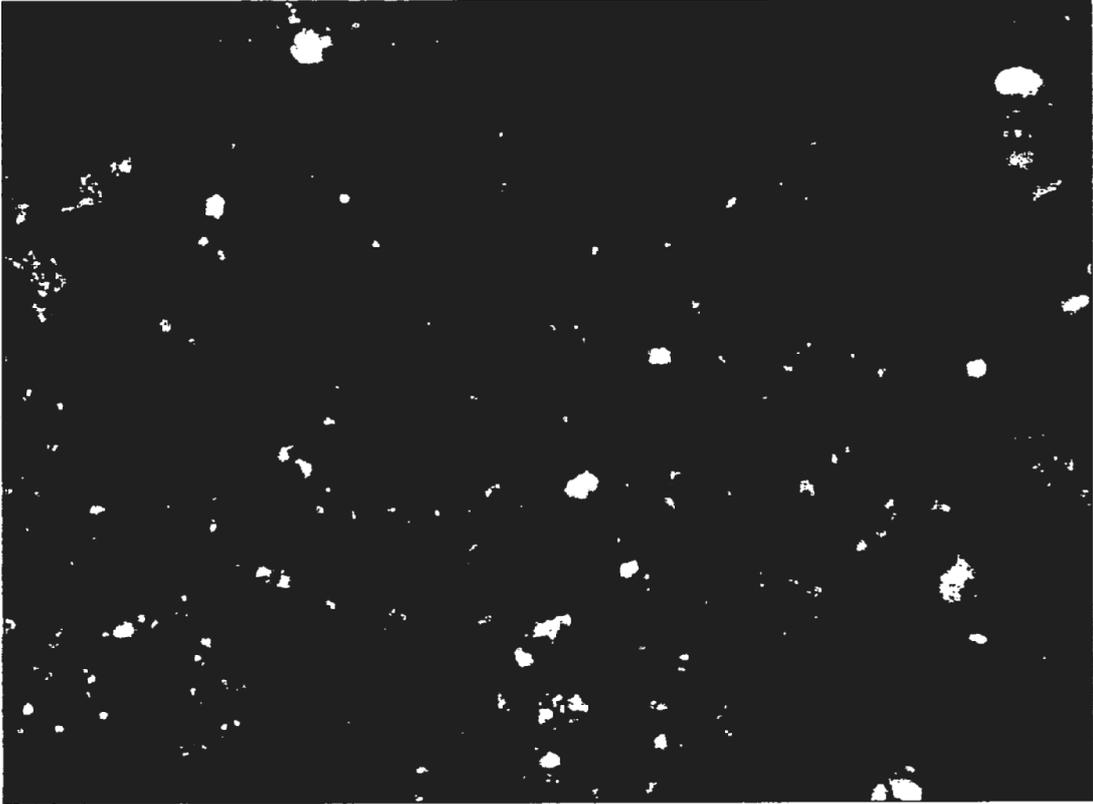


Figura 14d

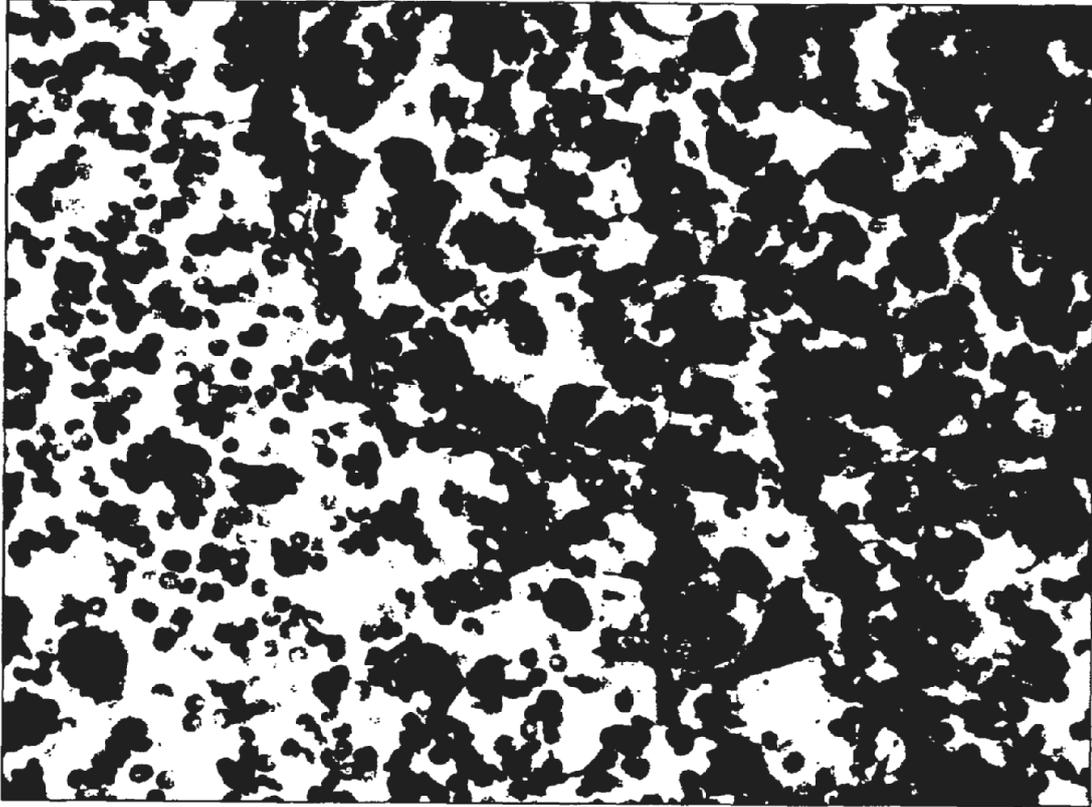


Figura 15

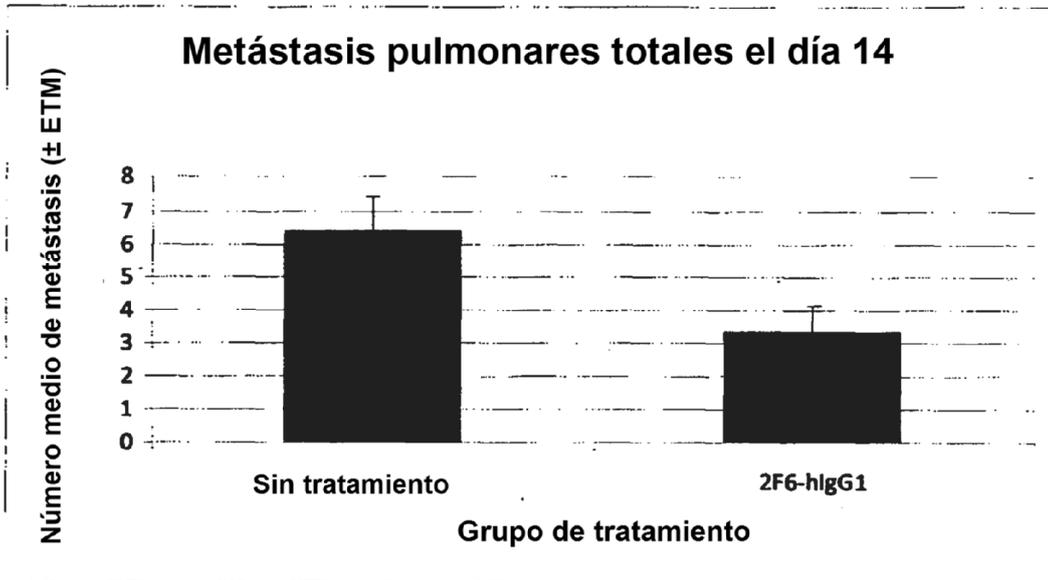


Figura 16

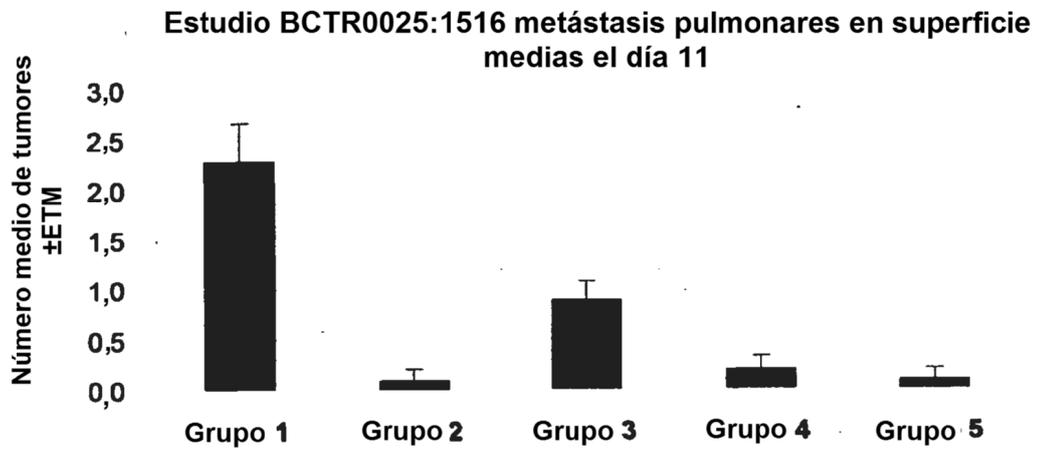
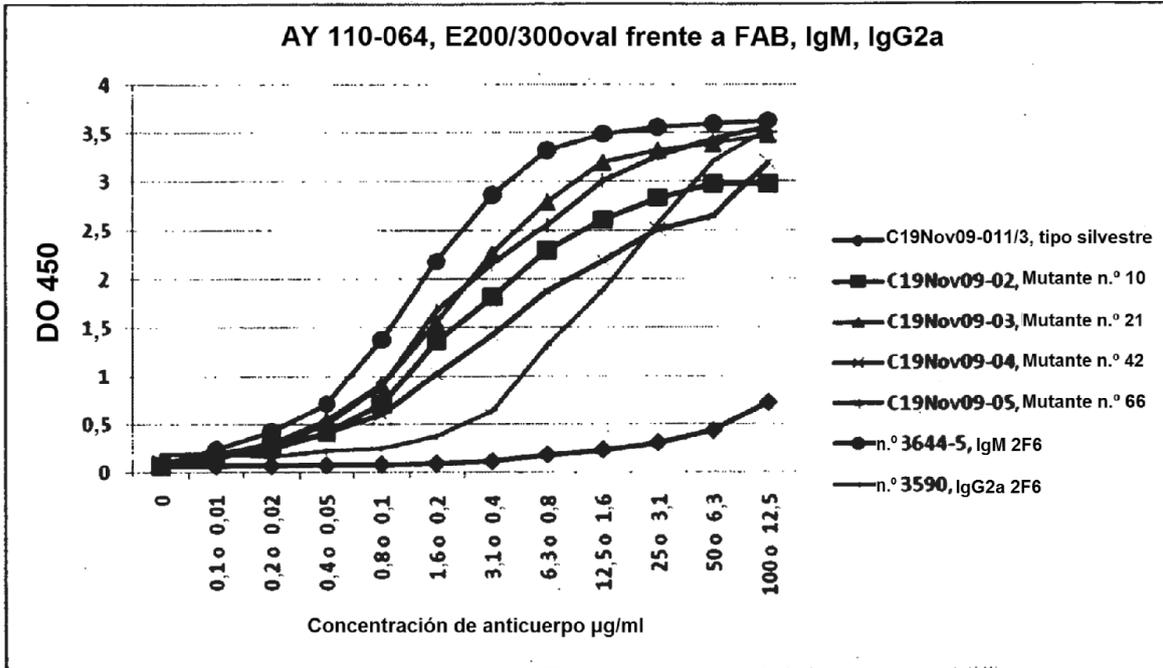


Figura 17

WT	HYSSRFFDV
Mutante n.º 9	NFKLMYYNV
Mutante n.º 10	NYRGDYYET
Mutante n.º 18	HFSRGYYDV
Mutante n.º 20	YHVIQYLGP
Mutante n.º 21	NFLESYFEA
Mutante n.º 24	NYLPMYYEV
Mutante n.º 36	HYIKVYYEA
Mutante n.º 37	HYSSRFFEY
Mutante n.º 39	NFRVMFFKA
Mutante n.º 42	HFQRGYYNI
Mutante n.º 43	HYSSRFFEY
Mutante n.º 44	YHVIQYLGP
Mutante n.º 52	HYSKEYYNI
Mutante n.º 66	YFPLVYYDV
Mutante n.º 75	DFTVPFYNA
Mutante n.º 78	NYDKKYFDV
Mutante n.º 83	YFPLVYYDV

Figura 18



	Mutante n.º 10	Mutante n.º 21	Mutante n.º 42	Mutante n.º 66	Fab WT	IgM 2F6	IgG2a 2F6
CE50 (µg/ml)	2,2	1,9	4,4	2,1	~250	0,14	1,6

Figura 19a

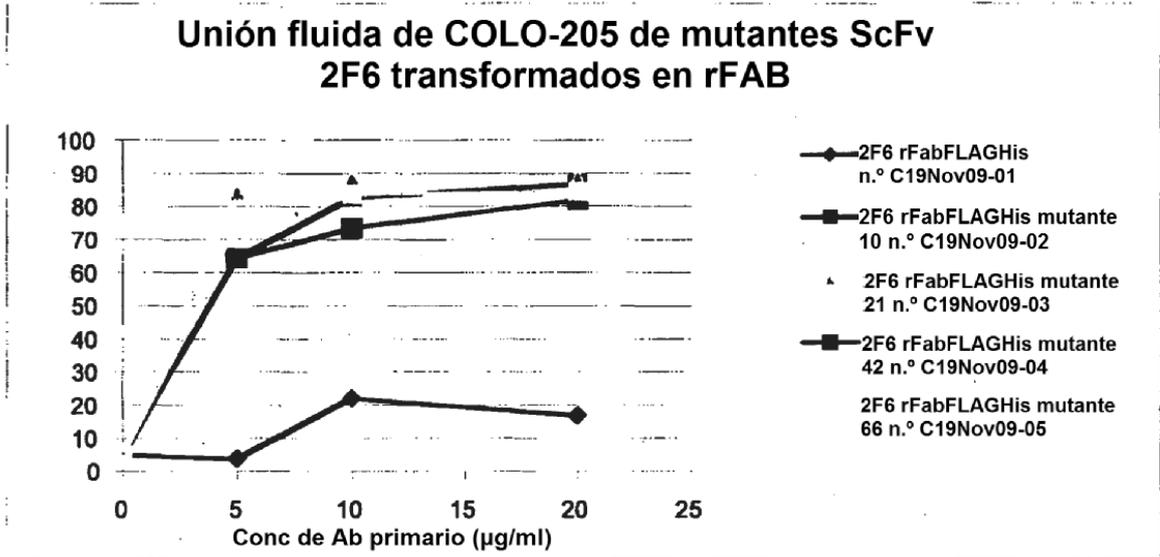


Figura 19b

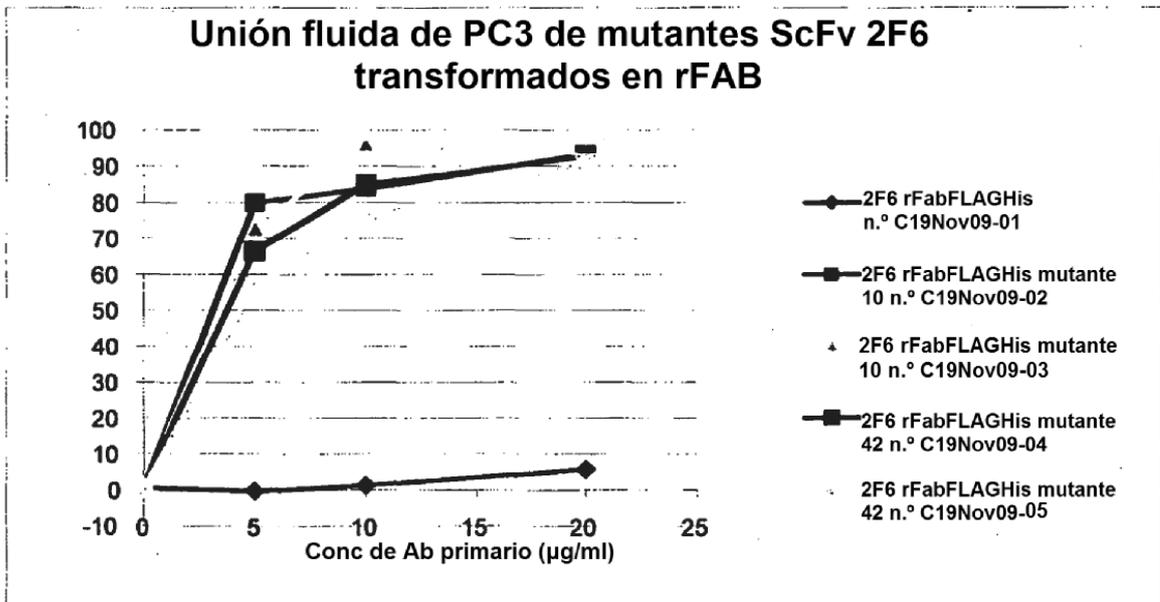


Figura 20

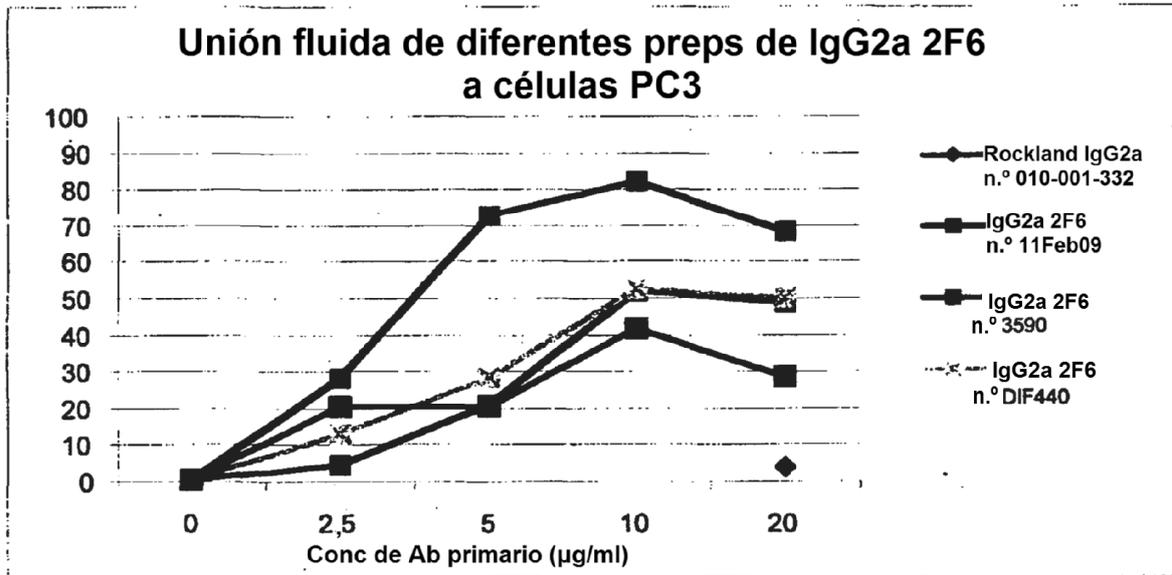


Figura 21

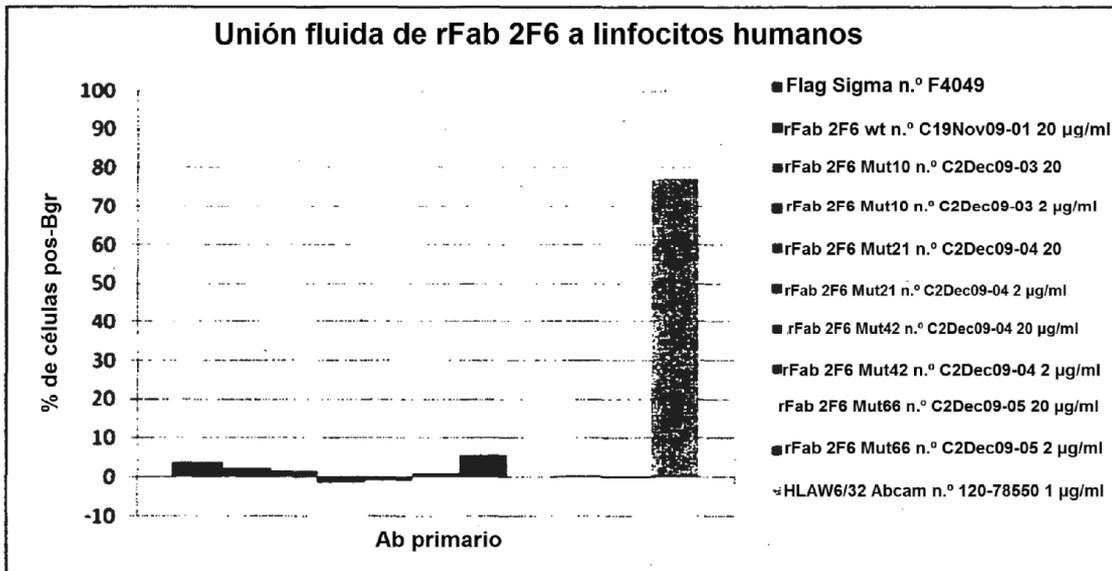
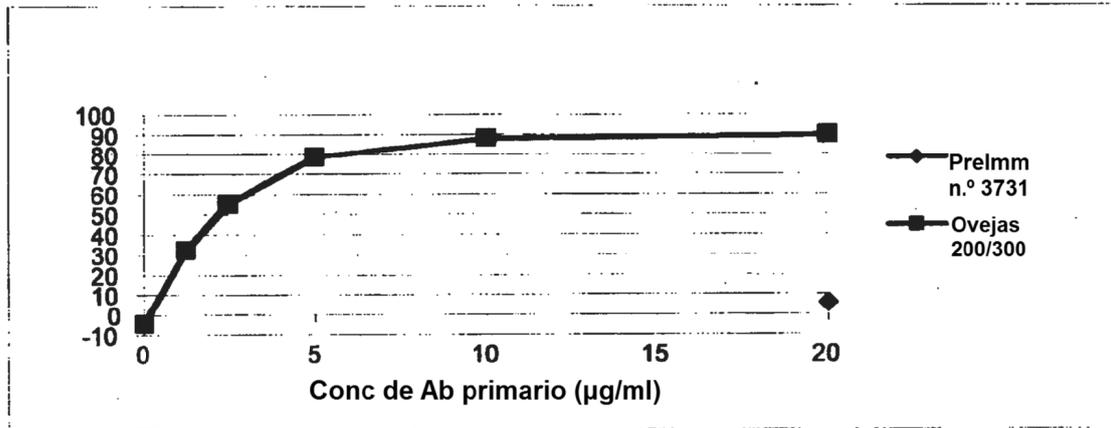


Figura 22



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solo para la facilidad del lector. Esta no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al compilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO se exime de toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 02057306 A1 [0007]
- 10 • WO 03020762 A1 [0007]
- WO 2008043145 A [0007]
- EP 10838429 A[0314]
- AU 2009906286 [0314]

15 Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. Public Health Service, National Institutes of Health, 1991 [0092]
- **MARKS et al.** *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 779 [0140]
- 20 • **BARBAS et al.** *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3809 [0140]
- **SCHIER et al.** *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0140]
- **YELTON et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994 [0140]
- **JACKSON et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310 [0140]
- **HAWKINS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889 [0140]
- 25 • **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522 [0143]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323 [0143]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534 [0143]
- **PADLAN, E. A.** *Mol. Immunol*, 1991, vol. 28, 489 [0146]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1990 [0162]
- 30 • *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1998 [0162]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co, 1980 [0200]