

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 272**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2012 PCT/AU2012/000795**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13003895**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2012 E 12807960 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2726095**

54 Título: **Terapia de combinación**

30 Prioridad:

01.07.2011 AU 2011902623

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

13.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 689 272 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

Terapia de combinación

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para tratar o mejorar enfermedades que están asociadas con la expresión del receptor P2X₇ no funcional, incluido el cáncer.

Antecedentes de la invención

Los receptores purinérgicos (P2X) son canales selectivos de cationes controlados por ATP. Cada receptor está formado por tres subunidades o monómeros de proteínas. Hasta la fecha, se han identificado siete genes distintos que codifican monómeros P2X: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇.

10 Los receptores P2X₇ son de particular interés ya que se entiende que la expresión de estos receptores está limitada a células que tienen potencial para experimentar la muerte celular programada, tales como timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos y monocitos. Existe cierta expresión de los receptores P2X₇ en la homeostasis normal, como en los eritrocitos y en otros tipos de células, como la piel en niveles generalmente más bajos.

15 Curiosamente, un receptor P2X₇ que contiene un monómero que tiene una isomerización cis en Pro210 (de acuerdo con la SEQ ID NO: 1) y que ha comprometido la función de unión a ATP en el sitio o sitios afectados se ha encontrado en células que se entiende que no pueden someterse a muerte celular programada, como células preneoplásicas y células neoplásicas. Esta isoforma del receptor se ha denominado receptor "no funcional" y describe una forma del receptor incapaz de extender el canal de calcio no selectivo operativo a un poro apoptótico.

20 Los anticuerpos generados a partir de la inmunización con un péptido que incluye Pro210 se unen a los receptores P2X₇ no funcionales en los sitios de unión a ATP alterados formados entre los monómeros adyacentes. Sin embargo, no se unen a los receptores P2X₇ capaces de unirse a ATP en ninguno de los tres sitios disponibles. En consecuencia, estos anticuerpos son útiles para detectar selectivamente muchas formas de carcinoma y cánceres hematopoyéticos y para el tratamiento de algunas de estas afecciones.

25 Los documentos WO02/057306A1 y WO03/020762A1 discuten una sonda en forma de un anticuerpo monoclonal para distinguir entre receptores P2X₇ funcionales, definidos como aquellos receptores capaces de formar un canal de Ca/Na no selectivo que sea adicionalmente capaz de formar un poro apoptótico sobre la unión extendida de ATP, y receptores P2X₇ no funcionales, definidos como aquellos receptores capaces de formar el canal no selectivo pero que son incapaces de extender la apertura del canal a un poro apoptótico.

30 El documento WO2009/033233 discute un epítipo expuesto en receptores no funcionales pero no receptores funcionales y anticuerpos para unirse a los mismos. El documento US 2007/020706 describe formas truncadas de P2X₇ como marcadores del cáncer. El documento WO 2011/075789 describe anticuerpos contra receptores P2X₇ oligoméricos no funcionales. El documento WO 2012/031333 describe la minimización de la progresión del cáncer en un animal de compañía que usa la inmunoterapia con P2X₇.

35 Existe la necesidad de un tratamiento alternativo o mejorado de enfermedades causadas por la expresión del receptor P2X₇ no funcional o asociadas con ésta, tal como el cáncer.

La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es ni debe tomarse como un reconocimiento o sugerencia de que esta técnica anterior forme parte del conocimiento general común en Australia o en cualquier otra jurisdicción o que esta técnica anterior pueda razonablemente ser esperada que fuera comprobada, entendida y considerada relevante por alguna persona experta en la materia.

40 Sumario de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Aquellos aspectos/instancias de la presente descripción que constituyen la invención están definidos por las reivindicaciones.

45 En ciertas realizaciones, se proporciona un receptor P2X₇ o fragmento del mismo para su uso en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo, en el que el individuo ha recibido un sitio de unión no autoantígeno para el tratamiento del cáncer, donde el fragmento de un receptor P2X₇ es capaz de inducir una respuesta inmune a un receptor P2X₇, y que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3 y 4.

También se describe un método para minimizar la progresión del cáncer en un individuo que ha recibido un sitio de unión no autoantígeno para el tratamiento del cáncer, incluyendo el método los pasos de:

- 50
- proporcionar a un individuo que ha recibido un sitio de unión no autoantígeno para el tratamiento del cáncer;
 - formar una respuesta inmune en el individuo a un receptor P2X₇,

lo que minimiza la progresión del cáncer en el individuo.

En una forma del método descrito anteriormente, el individuo puede no tener sitios de unión a autoantígeno no detectables en circulación en el momento en que se forma la respuesta inmune en el individuo.

5 Además, el individuo puede no tener un cáncer detectable en el momento en que se forma la respuesta inmune en el individuo, por ejemplo, el cáncer puede haber disminuido sustancialmente en tamaño, masa u otra medida física como consecuencia de la administración de un sitio de unión al antígeno al individuo en el momento en que se forma la respuesta inmune, particularmente a un receptor P2X₇ no funcional, o a un receptor P2X₇ asociado al cáncer, en el individuo.

10 La respuesta inmune puede estar formada por un inmunógeno. El inmunógeno puede proporcionarse en forma de un receptor P2X₇, o un fragmento de un receptor P2X₇ que sea capaz de inducir una respuesta inmune a un receptor P2X₇ en el individuo.

El inmunógeno puede contener al menos una secuencia que pueda presentarse en una molécula de clase II del complejo de histocompatibilidad mayor y/o sea capaz de interactuar con un receptor de células T o B o una inmunoglobulina unida a la membrana de células B.

15 De acuerdo con la invención, el individuo es un ser humano, en cuyo caso el inmunógeno se proporciona en forma de un receptor P2X₇ humano, o fragmento del mismo que es capaz de inducir una respuesta inmune a un receptor P2X₇.

20 Típicamente, la respuesta inmune que se forma en el individuo es específica para receptores P2X₇ no funcionales, en cuyo caso anticuerpos o componentes celulares que son reactivos con receptores P2X₇ no funcionales (es decir, con uno o más sitios incapaces de unirse a ATP), pero no reactivos con receptores funcionales P2X₇ (es decir, receptores de unión a ATP) se forman en el individuo.

En una forma preferida, el inmunógeno se proporciona en una administración inicial al individuo, formando así una respuesta que incluye la producción de IgM.

25 En una forma preferida adicional, el inmunógeno, que se ha proporcionado en una administración inicial al individuo, formando de este modo una respuesta que incluye la producción de IgM, se administra en un momento posterior, en una administración adicional a la administración inicial, formando así una respuesta que incluye la producción de IgG. En esta realización, típicamente la administración adicional de inmunógeno ocurre cuando el nivel de IgM en circulación en el individuo es sustancialmente indetectable.

La respuesta inmune puede ser una respuesta humoral y/o celular.

30 Una respuesta humoral puede incluir la transformación de células B en células plasmáticas, que secretan anticuerpos, activación de Th2 y producción de citoquinas, formación de centros germinales e intercambio de isotipos, maduración por afinidad de células B y/o generación de células de memoria.

Una respuesta celular puede incluir activar linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno, activar macrófagos y células asesinas naturales y/o células estimulantes para secretar citoquinas.

35 La respuesta humoral y/o celular formada en el individuo puede tratar o mejorar un cáncer en el individuo, o minimizar la progresión del cáncer en el individuo.

40 En las realizaciones descritas anteriormente, los sitios de unión a antígeno recibidos por el individuo pueden ser reactivos con cualquier biomarcador que esté asociado con el cáncer. Los ejemplos incluyen sitios de unión a antígeno contra P2X₇, especialmente, P2X₇ no funcional, contra VEGF, especialmente VEGF A, C o D, Her-2, CD20 u otros. Típicamente, los sitios de unión a antígeno recibidos por el individuo son reactivos con el receptor P2X₇, especialmente un receptor P2X₇ no funcional.

En otra realización, se proporciona un uso de un receptor P2X₇ o fragmento del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de, o para la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo que ha recibido un sitio de unión al antígeno del receptor anti- P2X₇ para el tratamiento del cáncer.

45 En otra realización, se proporciona una composición para tratar, o para inhibir la progresión de un cáncer en un ser humano que incluye un receptor P2X₇ o un fragmento del mismo. Preferiblemente, la composición incluye además un vehículo, excipiente o diluyente. Preferiblemente, la composición incluye además un adyuvante.

50 En otra realización, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento o para su uso en la inhibición de la progresión de un cáncer en un ser humano que incluye un receptor P2X₇ o fragmento del mismo. Preferiblemente, la composición incluye además un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Preferiblemente, la composición incluye además un adyuvante.

En otra realización, se proporciona una composición cuando se usa en un método de la invención.

En una forma preferida, la composición permite la formación de una respuesta inmune primaria (que incluye la producción de IgM) tras la administración inicial del inmunógeno al individuo, y una segunda respuesta inmune (que incluye la producción de IgG) tras la administración del inmunógeno después de la administración inicial.

5 En otros casos, se proporciona un kit o composición para el tratamiento o para inhibir la progresión de un cáncer en un ser humano, incluyendo el kit:

- un inmunógeno capaz de causar la formación de una respuesta inmune a un receptor P2X₇ humano cuando se administra a un ser humano;

- un sitio de unión a antígeno que se une a un biomarcador asociado con el cáncer; e

- instrucciones escritas para su uso en un método descrito anteriormente.

10 En una forma preferida, el sitio de unión a antígeno proporcionado en el kit es reactivo con un receptor P2X₇, preferiblemente un receptor P2X₇ no funcional.

15 Sin estar sujeto a ninguna teoría o modo de acción, se cree que la presente invención proporciona un régimen de tratamiento alternativo y/o mejorado por la razón de que los componentes inmunes endógenos tales como los anticuerpos y las células específicas de antígeno que surgen de la inmunización tienen una exposición más larga y mayor a los receptores P2X₇ de superficie celular, después de que se haya completado la administración de los sitios de unión al antígeno y el nivel circulante de sitios de unión al antígeno anti-P2X₇ no propios se haya vuelto indetectable.

20 Además, se cree que el agrupamiento del receptor P2X₇, tal como surge cuando se proporcionan altas concentraciones de anticuerpos no propios o exógenos en un individuo, minimiza el nivel de unión específica del anticuerpo a los epítopos clave P2X₇ que proporcionan una respuesta inmune contra el cáncer, limitando así la eficacia de la inmunoterapia. Los inventores han encontrado que una respuesta de anticuerpos que surge de la inmunización de un individuo con un inmunógeno según la invención descrita en este documento proporciona una cantidad, título o concentración de anticuerpo que no causa apiñamiento del receptor, mejorando así la eficacia de la inmunoterapia, particularmente a la vez cuando el cáncer en el individuo puede ser sustancialmente indetectable.

25 En un caso, se describe un proceso para formar una respuesta inmune humoral frente a receptores P2X₇ asociados al cáncer en un individuo que ha recibido un anticuerpo antigénico anticancerígeno para la terapia del cáncer, que incluye las etapas de:

- formar una respuesta inmune en el individuo frente a un inmunógeno en forma de un receptor P2X₇ asociado al cáncer o un fragmento del mismo;

30 en el que la respuesta inmune se forma en el individuo en un momento en que el anticuerpo antigénico anticanceroso administrado para el tratamiento del cáncer está en un nivel o concentración que es sustancialmente indetectable en el individuo; y/o

35 la respuesta inmune humoral a los receptores P2X₇ asociados al cáncer se forma de acuerdo con un programa de inmunización en el que la cantidad de anticuerpo formado en el individuo para el receptor P2X₇ asociado al cáncer es de aproximadamente 0,1 a 25 mg/kg de individuo.

40 En otra realización, se proporciona una composición para su uso en la formación de una respuesta inmune humoral frente a receptores P2X₇ asociados al cáncer en un individuo que ha recibido un anticuerpo antigénico anticancerígeno para la terapia del cáncer, incluyendo dicha composición un inmunógeno en forma de un receptor P2X₇ asociado al cáncer o fragmento del mismo. Preferiblemente, la respuesta inmune se forma en el individuo en un momento en que el anticuerpo antigénico anticanceroso administrado para el tratamiento del cáncer está en un nivel o concentración que es sustancialmente indetectable en el individuo; y/o la respuesta inmune humoral frente a los receptores P2X₇ asociados al cáncer se forma de acuerdo con un programa de inmunización por el cual la cantidad de anticuerpo formado en el individuo frente al receptor P2X₇ asociado al cáncer es de aproximadamente 0,1 a 25 mg/kg de individuo.

45 Aspectos adicionales de la presente invención y otras realizaciones de los aspectos descritos en los párrafos precedentes se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, dada a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

50 Paciente con carga tumoral moderada inmunizado con el péptido GHNYTTRNLPGLNITC acoplado al portador de KLH en presencia de adyuvante. La placa de ELISA transporta el péptido y el suero se diluye en serie para detectar la presencia de anticuerpos contra el péptido. Suero preinmune (azul), suero obtenido inmediatamente antes del refuerzo en la semana 4 (rojo) y suero en la semana 13 (9 semanas después del refuerzo, verde). No se detectaron

anticuerpos en el suero previo al refuerzo tomado 4 semanas después de la inmunización inicial. Se cree que esto es una consecuencia de la masa tumoral existente que se une a los anticuerpos que surgen de la inmunización. La muestra de la semana 13 muestra un pequeño nivel de respuesta circulante de anticuerpos anti-nfP2X₇ a medida que disminuía la carga tumoral. Mediciones intermedias tomadas de las semanas 5 a 12 mostraron que había poco anticuerpo circulante en el suero.

Figura 2

Paciente con carga tumoral residual muy pequeña inmunizada con el péptido GHNYTTRNLPGLNITC acoplado al transportador KLH en presencia de adyuvante. La placa de ELISA transporta el péptido y el suero se diluye en serie para detectar la presencia de anticuerpos contra el péptido. Suero preinmune (azul), suero obtenido inmediatamente antes del refuerzo en la semana 4 (rojo) y en la semana 5 (1 semana después del refuerzo, verde). Dado que el paciente tenía poco o nada de tumor residual para los anticuerpos circulantes, los niveles detectados en la semana 5 ya eran mucho más altos que en el paciente que tenía una masa tumoral moderada.

Descripción detallada de las realizaciones

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones, se entenderá que la intención no es limitar la invención a esas realizaciones. Por el contrario, la invención está destinada a cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, que pueden incluirse dentro del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

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

Como se usa en este documento, excepto cuando el contexto requiera lo contrario, el término "comprender" y variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "comprendido", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

A los efectos de interpretar esta memoria descriptiva, generalmente se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando corresponda, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. En caso de que cualquier definición establecida entre en conflicto con cualquier documento incorporado en este documento por referencia, prevalecerá la definición que se establece a continuación.

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

El "receptor de P2X₇" generalmente se refiere a un receptor purinérgico formado a partir de tres subunidades o monómeros de proteínas, con al menos uno de los monómeros que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID N°: 1. En la medida en que el receptor P2X₇ se forma a partir de tres monómeros, es un "trímero" o "trimérico". El "receptor P2X₇" puede ser un receptor funcional o no funcional como se describe a continuación. El "receptor P2X₇" abarca variantes naturales del receptor P2X₇, por ejemplo, en donde los monómeros P2X₇ son variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que incluyen formas truncadas o secretadas de forma 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 naturales (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas naturales. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos monoméricos P2X₇ de secuencia nativa descritos en la presente son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden la secuencia de aminoácidos de longitud completa mostrada en la SEQ ID N°: 1. En ciertas realizaciones, el receptor P2X₇ puede tener una secuencia de aminoácidos que se modifica, por ejemplo, varios de los aminoácidos en la secuencia mostrada en la SEQ ID No. 1 pueden estar sustituidos, delecionados o se puede insertar un residuo.

El "receptor funcional de P2X₇" generalmente se refiere a una forma del receptor P2X₇ que tiene un sitio de unión o hendidura para unirse a ATP. Cuando se une al ATP, el receptor forma un canal de sodio/calcio no selectivo que se convierte en una estructura de poros que permite la entrada de iones de calcio en el citosol, una de cuyas consecuencias puede ser la muerte celular programada. En la homeostasis normal, la expresión de los receptores P2X₇ funcionales generalmente se limita a células que experimentan muerte celular programada, tales como los timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos y monocitos. También puede haber alguna expresión de receptores P2X₇ funcionales en eritrocitos y otros tipos de células.

El "receptor P2X₇ no funcional" generalmente se refiere a una forma de un receptor P2X₇ que tiene una conformación por la cual el receptor es incapaz de formar un poro apoptótico, pero que todavía puede funcionar como un canal no selectivo mediante el mantenimiento de un único sitio funcional de unión a ATP localizado entre monómeros adyacentes. Surge un ejemplo en el que uno o más de los monómeros tiene una isomerización cis en Pro210 (de acuerdo con la SEQ ID No: 1). La isomerización puede surgir de cualquier evento molecular que conduzca al plegamiento incorrecto del monómero, que incluye, por ejemplo, la mutación de la secuencia primaria del monómero o el procesamiento postraduccionnal anormal. Una consecuencia de la isomerización es que el receptor no puede unirse al ATP en uno o dos sitios de unión a ATP en el trímero y, como consecuencia, no puede

extender la apertura del canal. En estas circunstancias, el receptor no puede formar un poro y esto limita el grado en que los iones de calcio pueden entrar en el citosol. Los receptores P2X₇ no funcionales se expresan en una amplia gama de cánceres epiteliales y hematopoyéticos.

5 "Los receptores P2X₇ asociados al cáncer" generalmente son receptores P2X₇ que se encuentran en células cancerosas (incluidas células preneoplásicas, neoplásicas, malignas, benignas o metastásicas), pero no en células normales o no cancerosas.

"Epítipo E200" generalmente se refiere a un epítipo expuesto en un receptor P2X₇ no funcional.

En los seres humanos, la secuencia es GHNYTT NILPGLNITC (SEQ ID NO: 2).

10 "Epítipo E300" generalmente se refiere a un epítipo expuesto en un receptor P2X₇ no funcional. En los seres humanos, la secuencia es KYYKENVKRTLIKVF (SEQ ID NO: 3).

"Epítipo compuesto" generalmente se refiere a un epítipo que se forma a partir de la yuxtaposición de los epítipos E200 y E300 o partes de estos epítipos.

15 "Anticuerpos" o "inmunoglobulinas" o "Igs" son proteínas gammaglobulinas que se encuentran en la sangre u otros fluidos corporales de vertebrados que funcionan en el sistema inmune para unir el antígeno, por lo tanto, la identificación y/o neutralización de objetos extraños.

Los anticuerpos son generalmente 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 la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados.

20 Las cadenas H y L definen dominios de Ig específicos. Más particularmente, cada cadena H tiene en el término 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 N-terminal, 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}).

25 Los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia C_H y función, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

30 El dominio constante incluye la porción Fc que comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H unidas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos tales como ADCC están determinadas por secuencias en la región Fc, cuya región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células.

35 El emparejamiento de un V_H y V_L forma conjuntamente una "región variable" o "dominio variable" que incluye los dominios amino-terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "V_H". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "V_L". El dominio V contiene un "sitio de unión a antígeno" que afecta la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Las regiones V abarcan aproximadamente 110 residuos de aminoácidos y consisten en tramos relativamente invariantes llamados regiones marco (FR) (generalmente alrededor de 4) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" (generalmente alrededor de 3) que son cada una de generalmente 9-12 aminoácidos de largo. Las FR adoptan en gran medida una configuración de hoja β y las regiones hipervariables forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β.

45 "Región hipervariable" 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).

Los restos "marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable definidos en este documento.

50 Un "sitio de unión a antígeno" generalmente se refiere a una molécula que incluye al menos las regiones hipervariables y estructurales que se requieren para impartir función de unión a antígeno a un dominio V. Un sitio de unión a antígeno puede estar en forma de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (tal como un dAb, Fab, Fd, Fv, F(ab')₂ o scFv) en un método descrito en este documento.

Un anticuerpo "intacto" o "entero" 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 variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

- 5 "Fragmentos completos de anticuerpos que incluyen un dominio variable" incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

10 El "fragmento Fab" consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno.

Un fragmento "Fab" se diferencia de los fragmentos Fab por tener pocos residuos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_{H1} que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en la que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

- 15 Un "fragmento $F(ab')_2$ " corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión al antígeno divalente y aún es capaz de reticular el antígeno.

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

- 20 En una especie Fv (scFv) monocatenaria, un dominio variable de cadena pesada y ligera puede unirse covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura "dímera" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo.

- 25 "Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados para formar una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, 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 la unión al antígeno.

- 30 Un "dominio variable único" es la mitad de un Fv (que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) que tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

- 35 "Diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos 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 anticuerpo pequeños se preparan construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlaces cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se consigue el emparejamiento entre cadenas pero no intra-cadenas de los dominios V, lo que da como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno.

Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los triacuerpos y los tetracuerpos también son generalmente conocidos en la técnica.

- 40 Un "anticuerpo aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno preexistente. Los componentes contaminantes son materiales que interferirían con los usos terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos.

- 45 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. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación de fagos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado.

- 50 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad del anticuerpo deseado. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender
55 residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se

realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

"Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico o determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante la metodología de hibridoma. Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de librerías de anticuerpos en fagos usando las técnicas.

La expresión "anticuerpo anti-receptor P2X₇" o "un anticuerpo que se une al receptor P2X₇" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al receptor P2X₇ con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para reconocer el receptor P2X₇, típicamente el receptor P2X₇ no funcional. Preferiblemente, el grado de unión de un anticuerpo del receptor P2X₇ a una proteína no relacionada es menor que aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo al receptor P2X₇ medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), Biacore o citometría de flujo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une al receptor P2X₇ tiene una constante de disociación (Kd) de <1 μM, <100 nM, <10 nM, <1 nM o <0,1 nM. Un anticuerpo anti-receptor P2X₇ no funcional es generalmente uno que tiene algunas o todas estas características serológicas y que se une a receptores P2X₇ no funcionales pero no a receptores funcionales P2X₇.

Un anticuerpo con "afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurados preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo preferidos o los anticuerpos antagonistas inhiben de forma sustancial o completa la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", como se usa en este documento, es un anticuerpo, que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "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 pareja Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en este documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención.

"Epítipo" generalmente se refiere a la parte de un antígeno que está unida al sitio de unión del antígeno de un anticuerpo. Un epítipo puede ser "lineal" en el sentido de que los bucles hipervariables de las CDR de anticuerpos que forman el sitio de unión al antígeno se unen a una secuencia de aminoácidos como en una estructura de proteína primaria. En ciertas realizaciones, el epítipo es un "epítipo conformacional", es decir, uno en el que los bucles hipervariables de las CDR se unen a los residuos tal como se presentan en la estructura de la proteína terciaria o cuaternaria.

El "tratamiento" generalmente se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas.

Los sujetos que requieren tratamiento incluyen aquellos que ya tienen un tumor benigno, precanceroso o no metastásico, así como aquellos en los que se debe prevenir la aparición o recurrencia del cáncer.

El objetivo o resultado del tratamiento puede ser reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la

metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno.

La eficacia del tratamiento puede medirse evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad, las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

5 En una realización, la invención es particularmente útil para retrasar la progresión de la enfermedad.

En una realización, la invención es particularmente útil para extender la supervivencia del ser humano, incluyendo la supervivencia global así como la supervivencia libre de progresión.

10 En una realización, la invención es particularmente útil para proporcionar una respuesta completa a la terapia por la cual han desaparecido todos los signos de cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer haya sido curado.

En una realización, la invención es particularmente útil para proporcionar una respuesta parcial a la terapia por lo que ha habido una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o en la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento.

15 "Precancerosa" o "preneoplasia" generalmente se refiere a una afección o un crecimiento que típicamente precede o desarrolla un cáncer. Un crecimiento "precanceroso" puede tener células que se caracterizan por una regulación, proliferación o diferenciación anormal del ciclo celular, que puede determinarse mediante marcadores del ciclo celular.

En una realización, el cáncer es precanceroso o preneoplásico.

20 En una realización, el cáncer es un cáncer secundario o metástasis. El cáncer secundario puede estar localizado en cualquier órgano o tejido, y particularmente aquellos órganos o tejidos que tienen presiones hemodinámicas relativamente más altas, tales como pulmón, hígado, riñón, páncreas, intestino y cerebro.

25 Otros ejemplos de cáncer incluyen blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluidos tumores carcinoides, gastrinoma y células de islotes), mesotelioma, schwannoma (incluido el neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, leucemia o neoplasias linfoides, cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SGLG), cáncer de pulmón no microcítico (NSGLG), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluido cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer de esófago, tumores de las vías biliares, así como cáncer de cabeza y cuello.

35 "Una condición o síntoma asociado" [con el cáncer] puede ser cualquier patología que surja como consecuencia, precedente o producto del cáncer. Por ejemplo, cuando el cáncer es un cáncer de piel, la afección o el síntoma relevante puede ser una infección microbiana. Cuando el cáncer es un tumor secundario, la afección o el síntoma pueden estar relacionados con la disfunción del órgano relevante con las metástasis tumorales. En una realización, el tratamiento descrito en este documento es para la minimización o el tratamiento de una afección o síntoma en un individuo que está asociado con un cáncer en el individuo.

40 Una "molécula no propia, tal como un sitio de unión "no autoantígeno" o "anticuerpo no propio" generalmente se refiere a una molécula que se ha producido fuera de, o es exógena a, un cuerpo en el que se debe proporcionar la molécula, por ejemplo, para el tratamiento. Como ejemplo, las moléculas sintéticas o recombinantes son "no propias". Además, una molécula que se genera en un individuo y se administra a otro individuo para el tratamiento es "no propia". Los sitios de unión y los anticuerpos "no propios" del antígeno se pueden usar de acuerdo con la invención para la transferencia adoptiva de inmunidad, por ejemplo, como ocurre en la infusión de anticuerpos. En
45 contraste, una molécula que se genera dentro de un individuo que se va a tratar con esa molécula, generalmente es una molécula "propia" o "endógena". Un ejemplo de una molécula "propia" es un sitio de unión a antígeno o anticuerpo que se genera, o surge de una respuesta inmune adaptativa al inmunógeno.

El "nivel de sitios de unión a antígeno no propios en circulación" en el individuo generalmente se refiere a la concentración del sitio de unión a antígeno en un fluido corporal, preferiblemente sangre periférica.

50 Un "nivel sustancialmente indetectable de sitios de unión no antigénicos en circulación" generalmente se refiere a una concentración de sitios de unión a antígeno exógenos (es decir, los que se han administrado por transferencia adoptiva) que es al menos la mitad de la concentración de los sitios de unión a antígeno en circulación en el momento de la administración de los sitios de unión a antígeno, preferiblemente el 25%, o el 10%, o el 5% o el 1% de dicha concentración, o por lo demás, menos de 0,001 mg/kg del individuo. La frase también puede referirse a una

circunstancia en la que los sitios de unión a antígenos que se han administrado para la inmunoterapia contra el cáncer no se pueden detectar en absoluto.

5 Un cáncer que es "sustancialmente indetectable" generalmente se refiere a una circunstancia donde la terapia ha reducido el tamaño, volumen u otra medida física de un cáncer, de modo que se utilizan técnicas de detección estándar relevantes, como imágenes in vivo, el cáncer, como consecuencia de la terapia, no es claramente detectable. La frase también se refiere a la circunstancia de que el cáncer no se puede detectar en absoluto.

10 "Formar una respuesta inmune" generalmente se refiere a invocar o inducir inmunidad específica de antígeno a través del sistema inmune adaptativo. Como se entiende generalmente en la técnica, la inducción de la inmunidad específica de antígeno se distingue de la transferencia adoptiva de inmunidad, la inmunoterapia estándar de cáncer por la administración de anticuerpo exógeno o no propio es un ejemplo de este último.

Individuos seleccionados para el tratamiento

15 En general, los individuos seleccionados para el tratamiento como se describe anteriormente son aquellos que han recibido, o que continúan recibiendo inmunoterapia con anticuerpos, para el tratamiento del cáncer. La inmunoterapia con anticuerpos generalmente significa la administración de anticuerpos exógenos, (también conocidos como "no propios") a un individuo que requiere tratamiento, como en el caso de la transferencia adoptiva de anticuerpos. Por ejemplo, el individuo puede haber recibido cualquiera de los anticuerpos terapéuticos que han recibido aprobación reguladora para indicaciones relacionadas con la oncología. Avastin, Herceptin, Rituxan son ejemplos. Típicamente, el individuo ha recibido o continúa recibiendo un anticuerpo anti receptor P2X₇.

20 En una realización, el individuo puede haber recibido una inmunoterapia que conduce a una masa tumoral indetectable y ya no tiene anticuerpos exógenos circulantes detectables en el momento de la inmunización.

25 Además, el individuo seleccionado para el tratamiento como se describe anteriormente puede o no tener cáncer detectable en el momento del tratamiento. Cuando el individuo no tiene un cáncer detectable, se detecta más fácilmente una respuesta humoral primaria o secundaria porque, con el cáncer presente en una cantidad prácticamente no detectada, hay muy poco receptor P2X₇ no funcional disponible para eliminar IgM o IgG del fluido corporal. Este punto se demuestra en las Figuras 1 y 2.

30 El objetivo del tratamiento de acuerdo con la invención descrita anteriormente es minimizar al menos la progresión del cáncer por inducción o formación de una respuesta inmune en el individuo frente a un receptor P2X₇ no funcional. Por lo tanto, el individuo seleccionado para el tratamiento debe ser capaz de generar una respuesta inmune suficiente para cumplir con este propósito. En general, la respuesta inmune deseada incluye la capacidad de producir una o ambas IgM circulante e IgG cuando el individuo es amenazado por el cáncer, como en la recurrencia del cáncer.

35 Se puede medir o evaluar la presencia de una respuesta inmune frente al receptor P2X₇ no funcional cuando el individuo no tiene un cáncer detectable. En estas circunstancias, se cree que la ausencia de una masa absorbente de anticuerpo anti - receptor P2X₇ en forma de tumor aumenta la probabilidad de que haya un título sistémico más alto de anticuerpo anti - receptor P2X₇.

40 Los individuos que tienen la capacidad de generar la respuesta inmune descrita en este documento pueden seleccionarse o analizarse por una variedad de métodos bien conocidos en la técnica para la detección de la inmunodeficiencia. Típicamente, el individuo seleccionado para el tratamiento será uno que tenga al menos un recuento de componentes de glóbulos blancos dentro de los parámetros normales. Por ejemplo, un individuo para su inclusión es generalmente uno que tiene un recuento de glóbulos blancos de entre 4,0 a 11,0x 10⁹/L, o un recuento de linfocitos de entre 1,0 a 4,4 x 10⁹/L. El recuento de neutrófilos puede estar entre 1,9-7,8 x 10⁹/L; recuento de monocitos entre 0,2-1,0 x 10⁹/L, eosinófilos menor que aproximadamente 5,0 x 10⁹/l y basófilos menor que aproximadamente 0,2 x 10⁹/L.

45 Se entenderá que en ciertas realizaciones el recuento de células para cualquiera de estos componentes de células sanguíneas puede quedar fuera de estos intervalos indicados, particularmente en circunstancias en las que el individuo tiene una forma de cáncer de sangre, por ejemplo, CML, CLL, etc.

Generalmente, un factor importante es el recuento de linfocitos y/o el recuento de monocitos. Con más detalle, cuando alguno o ambos de estos recuentos están significativamente por debajo de los intervalos establecidos para estos componentes, es menos probable que el individuo responda a la administración del inmunógeno.

50 En otra realización, la selección de un individuo para terapia puede implicar una etapa de detección para seleccionar si el individuo es homocigótico para la expresión del receptor P2X₇ no funcional. Con más detalle, se entiende que un pequeño porcentaje de la población caucásica tiene expresión del receptor P2X₇ no funcional en células no cancerosas tales como ciertos timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos, monocitos y eritrocitos. Otros individuos pueden ser heterocigotos para esta expresión. En una realización, los individuos que son homocigóticos para la expresión del receptor P2X₇ no funcional se detectan y se excluyen del tratamiento, en cuyo caso los

individuos incluidos para el tratamiento no expresan el receptor P2X₇ no funcional en células no cancerosas o tienen, por el contrario, expresión heterocigótica.

5 Cuando el individuo continúa recibiendo inmunoterapia con anticuerpos, en una realización se permite que la inmunoterapia con anticuerpos continúe hasta el punto final clínico deseado. Típicamente, el punto final clínico deseado es una reducción del cáncer a niveles sustancialmente indetectables. Durante, o al finalizar la inmunoterapia, se evalúa la capacidad del individuo para formar o generar una respuesta inmune a un receptor P2X₇. Cuando la evaluación revela que es probable que el individuo se beneficie de la inmunización con el inmunógeno P2X₇, al individuo se le administra luego el inmunógeno.

10 En una forma preferida de la invención, el nivel de sitios de unión a antígeno no propios o exógenos en circulación en el individuo que surge de la inmunoterapia con anticuerpos es sustancialmente indetectable en el momento en que se forma la respuesta inmune en el individuo. Es importante destacar que, cuando el sitio de unión no antigénico se une al receptor P2X₇ no funcional o al receptor P2X₇ asociado al cáncer, un hallazgo clave del inventor es la eficacia del tratamiento con anticuerpos, particularmente cuando las células cancerosas tienen un número de copias muy bajo o son sustancialmente indetectables, disminuye a mayores concentraciones circulantes de sitios de unión a antígeno. Se cree que esto es una función del bajo número de copias de los receptores P2X₇ en las células cancerosas en relación con la alta concentración de los sitios de unión a antígeno que surgen en la inmunoterapia con anticuerpos estándar. Específicamente, en los ejemplos de este documento, el inventor ha descubierto que a medida que aumenta el nivel circulatorio de sitios de unión específicos de antígeno y disminuye el número de células cancerígenas, hay una probabilidad mucho mayor de amontonamiento del receptor P2X₇ por sitios de unión a antígeno que bloquean la unión específica del antígeno al receptor. Este bloqueo aumenta la probabilidad de que no sean posibles los efectos citotóxicos, apoptóticos u otros efectos de la unión específica al antígeno por un sitio de unión al antígeno. Se puede determinar el nivel de sitios de unión a antígeno exógenos en circulación mediante cualquier técnica serológica estándar capaz de detectar anticuerpos en fluido, siendo un ejemplo preferido el ELISA que usa un anticuerpo para capturar sitios de unión a antígeno.

25 Además de lo anterior, aunque no se desee vincularse a ninguna hipótesis, los inventores consideran que la administración de la inmunización en un momento en que está presente el anticuerpo infundido aumenta el riesgo de que el anticuerpo infundido se una al inmunógeno, lo que da como resultado la formación y eliminación de inmunocomplejos, evitando así la presentación del antígeno y la inducción de la inmunidad específica del antígeno. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, es particularmente útil esperar hasta que el nivel de sitios de unión a antígeno no propios o exógenos se haya eliminado de la circulación antes de la inducción de la respuesta inmune específica del antígeno al inmunógeno.

30 En realizaciones en las que el anticuerpo infundido no puede unirse al inmunógeno (es decir, porque el anticuerpo no es específico para el inmunógeno, por ejemplo, cuando el anticuerpo se une a un biomarcador que no está relacionado con el inmunógeno), la inmunización con inmunógeno puede producirse cuando haya anticuerpo infundido detectable, o antes de que ocurra la infusión de anticuerpos.

Sitios de unión a antígeno y administración

Un individuo que ha de ser tratado de acuerdo con la invención descrita en este documento puede ser uno que haya recibido, o que va a recibir, cualquiera de los anticuerpos terapéuticos indicados para oncología. Preferiblemente, el individuo ha recibido o continúa recibiendo un anticuerpo anti receptor P2X₇.

40 Normalmente, el sitio de unión al antígeno discrimina entre los receptores P2X₇ funcionales y no funcionales, para unirse a los receptores no funcionales, pero no a los receptores funcionales. Los ejemplos de estos sitios de unión a antígeno son los que se unen al epítipo E200, epítipo E300 o epítipo compuesto como, por ejemplo, en los documentos PCT/AU2002/000061, PCT/AU2002/001204, PCT/AU2007/001540, PCT/AU2007/001541, PCT/AU2008/001364, PCT/AU2008/001365, PCT/AU2009/000869 y PCT/AU2010/001070 (publicados como WO/2002/057306, WO/2003/020762, WO/2008/043145, WO/2008/043146, WO/2009/033233, WO/2009/033234, WO/2010/000041 y WO/2011/020155, respectivamente).

Independientemente de la especificidad, (es decir, de que el receptor de P2X₇ sea específico o no), el sitio de unión al antígeno puede tomar la forma de un anticuerpo completo, o un fragmento de anticuerpo completo tal como un Fab, un Fab', un F(ab')₂ y Fv, un Fv de cadena única, o un solo dominio variable.

50 El sitio de unión al antígeno puede ser singénico, alogénico o xenogénico.

Típicamente, el sitio de unión al antígeno no es propio o es exógeno, lo que significa que se ha encontrado o que se ha aislado fuera del individuo que se trata de acuerdo con la invención.

El sitio de unión al antígeno puede ser madurado por afinidad.

El sitio de unión al antígeno puede tener múltiples especificidades o valencias.

El sitio de unión al antígeno se puede adaptar para que sea adecuado para la administración mediante un método seleccionado.

5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo de cualquier isotipo. El anticuerpo puede ser uno obtenido a partir de antisueros monoclonales o policlonales. El anticuerpo puede producirse por hibridoma, o por expresión recombinante, o puede obtenerse a partir de suero, por ejemplo, que se puede obtener de un mamífero, particularmente un ser humano o un ratón. El anticuerpo también se puede obtener de un ave.

El anticuerpo puede ser quimérico, es decir, uno que contiene dominios variables humanos y dominios constantes no humanos. Alternativamente, puede humanizarse, es decir, formarse injertando CDR no humanas en un marco de anticuerpo humano. Aún más, el anticuerpo puede ser completamente humano.

10 El anticuerpo puede modificarse con respecto a la función efectora, para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer.

Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un dAb, Fab, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv y CDR.

15 La cantidad de dosificación, la frecuencia de dosificación, las vías de administración, etc. se describen en detalle a continuación.

20 Los métodos para preparar y administrar anticuerpos a un sujeto que lo necesita son bien conocidos o están fácilmente determinados por los expertos en la técnica. La vía de administración puede ser, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, rectal o vaginal), por inhalación o tópica. Una forma de administración sería una solución inyectable, en particular para inyección o goteo intravenoso o intraarterial, que comprende un tampón (por ejemplo, tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana). En otros métodos, los anticuerpos pueden administrarse directamente en el sitio de la enfermedad, aumentando así la exposición de la célula o tejido enfermo al anticuerpo.

25 Las preparaciones para la administración parenteral incluyen agua estéril (los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados) o soluciones no acuosas, suspensiones y emulsiones (los disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen 0,01 - 0,1 M y preferiblemente 0,05 M de tampón fosfato o 0,9% de solución salina. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de líquidos y nutrientes, reabastecedores 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.

35 Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles, en tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que sea fácil de inyectar. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferiblemente se conservará frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Las formulaciones adecuadas para uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16^a ed. (1980).

45 La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (por ejemplo, el sitio de unión a antígeno) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en este documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío, liofilización y secado por pulverización, lo que produce un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada-esterilizada en esto. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se introducen en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas,

jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones se pueden envasar y vender en forma de un kit. Tales artículos de fabricación tendrán preferiblemente etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos.

- 5 Las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de trastornos, como se describe en este documento, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis de tratamiento se pueden valorar usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.
- 10 Para el tratamiento de ciertos trastornos con un anticuerpo, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 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 huésped. 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, preferiblemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance
- 15 de la invención. A los sujetos se les pueden administrar tales dosis diariamente, en días alternativos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación ilustrativos incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días
- 20 consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más sitios de unión a antígeno con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada sitio de unión a antígeno administrado cae dentro de los intervalos indicados.

El anticuerpo para unirse a un receptor P2X₇ no funcional expresado en una célula se puede administrar en múltiples

25 ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre del polipéptido diana o la molécula diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de polipéptido en plasma de 1-1000 ug/ml y en algunos métodos de 25-300 ug/ml. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. La semivida de un anticuerpo también

30 se puede prolongar por fusión a un polipéptido o resto estable, por ejemplo, albúmina o PEG. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguidos por anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. En una realización, el anticuerpo puede administrarse en forma no conjugada. En otra realización, el anticuerpo puede administrarse múltiples veces en forma conjugada. En ciertas aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta (por ejemplo, hasta 400 mg/kg de molécula de unión anti P2X₇, por

35 ejemplo, anticuerpo por dosis) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Las cantidades pueden ser varios logaritmos inferiores (es decir, de 2 a 3 logaritmos inferiores) en las que el anticuerpo se conjuga con un radioisótopo o fármaco citotóxico.

Los agentes terapéuticos se pueden administrar por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales,

40 subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico; en algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde las células del receptor P2X₇ no funcionales se han acumulado, por ejemplo, por inyección intracraneal. La inyección intramuscular o la infusión intravenosa son las preferidas para la administración de anticuerpos.

Un anticuerpo puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el

45 tratamiento del trastorno o afección que necesitan tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Los ejemplos son agentes comúnmente usados para quimioterapia o radioterapia en oncología. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo o agente se puede administrar antes, durante o después de la intervención quirúrgica para la resección o eliminación de tumor o tejido.

Inmunógenos y formación de una respuesta inmune

- 50 Los métodos de la invención descritos en este documento requieren la formación de una respuesta inmune en un individuo para ser tratada con un receptor P2X₇, especialmente un receptor P2X₇ no funcional. En general, el inmunógeno, que se usa para este propósito, es uno que provoca una respuesta inmune al P2X₇ no funcional pero no a los receptores P2X₇ funcionales.

El inmunógeno puede incluir o consistir en un péptido que incluye una secuencia de un receptor P2X₇. El péptido

55 puede contener al menos una secuencia que puede presentarse en una molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad o que es capaz de interactuar con un receptor de células B o una inmunoglobulina unida a la membrana de células B. Típicamente, el péptido incluye una secuencia de un receptor P2X₇ humano o un fragmento del mismo.

Se conoce y discute una gama de inmunógenos peptídicos en PCT/AU2002/000061, PCT/AU2002/000061, PCT/AU2008/001364 y PCT/AU2009/000869.

Los inmunógenos péptidos ejemplares dentro de estas especificaciones, que incluyen epítomos para generar una respuesta inmune a un receptor P2X₇ no funcional se describen a continuación.

- | | | |
|----|--------------------|--|
| 5 | Solicitud PCT | Secuencia inmunogénica peptídica |
| | PCT/AU2002/000061, | GHNYTTRNILPGLNITC (SEQ ID NO:2) |
| | PCT/AU2002/000061 | |
| | PCT/AU2008/001364 | KYYKENNVEKRTLKVF (SEQ ID NO:3) |
| 10 | PCT/AU20Q9/OGO869 | GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 4) |

Un fragmento de receptor P2X₇ para su uso de acuerdo con la presente invención es capaz de inducir una respuesta inmune a un receptor P2X₇ e incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 3 y 4.

- 15 Se entenderá que estos son simplemente ejemplos de posibles inmunógenos útiles para formar una respuesta inmune de acuerdo con los métodos de la invención descritos en este documento. Además, la invención incluye el uso de otros péptidos como se describe en estas aplicaciones útiles para formar una respuesta inmune frente a los receptores P2X₇ no funcionales.

- 20 Típicamente, el régimen de inmunización implica 2 o más inmunizaciones. En una primera inmunización, el objetivo puede ser desarrollar una respuesta de IgM frente a la inmunización. Una segunda inmunización puede ser desarrollar una respuesta de IgG. Las inmunizaciones adicionales pueden ser para aumentar la respuesta de IgG, como se analiza adicionalmente a continuación.

Cuando el inmunógeno es un péptido, el péptido se puede proporcionar en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 1 mg por administración, preferiblemente de aproximadamente 0,25 a 0,75 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg.

- 25 Se puede aplicar una administración adicional de aproximadamente 0,3 mg de péptido como refuerzo.

- 30 Se puede realizar una primera inmunización cuando el nivel circulante de sitios de unión a antígeno que se han administrado para la inmunoterapia de anticuerpos sea sustancialmente indetectable. En otras palabras, el anticuerpo circulante para el biomarcador de cáncer relevante no se puede detectar en sangre periférica. El nivel de producción de IgM luego se controla durante las siguientes semanas. Aproximadamente de 4 a 5 semanas después de la primera inmunización, es probable que el nivel de anticuerpos IgM haya disminuido a niveles circulantes insignificantes. En este punto, se realiza una segunda inmunización y se controla el nivel de producción de IgG durante las siguientes semanas.

- 35 Después del refuerzo, el nivel de anticuerpo producido puede ser de 0,1-25 mg/kg, por ejemplo de 0,1 a 10 mg/kg, preferiblemente de 5 mg/kg, o de 10 a 25 mg/kg, preferiblemente 15 mg/kg y más de 10 mg/kg. Si esta cantidad se detecta en circulación dependerá de si existe una masa tumoral. Cuando hay una masa tumoral existente capaz de unirse al anticuerpo formado por la respuesta humoral, el nivel de anticuerpo detectado en la circulación puede estar en el extremo inferior de este intervalo, o incluso fuera del límite inferior del intervalo (es decir, menos de 0,1 mg/kg), o de otra manera ser sustancialmente indetectable. Cuando no hay una masa tumoral detectable, el nivel de anticuerpo formado a partir de la respuesta humoral puede estar en el extremo superior de este intervalo, aunque en ciertas realizaciones, en estas circunstancias, una cantidad de aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo puede ser suficiente. Se pueden realizar más pruebas de inmunidad en los siguientes meses/años y se pueden proporcionar inmunizaciones de refuerzo según sea necesario.

- 45 El grado o la cantidad de refuerzos puede depender del estado y la respuesta del paciente. Cuando los análisis o la falta de anticuerpos circulantes libres son indicativos de una carga tumoral existente, entonces los refuerzos se pueden realizar mensualmente, idealmente para asegurar una reacción suficiente del sistema inmune. Cuando los niveles libres de anticuerpos en el aumento del suero, los refuerzos pueden ser aliviados y tal vez aplicados 6-12 mensualmente al sujeto a la observación clínica.

- 50 Como se discutió anteriormente, la respuesta inmune puede dirigirse a un biomarcador que sea diferente al biomarcador que ha sido blanco de la inmunoterapia con anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo anti CD20 se puede usar para la inmunoterapia de anticuerpos y un inmunógeno P2X₇ no funcional usado para generar una respuesta inmune.

En otra realización, un biomarcador único se dirige por inmunoterapia e inmunización de anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido a un epítomo en un receptor P2X₇ (tal como el epítomo E300) se puede usar para

inmunoterapia de anticuerpos, y un inmunógeno para formar una respuesta inmune que se dirige a un epítipo diferente (tal como el epítipo E200) en P2X₇ puede ser usado para la inmunización.

Un inmunógeno peptídico puede tener una longitud de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ó 26 residuos. De acuerdo con la invención, un fragmento del receptor P2X₇ puede tener una longitud de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ó 26 residuos.

En una realización, el inmunógeno para formar una respuesta inmune de acuerdo con un método de la invención es un péptido que tiene una secuencia de un receptor P2X₇ que puede o no tener Pro210 en conformación cis.

El inmunógeno puede estar en forma de un dominio extracelular P2X₇ o una cualquiera o más de las isoformas P2X₇. El inmunógeno se puede proporcionar para la administración en una forma soluble o asociado con una fase sólida tal como una membrana celular, perlas u otra superficie.

Los métodos para explorar péptidos que pueden usarse como un inmunógeno para formar una respuesta inmune de acuerdo con los métodos de la presente invención se describen en la presente memoria. Un ejemplo incluye el uso de eritrocitos en un ensayo de reinicio. En este ensayo, se usa un anticuerpo que se une a receptores funcionales como control positivo en el que se observan rosetas. Se determina que un anticuerpo de prueba no se une a los receptores funcionales si no puede formar rosetas. Se determina que se une a receptores no funcionales si se observa que se une a una línea celular que expresa el receptor no funcional, que incluye los discutidos en este documento.

Los péptidos de la invención se pueden preparar mediante cualquier número de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen síntesis en fase sólida y tecnología de ADN recombinante.

Como se conoce en la técnica, un vehículo es una sustancia que puede conjugarse con un epítipo peptídico potenciando de ese modo la inmunogenicidad. Algunos portadores lo hacen uniéndose a múltiples péptidos para proporcionar un antígeno de mayor peso molecular al huésped en el que se desarrollará la respuesta inmune.

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

Cuando el portador es una toxina bacteriana o un toxoide, se prefieren los toxoides diftérico o tetánico.

Preferiblemente, el vehículo contiene grupos funcionales que pueden reaccionar con el péptido de la invención, o pueden modificarse para que sean capaces de reaccionar con el péptido.

El inmunógeno puede administrarse por vía subcutánea, intradérmica y/o intramuscular.

Adyuvantes

En una forma preferida, la composición para formar una respuesta inmune a un receptor P2X₇ para uso en la invención descrita en este documento incluye un adyuvante o compuesto para potenciar una respuesta inmune.

Se conoce una gran cantidad de adyuvantes; ver también Allison (1998, *Dev. Biol. Stand.*, 92: 3-11), Unkeless et al. (1998, *Annu. Rev. Immunol.*, 6: 251 - 281), y Phillips et al. (1992, *Vaccine*, 10: 151-158). Los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, sales de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc.; Baylor et al., *Vaccine*, 20: S18, 2002), adyuvantes de tipo gel (por ejemplo, fosfato de calcio, etc.); adyuvantes microbianos (por ejemplo, secuencias de ADN inmunomoduladoras que incluyen motivos CpG; endotoxinas tales como monofosforil lípido A (Ribi y col., 1986, *Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, p407, 1986); exotoxinas tales como la toxina del cólera, la toxina lábil al calor de *E. coli* y la toxina pertussis; dipéptido de muramilo, etc.); coadyuvantes basados en emulsiones oleosas y emulsionantes (por ejemplo, Adyuvante de Freund, MF59 [Novartis], SAF, etc.); adyuvantes particulados (por ejemplo, liposomas, microesferas biodegradables, etc.); adyuvantes sintéticos (por ejemplo, copolímeros de bloques no iónicos, análogos de péptidos de muramilo, polifosfaceno, polinucleótidos sintéticos, etc.); y/o combinaciones de los mismos. Otros ejemplos de adyuvantes incluyen algunos polímeros (por ejemplo, polifosfazenos, descritos en la patente de Estados Unidos 5.500.161), Q57, saponinas (por ejemplo, QS21, Ghochikyan y col., *Vaccine*, 24: 2275, 2006), escualeno, tetraclorodecaóxido, CPG 7909 (Cooper et al., *Vaccine*, 22: 3136, 2004), poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] (PCCP; Payne et al., *Vaccine*, 16:92, 1998), interferón- γ (Cao et al., *Vaccine*, 10: 238, 1992), copolímero de bloque P1205 (CRL1005; Katz y col., *Vaccine*, 18: 2177, 2000), interleucina-2 (IL-2; Mbwuie y col., *Vaccine*, 8: 347, 1990), metacrilato de polimetilo (PMMA; Kreuter y otros, *J. Pharm. Sci.*, 70: 367, 1981), etc.

En una realización, se proporciona un inmunógeno peptídico que contiene una secuencia de un receptor P2X₇ en la superficie de un bacteriófago para la inmunización de un individuo de acuerdo con un método de la invención descrito en este documento.

Cánceres y condiciones asociadas a ellos

- Las enfermedades preneoplásicas, neoplásicas y metastásicas son ejemplos particulares a los que se pueden aplicar los métodos de la invención. Ejemplos amplios incluyen tumores de mama, tumores colorrectales, adenocarcinomas, mesotelioma, tumores de vejiga, tumores de próstata, tumor de células germinales, hepatoma/colongio, carcinoma, tumores neuroendocrinos, neoplasia hipofisaria, tumor de células redondas pequeñas, cáncer de células escamosas, melanoma, fibroxantoma atípico, seminomas, no seminomas, tumores estromales de células de Leydig, tumores de células de Sertoli, tumores cutáneos, tumores renales, tumores testiculares, tumores cerebrales, tumores ováricos, tumores estomacales, orales, vesicales, óseos, cervicales, esofágicos, laríngeos, hepáticos, tumores de pulmón, tumores vaginales y tumor de Wilm.
- Los ejemplos de cánceres particulares incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma, adenoma, adenofibroma, adenolinfoma, adontoma, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer de la corteza suprarrenal, metaplasia mieloide agnogenética, alopecia, sarcoma alveolar parcial, 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, cáncer de hueso, cáncer de intestino, glioma de tronco encefálico, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, cáncer de mama, branquioma, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejido blando infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma cutáneo de células T, carcinoma (p. ej. Walker, basocelular, basoescamoso, Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, Krebs 2, célula de Merkel, mucinoso, pulmón de células no pequeñas, células de avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, células escamosas y células de transición), carcinosarcoma, displasia cervical, cistosarcoma filoides, cementoma, cordoma, choristoma, condrosarcoma, condroblastoma, craneofaringioma, colangioma, colesteatoma, cilindromoma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, dermatofibrosarcoma-protuberanos, tumor de células pequeñas redondas desmoplásico, carcinoma ductal, disgerminoma, cánceres endocrinos, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, melanoma de ojo, retinoblastoma, cáncer de trompas de Falopio, anemia de fanconi, fibroma, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad gestacional trofoblástica, glioma, cánceres ginecológicos, tumores de células gigantes, ganglioneuroma, glioma, glomangioma, tumor de células de la granulosa, ginandroblastoma, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatidiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, hamartoma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, hemangiosarcoma, trastornos histiocíticos, histiocitosis maligna, histiocitoma, hepatoma, hidradenoma, hondrosarcoma, inmunoproliferativo pequeño, opoma, melanoma oncológico, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhan, cáncer de laringe, leiomioma, leucemia, síndrome li-fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leiomiosarcoma, leucemia (p. ej. células b, células mixtas, células nulas, células T, células T crónicas, asociadas a htlv-ii, linfangiosarcoma, linfocítica aguda, linfocítica crónica, mastocítica y mieloide), leucosarcoma, tumor de células de leydig, liposarcoma, leiomioma, leiomioma, leiomioma, linfangioma, linfangiocitoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, cáncer de mama masculino, tumor-rabdoideo maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, síndrome carcinoide maligno, cardiopatía carcinoide, meduloblastoma, meningioma, melanoma, mesenquimoma, mesonefoma, mesotelioma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, mixoma, mixosarcoma, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura Nimega, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (nscl), neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibromatosis, neurofibroma, neuroma, neoplasmas (p. ej., de hueso, mama, sistema digestivo, colorrectal, hígado), cáncer ocular, cáncer esofágico, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, ostomía, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, osteoma, osteosarcoma, carcinoma de ovario, papiloma, paraganglioma, paraganglioma no crominférico, pinealoma, plasmacitoma, protooncogén, trastornos de cánceres raros y asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rbdomiosarcoma, Síndrome de Rothmund-Thomson, reticuloendoteliosis, rbdomioma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCL), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, sarcoma (p. ej. sarcomas experimentales, de Kaposi y de células cebadas de Ewing), tumor de células de Sertoli, sinovioma, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales (vejiga), cáncer de células transicionales (renal- pelvis-/uréter), cáncer trofoblástico, teratoma, tumor de células de teca, timoma, tumor trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Kits

También se describe un kit o artículo de fabricación que incluye:

- un sitio de unión a antígeno en forma de un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, dAb, Fab, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv o CDR reactivo con un receptor P2X₇, preferiblemente un receptor P2X₇ no funcional;
- 5 - un inmunógeno para generar una respuesta inmune a un receptor P2X₇ no funcional; y
- una etiqueta o prospecto con instrucciones de uso en un método descrito en este documento.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Inducción de la respuesta inmune en pacientes con LMC

Material y métodos

10 Péptido

El inmunógeno peptídico se sintetizó a alta pureza en la forma GHNYTTRNLPGLNITC a la que se añadió la maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS) reticulante en el residuo Cys C-terminal. El péptido se entrecruzó con una proteína transportadora de hemocianina de lapa californiana (KLH) de manera que el porcentaje promedio de péptido frente a conjugado peptídico-proteína total fue del 40%. Este péptido o el péptido alternativo GHNYTTRNLPGAGAKYYKENVK (SEQ ID NO: 6) conjugado de manera similar a KLH constituyeron dianas selectivas de epítipo, primarias y compuestas respectivamente que permitían la diferenciación de los receptores nfP2X₇ a partir de receptores nativos.

Adyuvantes

20 Se usó Inject Alum, un adyuvante aprobado comúnmente usado en inmunizaciones humanas, que consiste en una formulación acuosa de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio más estabilizadores inactivos en un gel. El conjugado péptido-proteína se añadió a una concentración de 2,5 mg/ml de conjugado (1 mg/ml de péptido) gota a gota con mezcla completa en el adyuvante en una cantidad igual a de 0,5 ml de conjugado a 0,75 ml de adyuvante que contenía 0,5 mg de epítipo peptídico diana.

Inmunización

25 El programa de inmunización consistió en una inoculación primaria (dos inyecciones por vía subcutánea y dos inyecciones por vía intramuscular) de un total de 0,5 mg de péptido seguido, un mes más tarde, de un refuerzo aplicado de la misma manera con 0,3 mg de péptido. Las muestras de suero se recogieron inmediatamente antes y una semana después de las inyecciones. La inoculación se administra idealmente no menos de un mes después de la infusión final de anticuerpo anti-nfP2X₇ para asegurarse de que no se secuestra el inmunógeno por el infundido de anticuerpo anti-nfP2X₇ residual específico.

ELISA

35 Se midieron las respuestas de anticuerpos anti-nfP2X₇ específicos mediante ELISA. En resumen, la placa de ELISA se recubrió con epítipo de péptido diana específico, desnudo o conjugado con un vehículo distinto al del contra que se generó con la respuesta de anticuerpo, sobre el cual se agrega suero de paciente en una concentración descendente. Después del lavado, se aplica un anticuerpo secundario antihumano apropiado (tipos anti-IgM o anti-IgG) para detectar y determinar la concentración de anticuerpo anti-nfP2X₇ humano específico presente en el suero del paciente en forma de IgM o IgG.

40 Después de la inoculación, no se detectó IgG pero se detectó una pequeña cantidad de IgM. Después del refuerzo, la concentración de IgM volvió a una línea de base de cero, mientras que la IgG se produjo a una concentración más alta que la IgM original, con la condición de que no hubiera un sumidero del receptor nfP2X₇ presente en el tumor existente. En ausencia de tal sumidero en pacientes para los cuales el tumor original había sido depurado por inmunoterapia anti-nfP2X₇ o terapias alternativas, se detectaba una población clara de anticuerpo anti-nfP2X₇ endógeno específico en el suero, del orden de 5 mg/kg.

Lista de secuencias

45 <110> Biosceptre International Limited

<120> Terapia de combinación

<130> 81827776TPG

<140> AU 2011902623

<141> 2011-07-01

ES 2 689 272 T3

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 595

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
100 105 110

Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
115 120 125

Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
130 135 140

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

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

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

ES 2 689 272 T3

Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460

ES 2 689 272 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Tyr
595

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 2
Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr
1 5 10 15

Cys

<210> 3
<211> 17
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val
1 5 10 15

Phe

<210> 4
15 <211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu Pro Gly Ala Gly Ala Lys
1 5 10 15

Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys
20 25

20 <210> 5
<211> 26

ES 2 689 272 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Cys
20 25

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un receptor P2X₇ o fragmento del mismo para su uso en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo, en donde el individuo ha recibido un sitio de unión antigénico no propio para el tratamiento del cáncer, donde el fragmento de un receptor P2X₇ es capaz de inducir una respuesta inmune frente a un receptor P2X₇, y que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3 y 4.
2. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de la reivindicación 1, en donde el individuo ha desarrollado una respuesta inmune frente al sitio de unión antigénico no propio.
- 10 3. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de la reivindicación 1 ó 2, donde el individuo ha recibido un sitio de unión antigénico no propio que se une al receptor P2X₇ no funcional, pero no al receptor P2X₇ funcional, para el tratamiento del cáncer.
- 15 4. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la respuesta inmune se forma proporcionando un inmunógeno en el individuo en forma de dicho receptor P2X₇, o dicho fragmento de un receptor P2X₇ que es capaz de inducir una respuesta inmune frente a un receptor P2X₇ en el individuo.
5. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de la reivindicación 4, en el que el sitio de unión antigénico no propio recibido por el individuo para el tratamiento del cáncer no se une a dicho receptor P2X₇ o a dicho fragmento de un receptor P2X₇.
- 20 6. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de la reivindicación 4, donde el inmunógeno se proporciona en una administración inicial al individuo, formando así una respuesta que incluye la producción de IgM en el individuo.
7. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de la reivindicación 4, donde el inmunógeno se proporciona en una administración inicial al individuo, formándose así una respuesta que incluye la producción de IgM, y un tiempo posterior, en una administración adicional a la administración inicial, formándose así una respuesta que incluya la producción de IgG.
- 25 8. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el sitio de unión antigénico no propio o el anticuerpo antígeno cancerígeno es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un dAb, Fab, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv y CDR.
- 30 9. Un receptor P2X₇ o fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la inhibición de la progresión del cáncer en un individuo de acuerdo con la reivindicación 5, donde el sitio de unión antigénico no propio se une a uno de los siguientes VEGF, VEGFA, VEGFC, VEGFD, Her-2 o CD20.
- 35 10. Una composición para uso en la formación de una respuesta inmune humoral a un antígeno asociado al cáncer en un individuo que ha recibido un anticuerpo anti-antígeno cancerígeno para el tratamiento del cáncer, incluyendo dicho compuesto un inmunógeno en la forma de un receptor P2X₇ asociado al cáncer o fragmento del mismo, en donde el fragmento de un receptor P2X₇ es capaz de inducir una respuesta inmune a un receptor P2X₇, y que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3 y 4.
- 40 11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el anticuerpo anti-antígeno cancerígeno es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un dAb, Fab, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv y CDR.

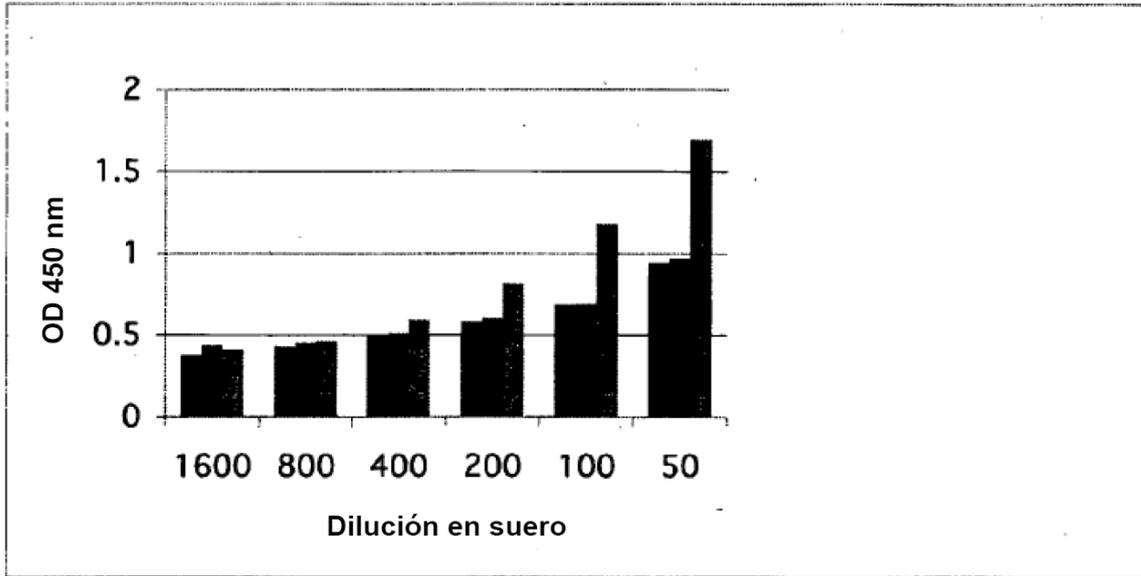


Figura 1

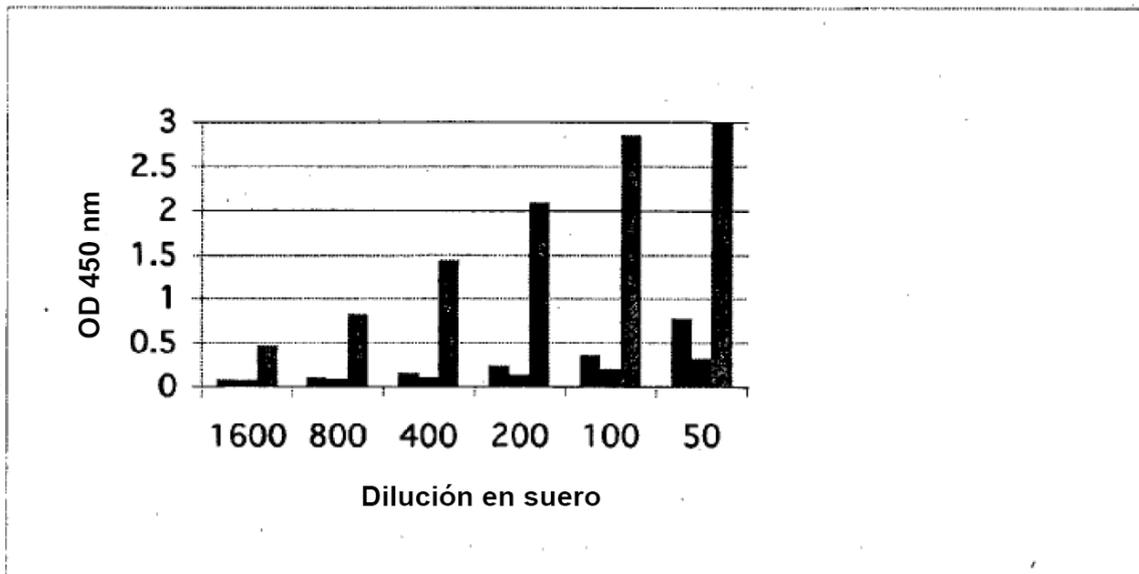


Figura 2