



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0915367-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0915367-5

(22) Data do Depósito: 03/07/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2015

(51) Classificação Internacional: C07K 16/28; A61K 38/17; A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 14/05; C07K 16/30.

(30) Prioridade Unionista: AU 2008903451 de 04/07/2008.

(54) Título: PEPTÍDEOS E EPÍTOPOS ANTI-P2X7

(73) Titular: BIOSCEPTRE INTERNATIONAL LIMITED. Endereço: Suite 3.08 56 Delhi Road, North Ryde NSW 2113, AUSTRÁLIA(AU)

(72) Inventor: JULIAN ALEXANDER BARDEN; ANGUS GIDLEY-BAIRD.

(87) Publicação PCT: WO 2010/000041 de 07/01/2010

Código de Controle: B8D3FFB25BA518BD 63A1E5304E4E1C47

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 13/10/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 13/10/2020

Assinado digitalmente por:

Adriana Briggs de Aguiar

Diretora Substituta de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"PEPTÍDEO ANTI-P2X₇".

Campo da invenção

[0001] A presente invenção refere-se a peptídeos, epítomos e produção de anticorpos monoclonais a partir dos mesmos.

Antecedentes da Invenção

[0002] Referência a qualquer técnica anterior no relatório descritivo não é e não deverá ser tomada como uma aceitação ou qualquer forma de sugestão que essa técnica anterior forma parte do conhecimento geral em comum na Austrália ou qualquer outra jurisdição e que poderia ser esperado, razoavelmente, que essa técnica anterior seja atribuída, entendida e considerada como relevante por aqueles versados na técnica.

[0003] Receptores purinérgicos (P2X) são canais cátion-seletivos ATP-ativados. Cada receptor é composto de três subunidades de proteína ou monômeros. Até o momento, sete genes distintos que codificam monômeros de P2X foram identificados: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7.

[0004] Receptores P2X7 são de interesse particular, uma vez que a expressão desses receptores é entendida como estando limitada a células tendo potencial de sofrer morte celular programada, tais como timócitos, células dendríticas, linfócitos, macrófagos e monócitos. Há alguma expressão de receptores P2X7 em homeostase normal, tal como sobre eritrócitos.

[0005] De modo interessante, um receptor P2X₇ contendo um ou mais monômeros tendo uma isomerização *cis* em Pro210 (de acordo com SEQ ID No: 1 na figura 1) e o qual é desprovido de função de ligação a ATP foi encontrado sobre células que se considerava incapazes de sofrer morte celular programada, tais como células pré-neoplásicas e células neoplásicas. Essa isoforma do receptor foi

referida como um receptor "não funcional".

[0006] Anticorpos gerados a partir de imunização com um peptídeo incluindo Pro210 em cis se ligam a receptores P2X7 não funcionais. Contudo, eles não se ligam a receptores P2X7 capazes de ligação a ATP. Consequentemente, esses anticorpos são úteis para detecção seletiva de muitas formas de carcinoma e cânceres hematopoiéticos e para o tratamento de algumas dessas condições.

[0007] Os documentos WO02/057306A1 e WO03/020762A1 discutem uma sonda para distinguir entre receptores P2X7 funcionais e receptores P2X7 não funcionais na forma de um anticorpo monoclonal.

[0008] Antissoro monoclonal tem determinadas características não encontradas em polissoro as quais tornam o antissoro monoclonal um reagente particularmente vantajoso para uso em pesquisa, diagnóstico e terapia. Chave dentre essas é que anticorpos monoclonais geralmente têm uma afinidade por antígeno que é maior do que a afinidade da maioria das especificidades encontradas em um polissoro.

[0009] Até o momento, tem sido muito difícil obter um hibridoma que gera quantidades úteis de anticorpo monoclonal contra receptores P2X7 não funcionais, conforme expresso em células vivas e, em particular, anticorpos monoclonais que podem ser usados em uma faixa de aplicações diagnósticas e terapêuticas. Além disso, os inventores não têm ciência de qualquer anticorpo monoclonal que tenha sido gerado contra receptores P2X7 funcionais sobre células vivas. Há uma necessidade por tais reagentes, particularmente por novos anticorpos capazes de discriminar entre receptores P2X7 de ligação e não ligação a ATP sobre células vivas.

[00010] Ainda, na medida em que os inventores têm conhecimento, anticorpos anti-P2X₇ em geral não discriminam entre monômeros de

P2X₇ e o receptor P2X₇ trimérico formado a partir desses monômeros. Anticorpos que se ligam ao receptor trimérico, mas não a monômeros de P2X₇, seriam vantajosos para estagnar um câncer, dado que o receptor trimérico é particularmente encontrado em tecido neoplásico avançado.

Sumário da Invenção

[00011] A invenção refere-se a peptídeos e epítomos para estimulação de anticorpos que se ligam a receptores P2X7 não funcionais, mas não a receptores P2X7 funcionais, sobre células vivas. Os peptídeos são também úteis para estimulação de anticorpos que se ligam a receptores P2X7 funcionais, mas não a receptores P2X7 não funcionais, sobre células vivas. A invenção refere-se também a anticorpos que se ligam a esses peptídeos, a composições contendo esses peptídeos, a métodos para uso dos peptídeos para gerar anticorpos e a métodos de diagnóstico e tratamento de uma doença associada à expressão de receptor P2X7 não funcional.

[00012] Em determinadas modalidades, é proporcionado um epítomo de um receptor P2X7, o epítomo sendo formado de uma primeira região na forma de uma região de um primeiro monômero de um receptor P2X7; e uma segunda região na forma de um segundo monômero do receptor; em que as primeira e segunda regiões são formadas no receptor por meio de *cis* isomerização de um resíduo na posição 210 de SEQ ID NO: 1 de um monômero do receptor; e em que as primeira e segunda regiões estão dispostas adjacentes uma à outra no receptor, desse modo, permitindo ligação de um sítio de ligação a antígeno de um anticorpo anti-P2X7 às primeira e segunda regiões que formam o epítomo.

[00013] Em outras modalidades, é proporcionado um receptor P2X7 tendo um epítomo conforme descrito acima. Tipicamente, um ou mais dos monômeros do receptor têm uma *cis* isomerização de um resíduo

na posição 210 de SEQ ID NO: 1 do monômero.

[00014] Em outras modalidades, é proporcionado um anticorpo para ligação a um epítopo de um receptor P2X7, o epítopo sendo formado de uma primeira região na forma de uma região de um primeiro monômero de um receptor P2X7; e uma segunda região na forma de uma região de um segundo monômero do receptor; em que as primeira e segunda regiões são formadas no receptor por meio de cis isomerização de um resíduo na posição 210 de SEQ ID NO: 1 de um monômero do receptor; e em que as primeira e segunda regiões estão dispostas adjacentes uma à outra no receptor, desse modo, permitindo ligação de um sítio de ligação a antígeno do anticorpo às primeira e segunda regiões que formam o epítopo.

[00015] Em uma modalidade, é proporcionado um complexo imune na forma de um epítopo, conforme descrito acima, ligado a um anticorpo.

[00016] Em outra modalidade, é proporcionado um peptídeo incluindo uma região N terminal e uma região C terminal, as regiões N e C terminais sendo, cada uma, definidas por resíduos N e C terminais, em que:

- a região N terminal inclui uma sequência de HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 2) ou fragmento da mesma de pelo menos 4 resíduos;

- a região C terminal inclui um resíduo C terminal que é prolina, alanina ou glicina;

- em que o resíduo C terminal da região N terminal é covalentemente ligado a um resíduo N terminal da região C terminal;

- em que o resíduo C terminal da região C terminal é conectado a um outro peptídeo através de um ligante tendo um comprimento de cerca de 10 a 40 angstroms;

- e em que o referido outro peptídeo consiste em uma sequência

KTTNVSLYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTLKVFGRFDILVFGTGGKF
D (SEQ ID NO: 6) ou fragmento da mesma de pelo menos 4 resíduos.

[00017] Em ainda outra modalidade, é proporcionado um peptídeo definido pela fórmula: (A)(X_n)(B), em que:

- (A) é uma sequência de aminoácidos de GHNYTTRNILP (SEQ ID NO: 8) ou um fragmento da mesma de pelo menos 4 aminoácidos;

- (X_n) é um ligante de 10 a 40 angstroms de comprimento, o referido ligante consistindo em um ou mais resíduos de aminoácido;

- (B) é uma sequência de aminoácidos de AKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 9) ou um fragmento da mesma de pelo menos 4 aminoácidos.

[00018] Em outras modalidades, é proporcionado um peptídeo tendo a seguinte sequência: GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 10).

[00019] Em ainda outras modalidades, é proporcionado um complexo imune na forma de um peptídeo descrito acima ligado a um anticorpo. Tipicamente, o anticorpo se liga a receptores P2X₇ não funcionais, mas não a receptores P2X₇ funcionais.

[00020] Em ainda outras modalidades, é proporcionado um uso de um peptídeo descrito acima para produção de um anticorpo para ligação a receptores P2X₇ não funcionais.

[00021] Em ainda outras modalidades, é proporcionado um uso de um anticorpo descrito acima para determinar se um indivíduo tem um câncer.

[00022] Em ainda outras modalidades, um uso de um anticorpo descrito acima para tratamento de um indivíduo tendo câncer.

[00023] Em ainda outras modalidades, é proporcionado um kit incluindo um anticorpo conforme descrito acima e, opcionalmente:

- um peptídeo conforme descrito acima;

o kit incluindo instruções por escrito para uso em diagnóstico ou tratamento de câncer.

Descrição Detalhada das Modalidades

[00024] Referência será feita agora em detalhes a determinadas modalidades da invenção. Embora a invenção seja descrita em conjunto com as modalidades, será entendido que a intenção não é limitar a invenção a essas modalidades. Pelo contrário, a invenção se destina a abranger todas as alternativas, modificações e equivalentes os quais possam ser incluídos dentro do escopo da presente invenção, conforme definido pelas reivindicações.

[00025] Aqueles versados na técnica reconhecerão muitos métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui, os quais poderiam ser usados na prática da presente invenção. A presente invenção não está, de forma alguma, limitada aos métodos e materiais descritos.

[00026] Será entendido que a invenção descrita e definida no presente relatório descritivo se estende a todas as combinações alternativas de duas ou mais das características individuais mencionadas ou evidentes a partir do texto ou desenhos. Todas essas diferentes combinações constituem diversos aspectos alternativos da invenção.

[00027] Conforme usado aqui, exceto onde o contexto requer de outro modo, o termo "compreende" e variações do termo, tais como "compreendendo", "compreendem" e "compreendido(a)", não se destinam a excluir outros aditivos, componentes, inteiros ou etapas.

[00028] Todas as patentes e publicações mencionadas aqui são incorporadas por referência em sua totalidade.

[00029] O antissoro anti-P2X7 contra receptores P2X7 não funcionais expressos sobre células vivas disponíveis no momento da invenção eram todos policlonais.

[00030] Os inventores identificaram um epítopo que é exclusivamente expresso sobre receptores P2X₇ de não ligação ao ATP (de outro modo conhecidos como "receptores não funcionais"). Descobriu-se que o epítopo e peptídeos que o formam são úteis para a geração de anticorpos monoclonais que se ligam a receptores P2X₇ não funcionais expressos sobre células vivas.

[00031] A ligação à células vivas é importante porque acredita-se que a expressão do receptor P2X₇ não funcional em ou sobre células, exemplos sendo células epiteliais, seja um biomarcador de muitos cânceres, tais como cânceres epiteliais e outras condições. Consequentemente, com anticorpos monoclonais que se ligam a células vivas se torna possível proporcionar produtos terapêuticos sistêmicos na forma do anticorpo em si ou um conjugado de anticorpo-agente citotóxico para uma ampla faixa de doenças caracterizadas por expressão de receptores P2X₇ não funcionais. Também se torna possível proporcionar formação de imagem in vivo e diagnóstico ou monitoramento de doenças caracterizadas por expressão de receptores P2X₇ não funcionais.

[00032] Os inventores observaram, a partir de modelamento molecular detalhado ainda descrito aqui, que o epítopo é encontrado apenas sobre o receptor P2X₇, isto é, o trímero formado a partir de monômeros de P2X₇. Mais particularmente, o epítopo abrange monômeros de P2X₇ adjacentes no receptor P2X₇ trimérico. Monômeros de P2X₇ individuais que não são alinhados conforme em um receptor trimérico não funcional, portanto, não contêm o epítopo. Isso permite, vantajosamente, que se estagna tumores. Isso é mais difícil de fazer com anticorpos que se ligam ao receptor P2X₇ monomérico e trimérico.

[00033] Para fins de interpretação do presente relatório descritivo, as definições a seguir se aplicarão em geral e, sempre que apropriado,

os termos usados no singular também incluem o plural e vice-versa. No caso em que qualquer definição apresentar conflitos com qualquer documento incorporado aqui por referência, a definição apresentada abaixo prevalecerá.

[00034] "*Receptor purinérgico*" refere-se, em geral, a um receptor que usa uma purina (tal como ATP) como um ligante.

[00035] "*Receptor P2X7*" refere-se, em geral, a um receptor purinérgico formado a partir de três subunidades de proteína ou monômeros, com pelo menos um dos monômeros tendo uma sequência de aminoácido substancialmente conforme mostrado em SEQ ID NO: 1. Até o ponto em que o receptor P2X7 é formado a partir de três monômeros, ele é um "trímero" ou "trimérico". "*Receptor P2X7*" pode ser um receptor funcional ou não funcional, conforme descrito abaixo. "*Receptor P2X7*" abrange variantes que ocorrem naturalmente de receptor P2X7, por exemplo, em que os monômeros de P2X7 são variantes com recombinação ("splicing"), variantes alélicas e isoformas incluindo formas truncadas ou secretadas que ocorrem naturalmente dos monômeros que formam o receptor P2X7 (por exemplo, uma forma consistindo na sequência de domínio extracelular ou forma truncada da mesma), formas variantes que ocorrem naturalmente (por exemplo, formas com recombinação alternativa) e variantes alélicas que ocorrem naturalmente. Em determinadas modalidades da invenção, os polipeptídeos monoméricos de P2X7 de sequência nativa descritos aqui são polipeptídeos de sequência nativa madura ou de comprimento total compreendendo a sequência de aminoácidos de comprimento total mostrada em SEQ ID NO: 1. Em determinadas modalidades, o receptor P2X7 pode ter uma sequência de aminoácido que é modificada, por exemplo, vários dos aminoácidos na sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 podem ser substituídos, deletados ou um resíduo pode ser inserido.

[00036] "Receptor P2X7 funcional" refere-se, em geral, a uma forma do receptor P2X₇ tendo um sítio de ligação ou agrupamento para ligação ao ATP. Quando ligado ao ATP, o receptor forma um poro - estrutura semelhante que permite o ingresso de íons de cálcio no citosol, uma consequência do qual pode ser a morte celular programada. Em homeostase normal, expressão de receptores P2X₇ funcionais está, em geral, limitada a células que sofrem morte celular programada, tais como timócitos, células dendríticas, linfócitos, macrófagos e monócitos. Pode também haver alguma expressão de receptores P2X7 funcionais sobre eritrócitos.

[00037] "Receptor P2X7 não funcional" refere-se, em geral, a uma forma de um receptor P2X7 na qual um ou mais dos monômeros tem uma cis isomerização em Pro210 (de acordo com SEQ ID NO: 1). A isomerização pode surgir de qualquer evento molecular que leva à duplicação errônea do monômero incluindo, por exemplo, mutação da sequência monomérica primária ou processamento pós-traducional anormal. Uma consequência da isomerização é que o receptor é incapaz de ligação ao ATP. Nessas circunstâncias, o receptor não pode formar um poro e isso limita a extensão até a qual íons de cálcio podem entrar no citosol. Receptores P2X7 não funcionais são expressos sobre uma ampla faixa de cânceres epiteliais e hematopoiéticos.

[00038] "Anticorpos" ou "imunoglobulinas" ou "Igs" são proteínas gama globulina que são encontradas no sangue ou outros fluidos corporais de vertebrados que funcionam no sistema imune para se ligar a antígeno, consequentemente, identificando e/ou neutralizando objetos estranhos.

[00039] Anticorpos são, em geral, uma glicoproteína heterotetramérica composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia L é ligada a uma

cadeia H através de uma ligação de dissulfeto covalente. As duas cadeias H são ligadas uma à outra através de uma ou mais ligações de dissulfeto, dependendo do isotipo da cadeia H. Cada cadeia H e L também tem pontes de dissulfeto intracadeia regularmente espaçadas.

[00040] Cadeias H e L definem domínios de Ig específicos. Mais particularmente, cada cadeia H tem, no N terminal, um domínio variável (V_H) seguido por três domínios constantes (C_H) para cada uma das cadeias α e γ e quatro domínios C_H para os isotipos μ e ϵ . Cada cadeia L tem, no N terminal, um domínio variável (V_L), seguido por um domínio constante (C_L) em sua outra extremidade. O V_L é alinhado com o V_H e o C_L é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada ($CH1$).

[00041] Anticorpos podem ser atribuídos a diferentes classes ou isotipos. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM tendo cadeias pesadas designadas como α , δ , ϵ e μ , respectivamente. As classes γ e α são ainda divididas em subclasses com base em diferenças relativamente mínimas na sequência e função do CH , por exemplo, seres humanos expressam as seguintes subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. A cadeia L de qualquer espécie vertebrada pode ser atribuída a um de dois tipos claramente distintos, denominados kappa e lambda, baseado nas sequências de aminoácido de seus domínios constantes.

[00042] O domínio constante inclui a porção F_c , a qual compreende as porções carboxi terminais de ambas as cadeias H mantidas juntas através de dissulfetos. As funções efetadoras de anticorpos, tal como ADCC, são determinadas por sequências na região F_c , região a qual é também a parte reconhecida por receptores F_c (F_cR) encontrados sobre determinados tipos de células.

[00043] O emparelhamento de um V_H e V_L juntos forma uma "*região variável*" ou "*domínio variável*" incluindo os domínios amino terminais

da cadeia pesada ou leve do anticorpo. O domínio variável da cadeia pesada pode ser referido como "VH". O domínio variável da cadeia leve pode ser referido como "VL". O domínio V contém um "sítio de ligação a antígeno" o qual afeta a ligação a antígeno e define a especificidade de um anticorpo particular por seu antígeno particular. Regiões V abrangem cerca de 110 resíduos de aminoácido e consistem em trechos relativamente invariáveis denominadas regiões de estrutura ("*framework regions*") (FRs) (em geral cerca de 4) de 15-30 aminoácidos separados por regiões mais curtas de variabilidade extrema denominadas "*regiões hipervariáveis*" (em geral cerca de 3) que têm, cada uma, 9-12 aminoácidos de comprimento. As FRs adotam grandemente uma configuração de β -folha e as regiões hipervariáveis formam alças que conectam e, em alguns casos, formam parte da estrutura de β -folha.

[00044] "Região hipervariável" refere-se a regiões de um domínio variável de anticorpo as quais são hipervariáveis quando à sequência e/ou formam alças estruturalmente definidas. Em geral, anticorpos compreendem seis regiões hipervariáveis: três no VH (H1, H2, H3) e três no VL (L1, L2, L3).

[00045] Resíduos de estrutura ou "FR" são aqueles outros resíduos de domínio variável que não os resíduos de região hipervariável aqui definidos.

[00046] Um anticorpo "intacto" ou "inteiro" é um o qual compreende um sítio de ligação a antígeno, bem como um CL e pelo menos domínios constantes de cadeia pesada, CH1, CH2 e CH3. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (por exemplo, domínios constantes de sequência nativa humana) ou uma variante de sequência de aminoácido da mesma.

[00047] "Fragmentos de anticorpo inteiro incluindo um domínio variável" incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpos,

anticorpos lineares, moléculas de anticorpo com uma única cadeia; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

[00048] O "fragmento Fab" consiste em uma cadeia L inteira junto com o domínio de região variável da cadeia H (V_H) e o primeiro domínio constante de uma cadeia pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab é monovalente com relação à ligação a antígeno, isto é, tem um único sítio de ligação a antígeno.

[00049] Um "fragmento Fab'" difere de fragmentos Fab por ter poucos resíduos adicionais no carboxi término do domínio CH_1 , incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' no qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes traz(em) um grupo tiol livre.

[00050] Um "fragmento $F(ab')_2$ " corresponde, grosseiramente, a dois fragmentos Fab dissulfeto-ligados tendo atividade de ligação a antígeno divalente e ainda é capaz de ligação cruzada com o antígeno.

[00051] Um "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo o qual contém um sítio de ligação e reconhecimento de antígeno completo. Esse fragmento consiste em um dímero de um domínio de região variável de cadeia pesada e um de leve em associação não covalente hermética.

[00052] Em espécies Fv com uma única cadeia (scFv), um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve podem ser covalentemente ligados por um ligante peptídico flexível, de modo que as cadeias leve e pesada podem se associar em uma estrutura "dimérica" análoga àquela em uma espécie Fv com duas cadeias. A partir de duplicação desses dois domínios emanam seis alças hipervariáveis (3 alças de cada uma das cadeias H e L) que contribuem com resíduos de aminoácido para ligação a antígeno e

conferem especificidade de ligação a antígeno ao anticorpo.

[00053] "Fv de cadeia *simples*", também abreviado como "sFv" ou "scFv" são fragmentos de anticorpo que compreendem os domínios V_H e V_L de anticorpo conectados para formar uma cadeia polipeptídica única. De preferência, o polipeptídeo de scFv ainda compreende um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L, o qual permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação a antígeno.

[00054] Um "domínio variável único" é metade de um Fv (compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) que tem a capacidade de reconhecer e se ligar a antígeno, embora em uma afinidade menor do que o sítio de ligação todo.

[00055] "Diacorpos" refere-se a fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação a antígeno, fragmentos os quais compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica (V_H-V_L). Os fragmentos de anticorpo são preparados construindo fragmentos sFv (vide parágrafo precedente) com ligantes curtos (cerca de 5-10 resíduos) entre os domínios V_H e V_L, de modo que emparelhamento intercadeia, mas não intracadeia, dos domínios V é obtido, resultando em um fragmento bivalente, isto é, fragmento tendo dois sítios de ligação a antígeno.

[00056] Diacorpos podem ser bivalentes ou biespecíficos. Diacorpos biespecíficos são heterodímeros de dois fragmentos sFv "cruzados" nos quais os domínios V_H e V_L dos dois anticorpos estão presentes sobre diferentes cadeias polipeptídicas. Triacorpos e tetracorpos também são, em geral, conhecidos na técnica.

[00057] Um "anticorpo isolado" é um o qual foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente pré-existente. Componentes contaminantes são materiais que interferirão com usos terapêuticos para o anticorpo e podem incluir enzimas,

hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos.

[00058] Um "anticorpo humano" refere-se a um anticorpo o qual possui uma sequência de aminoácido a qual corresponde àquela de um anticorpo produzido por um ser humano. Anticorpos humanos podem ser produzidos usando diversas técnicas conhecidas no campo, incluindo bibliotecas de exposição em fagos. Anticorpos humanos podem ser preparados mediante administração do antígeno a um animal transgênico o qual tenha sido modificado para produzir tais anticorpos em resposta a um estímulo antigenico, mas cujos loci endógenos foram inativados.

[00059] Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, roedor) são anticorpos quiméricos que contêm a sequência mínima derivada do anticorpo não humano. Em sua maioria, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nas quais resíduos de uma região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano, tendo a especificidade, afinidade e capacidade de anticorpo desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um e, tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina

humana. O anticorpo humanizado também compreenderá, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana.

[00060] "Anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto quanto às possíveis mutações que ocorrem naturalmente que possam estar presentes em quantidades mínimas. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio ou determinante antigênico sobre o antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos pelo fato de que eles podem ser sintetizados não contaminados por outros anticorpos. Anticorpos monoclonais podem ser preparados através da metodologia de hibridoma. Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de visualização de anticorpo usando essas técnicas.

[00061] O termo "anticorpo receptor anti-P2X7" ou "um anticorpo que se liga a um receptor P2X7" refere-se a um anticorpo que é capaz de ligação ao receptor P2X7 com afinidade suficiente, de modo que o anticorpo é útil como um agente diagnóstico e/ou terapêutico quanto à objetivação do receptor P2X7, tipicamente receptor P2X7 não funcional. De preferência, a extensão de ligação de um anticorpo receptor anti-P2X7 a uma proteína de receptor P2X7 não relacionada é menos do que cerca de 10% da ligação do anticorpo ao receptor P2X7 conforme medido, por exemplo, através de um radioimunoensaio (RIA). Em determinadas modalidades, um anticorpo que se liga ao receptor P2X7 tem uma constante de dissociação (K_d) de $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$ ou $< 0,1 \text{ nM}$. Um anticorpo receptor anti-P2X7 não funcional é, em geral, um tendo algumas ou todas essas

características sorológicas e que se liga a receptores P2X7 não funcionais, mas não a receptores P2X7 funcionais.

[00062] Um anticorpo "maturado por afinidade" é um com uma ou mais alterações em uma ou mais regiões hipervariáveis do mesmo, as quais resultam em um aprimoramento na afinidade do anticorpo pelo antígeno, comparado com um anticorpo parental o qual não possui essa(s) alteração(ões). Anticorpos maturados por afinidade preferidos têm afinidades nanomolares ou mesmo picomolares pelo antígeno-alvo. Anticorpos maturados por afinidade são produzidos por meio de procedimentos conhecidos na técnica.

[00063] Um "anticorpo de bloqueio" ou um anticorpo "antagonista" é um o qual inibe ou reduz a atividade biológica do antígeno ao qual ele se liga. Anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas preferidos inibem substancial ou completamente a atividade biológica do antígeno.

[00064] Um "anticorpo agonista", conforme usado aqui, é um anticorpo o qual imita pelo menos uma das atividades funcionais de um polipeptídeo de interesse.

[00065] "Afinidade de ligação" refere-se, em geral, à resistência da soma total de interações não covalentes entre um único sítio de ligação de uma molécula (por exemplo, um anticorpo) e seu parceiro de ligação (por exemplo, um antígeno). A menos que de outro modo indicado, conforme usado aqui, "afinidade de ligação" refere-se à afinidade de ligação intrínseca a qual reflete uma interação a 1:1 entre membros de um par de ligações (por exemplo, anticorpo e antígeno). A afinidade de uma molécula X por seu parceiro Y pode, em geral, ser representada pela constante de dissociação (K_d). A afinidade pode ser medida através de métodos comuns conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos aqui. Anticorpos com baixa afinidade, em geral, se ligam ao antígeno lentamente e tendem a dissociar prontamente,

enquanto que anticorpos de alta afinidade, em geral, se ligam ao antígeno mais rápido e tendem a permanecer ligados mais tempo. Uma variedade de métodos de medição da afinidade de ligação são conhecidos na técnica, qualquer um dos quais podendo ser usado para fins da presente invenção.

[00066] "Epítopo" refere-se, em geral, àquela parte de um antígeno que é ligado através do sítio de ligação a antígeno de um anticorpo. Um epítopo pode ser "*linear*" no sentido de que as alças hipervariáveis das CDRs do anticorpo que formam o sítio de ligação a antígeno se ligam a uma sequência de aminoácidos conforme em uma estrutura de proteína primária. Em determinadas modalidades, o epítopo é um "*epítopo conformacional*", isto é, um no qual as alças hipervariáveis das CDRs se ligam a resíduos conforme eles são apresentados na estrutura de proteína terciária ou quaternária.

[00067] Em uma modalidade, é proporcionado um epítopo de um receptor P2X₇, o epítopo sendo formado de:

- uma primeira região na forma de uma região de um primeiro monômero de um receptor P2X₇; e
- uma segunda região na forma de uma região de um segundo monômero do receptor;

em que as primeira e segunda regiões são formadas no receptor por meio de *cis* isomerização de um resíduo na posição 210 de SEQ ID NO: 1 de um monômero do receptor;

e em que as primeira e segunda regiões são dispostas adjacentes uma à outra no receptor, desse modo, permitindo ligação de um sítio de ligação a antígeno de um anticorpo anti-P2X₇ às primeira e segunda regiões que formam o epítopo.

[00068] Tipicamente, o epítopo é um epítopo conformacional. Nessas modalidades, as primeira e segunda regiões definem, cada uma, um espaço molecular que inclui, cada uma, um ou mais resíduos

de SEQ ID NO: 1. Tipicamente, a primeira região é uma que define um espaço molecular incluindo um ou mais dos resíduos de SEQ ID NO: 1 que estão expostos para ligação a um sítio de ligação a antígeno de um anticorpo como uma consequência de *cis* isomerização de Pro210 de um monômero tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 1. Esses resíduos incluem Gly 200, His 201, Asn 202, Tyr 203, Thr 204, Thr 205, Arg 206, Asn 207, Ile 208, Leu 209 e Pro210. Em uma modalidade, a primeira região inclui pelo menos um desses resíduos. Tipicamente, a primeira região inclui pelo menos 4 desses resíduos, embora possa ter menos, por exemplo, 2 ou 3, dependendo de quantos resíduos são apresentados na segunda região. Em uma modalidade, a primeira região inclui pelo menos 1 par de resíduos mostrado na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1

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

[00069] Em determinadas modalidades, a primeira região inclui 2 ou

mais pares de resíduos mostrados na Tabela 2.

[00070] A primeira região pode, adicionalmente, conter um ou mais resíduos periféricos que estão intimamente envolvidos na formação do sítio de ligação a ATP sobre a maioria das duas dobras de domínio extracelular. Esses são Lys 193, Phe 275 e Arg 294. Arg 125 está localizado na menor das duas dobras de domínio extracelular. Assim, em determinadas modalidades, a primeira região ainda inclui um ou mais dos seguintes resíduos de SEQ ID NO: 1: Arg 125, Lys 193, Phe 275 e Arg 294. Será entendido que a primeira região não consiste nesses resíduos apenas. Isto é, a primeira região, conforme discutido acima, define um espaço molecular incluindo um ou mais dos resíduos de SEQ ID NO: 1 que estão expostos para ligação a um sítio de ligação a antígeno de um anticorpo como uma consequência de *cis* isomerização de Pro210 de um monômero tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 1. Nesse contexto, Arg 125, Lys 193, Phe 275 e Arg 294 são fornecidos apenas adicionalmente, mas não alternativamente, por exemplo, a um ou mais dos resíduos Gly 200, His 201, Asn 202, Tyr 203, Thr 204, Thr 205, Arg 206, Asn 207, Ile 208, Leu 209.

[00071] Tipicamente, a segunda região é uma que define um espaço molecular incluindo um ou mais dos resíduos de SEQ ID NO: 1 que estão expostos para ligação a um sítio de ligação a antígeno de um anticorpo como uma consequentemente de *cis* isomerização de Pro210 de um monômero tendo uma sequência mostrada em SEQ ID NO: 1. Esses resíduos incluem Lys 297, Tyr 298, Tyr 299, Lys 300, Glu 301, Asn 302, Asn 303, Val 304, Glu 305 e Lys 306. Em uma modalidade, a segunda região inclui pelo menos um desses resíduos. Tipicamente, a segunda região inclui pelo menos 4 desses resíduos, embora possa ter menos, por exemplo, 2 ou 3, dependendo de quantos resíduos são apresentados na primeira região. Em uma

modalidade, a segunda região inclui pelo menos 1 par de resíduos mostrado na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2

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

[00072] Em determinadas modalidades, a segunda região inclui 2 ou mais pares de resíduos mostrados na Tabela 2.

[00073] A segunda região pode, adicionalmente, conter um ou mais resíduos periféricos que estão intimamente envolvidos em formação do sítio de ligação a ATP. Esses são Arg 307 e Lys 311. Assim, em determinadas modalidades, a segunda região ainda inclui Arg 307 e/ou Lys 311. Será entendido que a segunda região não consiste nesses resíduos apenas. Isto é, a segunda região, conforme discutido acima, define um espaço molecular incluindo um ou mais dos resíduos de SEQ ID NO: 1 que estão expostos para ligação a um sítio de ligação a antígeno de um anticorpo como uma consequência de *cis* isomerização de Pro210 de um monômero tendo uma sequência

mostrada em SEQ ID NO: 1. Nesse contexto, Arg 307 e Lys 311 são fornecidos apenas adicionalmente, mas não alternativamente, por exemplo, a um ou mais dos resíduos Lys 297, Tyr 298, Tyr 299, Lys 300, Glu 301, Asn 302, Asn 303, Val 304, Glu 305 e Lys 306.

[00074] Em determinadas modalidades, o epítipo é ou inclui um epítipo linear. Exemplos incluem onde a primeira região inclui uma das seguintes sequências de SEQ ID NO: 1 na Tabela 3:

Tabela 3

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

[00075] Nessas modalidades, a segunda região do epítipo pode incluir uma das seguintes sequências de SEQ ID NO: 1 na Tabela 4:

Tabela 4

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

[00076] Em determinadas modalidades, a primeira região contém mais resíduos do que a segunda região. Em outras modalidades, a segunda região contém mais resíduos do que a primeira região.

[00077] A primeira região e a segunda região podem, cada um, conter de cerca de 4 a cerca de 10 resíduos, por exemplo, 5, 6, 7, 8 ou

9 resíduos. Onde existem mais resíduos na segunda região, pode haver menos resíduos na primeira região, isto é, menos de 4, por exemplo, 2 ou 3. O mesmo se aplica vice-versa.

[00078] Conforme descrito aqui, as primeira e segunda regiões estão dispostas adjacentes uma à outra no receptor, desse modo, permitindo ligação de um sítio de ligação a antígeno de um anticorpo anti-P2X₇ às primeira e segunda regiões que formam o epítopo. Em maiores detalhes, os inventores descobriram que, embora localizadas em monômeros distintos, as primeira e segunda regiões em combinação formam um epítopo que pode ser ligado por um único sítio de ligação a antígeno de um anticorpo. Em geral, as primeira e segunda regiões do epítopo são espaçadas em não mais do que 4 Angstroms. Se a distância é maior do que isso, a afinidade de ligação do anticorpo tende a diminuir, uma vez que é requerido que o sítio de ligação a antígeno atravesse uma maior distância através dos monômeros dentro do receptor, caso no qual menos resíduos são ligados. Em geral, as primeira e segunda regiões são espaçadas cerca de 10 Angstroms, embora distâncias maiores de menos de 40 Angstroms sejam possíveis, tais como 15, 20, 25, 30 ou 35 Angstroms.

[00079] O epítopo descrito aqui pode ser proporcionado em uma forma substancialmente purificada ou isolada, por exemplo, como um fragmento de um receptor P2X₇ que ocorre naturalmente ou como um receptor P2X₇ sintético.

[00080] Em outras modalidades, é proporcionado um receptor P2X₇ incluindo um epítopo conforme descrito acima. Tipicamente, pelo menos um dos monômeros do receptor tem uma sequência de aminoácido substancialmente conforme mostrado em SEQ ID NO: 1. O receptor pode ser uma variante que ocorre naturalmente de receptor P2X₇, por exemplo, em que os monômeros de P2X₇ são variantes com recombinação, variantes alélicas e isoformas incluindo formas

truncadas ou secretadas que ocorrem naturalmente dos monômeros que formam o receptor P2X₇ (por exemplo, uma forma consistindo na sequência de domínio extracelular ou forma truncada da mesma), formas variantes que ocorrem naturalmente (por exemplo, formas com recombinação alternativa) e variantes alélicas que ocorrem naturalmente. Em determinadas modalidades da invenção, os polipeptídeos monoméricos de P2X₇ de sequência nativa são polipeptídeos de sequência nativa maduros ou de comprimento total compreendendo a sequência de aminoácidos de comprimento total mostrada em SEQ ID NO: 1. Em determinadas modalidades, o receptor P2X₇ pode ter uma sequência de aminoácido que é modificada, por exemplo, vários dos aminoácidos na sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 podem ser substituídos, deletados ou um resíduo pode ser inserido.

[00081] Tipicamente, o receptor é um receptor P2X₇ não funcional incluindo um epítipo conforme descrito acima. A cis isomerização pode surgir a partir de qualquer evento molecular que leva à duplicação errônea do monômero incluindo, por exemplo, mutação da sequência monomérica primária ou processamento pós-traducional anormal. Em determinadas modalidades, nem todos os monômeros do receptor têm uma cis isomerização de um resíduo na posição 210 de um monômero, por exemplo, 1 ou 2 dos monômeros do receptor podem ter uma cis isomerização de um resíduo na posição 210 de SEQ ID NO: 1.

[00082] O receptor pode ser proporcionado em uma forma substancialmente purificada ou isolada, isto é, ele pode estar na forma de uma amostra homogênea de receptor, quer proporcionado como uma fase sólida ou de outro modo.

[00083] Conforme descrito em detalhes abaixo, os inventores geraram anticorpos tendo um sítio de ligação a antígeno para ligação a

um epítopo descrito acima. Assim, em determinadas modalidades, é proporcionado um anticorpo para ligação a um epítopo conforme descrito acima.

[00084] Tipicamente, pelo menos uma região de determinação de complementaridade (CDR) (ou região hipervariável) de um sítio de ligação a antígeno (ou domínio variável) se liga a uma primeira região do epítopo e pelo menos uma outra CDR desse sítio de ligação a antígeno se liga à segunda região do epítopo. Em algumas modalidades, 2 das CDRs se ligam à primeira região e a outra CDR se liga à segunda região. Em outras modalidades, 2 das CDRs se ligam à segunda região e a outra CDR se liga à primeira região. Em algumas modalidades, uma CDR se liga à primeira região, outra CDR se liga à segunda região e a CDR restante está não ligada à primeira ou segunda regiões do epítopo.

[00085] Em determinadas modalidades, é proporcionado um anticorpo receptor anti-P2X7 não funcional, em que o sítio de ligação a antígeno do anticorpo se liga a pelo menos um par de resíduos da Tabela 1 acima e a pelo menos um par de resíduos da Tabela 2 acima.

[00086] Em outras modalidades, é proporcionado um anticorpo receptor anti-P2X7 não funcional, em que o sítio de ligação a antígeno do anticorpo se liga a pelo menos uma sequência da Tabela 3 acima e a pelo menos uma sequência da Tabela 4 acima.

[00087] Em outras modalidades, é proporcionado um complexo imune na forma de um epítopo descrito acima ligado a um anticorpo. Tipicamente, o epítopo é proporcionado sobre um receptor P2X7. Todos os epítopos do receptor podem ser ligados pelo anticorpo ou apenas alguns, por exemplo, menos do que três epítopos do receptor, são ligados pelo anticorpo. O complexo pode conter menos ou mais moléculas de anticorpo do que receptores.

[00088] Conforme descrito aqui, usando um modelo tridimensional de um receptor P2X7, os inventores determinaram uma faixa de peptídeos que podem ser usados para produzir um anticorpo para ligação ao epítopo da invenção. Assim, em uma determinada modalidade, é proporcionado um peptídeo incluindo uma região N-terminal e uma região C-terminal, as regiões N- e C-terminais sendo, cada uma, definidas por resíduos N- e C-terminais, em que:

- a região N-terminal inclui uma sequência de uma das seguintes:

- HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 2);
- GHNYTTRNIL (SEQ ID NO: 3);
- DFPGHNYTTRNIL (SEQ ID NO: 4);
- um fragmento de SEQ ID NO: 2 a 4 de pelo menos 4

resíduos;

- a sequência de qualquer uma de SEQ ID NOs: 2-4 em que resíduos D podem ser conservativamente substituídos por resíduos E, N ou Q; resíduos F podem ser conservativamente substituídos por resíduos A, V, L ou I; resíduos H podem ser conservativamente substituídos por um resíduo K ou R; resíduos N podem ser conservativamente substituídos por um resíduo D, E ou Q; resíduos Y podem ser conservativamente substituídos por um resíduo F ou W; resíduos T podem ser conservativamente substituídos por um resíduo C, S ou M; resíduos R podem ser conservativamente substituídos por um resíduo H ou K; resíduos I podem ser conservativamente substituídos por um resíduo G, A, V ou L; e resíduos L podem ser conservativamente substituídos por um resíduo G, A, V ou I;

•MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIFSY
VCFALVSDKLYQRKEPVISSVHTKVKGIAEVKEEIVENGVKKLVSFV
DTADYTFPLQGNSFFVMTNFLKTEGQEQLCPEYPTRRTLCSSTRG

CKKGWMDPQSKGIQTGRCWHEGNQKTCEVSAWCPIEAVEEAPRPA
LLNSAENFTVLIKNNIDFPG HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 5); ou

- uma sequência dentro da sequência de SEQ ID NO: 5 incluindo HNYTTRNIL no C-término,

- a região C-terminal inclui um resíduo C-terminal que é prolina, alanina ou glicina

em que o resíduo C-terminal da região N-terminal é covalentemente ligado a um resíduo N-terminal da região C-terminal.

[00089] A região C-terminal pode consistir de um único resíduo de aminoácido na forma de prolina em cis conformação. Alternativamente, ela pode incluir outros resíduos localizados N-terminalmente à prolina.

[00090] Tipicamente, o resíduo C-terminal da região C-terminal é conectado a um outro peptídeo através de um ligante tendo um comprimento de cerca de 10 a 40 Angstroms. Em uma modalidade, o outro peptídeo consiste em uma sequência de SEQ ID NO: 6 ou um fragmento da mesma de 4 resíduos ou mais. Em uma modalidade, a região C-terminal inclui um resíduo C-terminal que é prolina na conformação cis.

[00091] Em uma modalidade, o outro peptídeo é derivado da sequência do receptor P2X7 e tem não mais do que 594 resíduos de um receptor P2X7 de SEQ ID NO: 1. Em particular, o outro peptídeo pode consistir na sequência de SEQ ID NO: 6 ou uma sequência dentro da sequência de SEQ ID NO: 6. Exemplos desses peptídeos dentro de SEQ ID NO: 6 incluem aqueles tendo uma sequência descrita na Tabela 5 (numeração de acordo com a figura 1):

Tabela 5

K281 a K297	Y298 a G314
T282 a Y298	Y299 a I315
T283 a Y299	K300 a R316
N284 a K300	E301 a F317

V285 a E301	N302 a D318
S286 a N302	N303 a I319
L287 a N303	V304 a L320
Y288 a V304	E305 a V321
P289 a E305	K306 a F322
G290 a K306	R307 a G323
Y291 a R307	T308 a T324
N292 a T308	L309 a G325
F293 a L309	310 a G326
R294 a I310	K311 a K327
Y295 a K311	V312 a F328
A296 to V312	F313 a D329
K297 a F313	

[00092] O peptídeo mostrado na Tabela 5 pode ter um comprimento de 6 a 17 resíduos. Em uma modalidade, o fragmento peptídico é K297 a F313 consistindo na sequência de KYKNNVEKRTLKVF (SEQ ID NO: 7).

[00093] A região C-terminal pode ser ligada ou conectada ao outro peptídeo através de qualquer reação de conjugação adequada que pode ser usada com qualquer ligante peptídico. O ligante pode ser de um comprimento particular para auxiliar na imunogenicidade e minimizar interferência espacial. Por exemplo, o ligante pode ter um comprimento de entre 10 Å e 40 Å. De preferência, o ligante tem um comprimento de 10 ou 20 Å.

[00094] O ligante pode ser um ligante de aminoácido de um ou mais resíduos de aminoácido. O termo "ligante de aminoácido", contudo, não se destina a implicar que tal ligante consiste exclusivamente em resíduos de aminoácido. O ligante de aminoácido pode ser qualquer sequência de aminoácido que não interfere substancialmente com o peptídeo da invenção.

[00095] Os resíduos de aminoácido do ligante de aminoácido são, de preferência, aminoácidos que ocorrem naturalmente ou aminoácidos não naturais e misturas all-D ou all-L dos mesmos. Por exemplo, os aminoácidos podem ser selecionados de glicina, alanina, leucina, serina, valina e treonina. De preferência, o ligante consiste em um ou mais aminoácidos selecionados de glicina e alanina.

[00096] Em determinadas modalidades, é proporcionado um peptídeo definido pela fórmula: (A)(X_n)(B), em que:

- (A) é uma sequência de aminoácidos de GHNYTTRNILP (SEQ ID NO: 8) ou um fragmento da mesma de pelo menos 4 aminoácidos;

- (X_n) é um ligante de 10 a 40 angstroms de comprimento, o referido ligante consistindo em um ou mais resíduos de aminoácido;

- (B) é uma sequência de aminoácidos de AKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 9) ou um fragmento da mesma de pelo menos 4 aminoácidos.

[00097] Em outras modalidades, é proporcionado um peptídeo tendo a seguinte sequência: GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 10).

[00098] Os peptídeos da invenção podem ser feitos através de qualquer número de técnicas conhecidas na técnica, incluindo síntese em fase sólida e a tecnologia de DNA recombinante.

[00099] Como é conhecido na técnica, um veículo é uma substância que é conjugada a um peptídeo que forma um epítipo para intensificar a imunogenicidade. Alguns veículos fazem isso através de ligação a múltiplos veículos, de modo a proporcionar um antígeno de peso molecular aumentado ao hospedeiro no qual a resposta imune tem de ser desenvolvida.

[000100] Veículos preferidos incluem toxinas bacterianas ou toxoides. Outros veículos adequados incluem a proteína da membrana

externa de N. meningitides, albumina, tal como albumina de soro bovino, peptídeos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas de Pertussis, proteína D de H. influenza e toxina A, B ou C de C. difficile.

[000101] Quando o veículo é uma toxina bacteriana ou toxoide, toxoides de difteria ou tétano são preferidos.

[000102] De preferência, o veículo contém grupos funcionais que podem reagir com o peptídeo da invenção ou podem ser modificados para serem capazes de reação com o peptídeo.

[000103] Conforme mencionado acima, os peptídeos da invenção são úteis para a geração de anticorpos monoclonais que se ligam a receptores P2X7 não funcionais sobre células vivas, mas não sobre receptores P2X7 funcionais sobre células vivas. Uma outra vantagem é que esses peptídeos também podem ser usados para gerar anticorpos monoclonais que se ligam a receptores P2X7 funcionais sobre células vivas, mas não a receptores P2X7 não funcionais sobre células vivas.

[000104] Os últimos anticorpos são particularmente importantes porque eles podem ser usados para selecionar indivíduos para os quais terapia com anticorpo pode ser aplicada sistemicamente. Em maiores detalhes, a maioria da população contém alelos que controlam a expressão de receptores P2X7 funcionais sobre tecidos, tais como tecidos linfoides. Expressão de receptor nesses compartimentos teciduais é entendida como sendo uma fisiologia totalmente normal. Em contraste, uma minoria da população tem um ou mais alelos que controlam a expressão de receptores P2X7 não funcionais nesses compartimentos teciduais. Se essa última população tem de ser proporcionada com anticorpo que se liga a receptores não funcionais expressos sobre células vivas para o tratamento de câncer, há um risco de que essa terapia possa afetar o sistema imune porque

se eliminaria as células linfoides que expressam receptores não funcionais.

[000105] Consequentemente, os anticorpos da invenção descritos aqui que se ligam a receptores funcionais, mas não a receptores não funcionais sobre células vivas são particularmente úteis para ajudar indivíduos selecionados para os quais terapia com anticorpo não seria fornecida ou mesmo seria fornecida em uma forma apropriadamente modificada. Tal ensaio poderia ser usado em conjunto com uma triagem idêntica usando o anticorpo a receptores não funcionais. Dessa forma, pacientes com receptores funcionais sobre tecido linfóide e pacientes com receptores não funcionais sobre tecido linfóide poderiam ser separados de pacientes com baixos níveis de expressão de receptor, quer funcional ou não funcional. Uso de cada anticorpo em conjunto permite discriminar pacientes que requererão pelo menos monitoramento mais próximo como um resultado da depleção em suas células imunes que acompanham o tratamento de sua condição com o anticorpo terapêutico ao receptor não funcional.

[000106] Em determinadas modalidades, é proporcionado um anticorpo para ligação a um receptor P2X₇ funcional, mas não um receptor P2X₇ não funcional, expresso sobre uma célula viva. Em outras modalidades, é proporcionado um anticorpo para ligação a um receptor P2X₇ não funcional, mas não um receptor P2X₇ funcional expresso sobre uma célula viva. Tipicamente, esses anticorpos são aqueles estimulados contra um peptídeo da invenção.

[000107] Em determinadas modalidades, os anticorpos da invenção podem ter afinidades oscilando de 10⁻⁷ M a 10⁻¹³ M como moléculas de anticorpo inteiras, mas com uma tendência a requerer 10⁻⁷ M se usando a via de hibridoma, de preferência como uma IgM, de forma a evitar inibição de crescimento de hibridoma pelos anticorpos que estão sendo produzidos. Essas afinidades podem ser aumentadas ou

diminuídas usando técnicas padrões conhecidas por aqueles versados na técnica, incluindo maturação de anticorpo por afinidade.

[000108] O anticorpo pode ser obtido a partir de antissoro monoclonal ou policlonal. O anticorpo pode ser produzido por bibliotecas de exposição em fagos ou hibridoma. Antissoro monoclonal e policlonal podem ser obtidos por meio de imunização de um hospedeiro com um peptídeo da invenção junto com um adjuvante de acordo com técnicas padrões. O soro resultante pode sofrer triagem usando qualquer uma de uma série de técnicas sorológicas nas quais o soro é exposto à expressão de receptor sobre células vivas.

[000109] Usando a invenção, se torna possível proporcionar anticorpos usando expressão recombinante. Por exemplo, as CDRs dos anticorpos gerados através de imunização com o peptídeo da invenção são sequenciadas, sequências de nucleotídeo de codificação são determinadas e, então, subclonadas em vetores de expressão para síntese recombinante de anticorpos. Isso, então, proporciona oportunidades para desenvolver anticorpos quiméricos, isto é, aqueles contendo domínios humanos variáveis e domínios constantes não humanos, anticorpos humanizados, isto é, aqueles formados por meio de enxertagem de CDRs não humanas sobre uma estrutura de anticorpo humano e anticorpos totalmente humanos.

[000110] Os anticorpos da invenção podem ser modificados com relação à função efetuada, de modo a intensificar, por exemplo, a eficácia do anticorpo no tratamento de câncer. Por exemplo, as regiões constantes da cadeia pesada de anticorpo podem ser alteradas para os isotipos IgG2a de camundongo, IgG2b de camundongo ou IgG1 humano. O anticorpo assim gerado pode ter citotoxicidade celular (ADCC) ou citotoxicidade complemento-mediada (CMC) aprimorada. Em outra modificação, fucose pode ser deletada da região Fc ou resíduos de ácido siálico podem ser introduzidos na

região Fc. O anticorpo assim gerado pode também ter atividade de ADCC intensificada ou CMC intensificada. Em ainda outra modificação, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, desse modo, permitindo formação de ligação de dissulfeto intercadeia nessa região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização aprimorada e/ou morte celular complemento-mediada e ADCC aumentadas. Anticorpos homodiméricos com atividade antitumor intensificada também podem ser preparados usando agentes de ligação cruzada heterobifuncionais. Alternativamente, um anticorpo pode ser manipulado, o qual tem regiões Fc modificadas ou mistas e pode, dessa forma, ter capacidades de lise de complemento e ADCC intensificadas.

[000111] O anticorpo pode ser um anticorpo inteiro de qualquer isotipo. Onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo, o fragmento de anticorpo é selecionado do grupo consistindo em um dAb, Fab, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv e CDR.

[000112] O anticorpo ou fragmento pode ser proporcionado sobre uma fase sólida, tal como um glóbulo, superfície ou vaso de cultura tecidual.

[000113] O anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser proporcionado com um rótulo para detecção de ligação do anticorpo ou fragmento do mesmo a um receptor expresso sobre uma célula viva.

[000114] O anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser proporcionado com um rótulo para detecção de ligação do anticorpo ou fragmento do mesmo ao receptor expresso sobre uma célula viva.

[000115] Os anticorpos e fragmentos podem ser rotulados para uso em formação de imagem médica. Tais métodos envolvem a fixação química de um agente de rotulação ou formação de imagem, tal como um radioisótopo, o qual inclui ⁶⁷ Cu, ⁹⁰ Y, ¹²⁵ I, ¹³¹ I, ¹⁸⁶ Re,

188Re, 211 At, 212 Bi, administração do anticorpo ou fragmento rotulado a um indivíduo em um veículo aceitável e formação de imagem do anticorpo ou fragmento rotulado in vivo no sítio alvo. Anticorpos ou fragmentos radorrotulados dos mesmos podem ser particularmente úteis em formação de imagem in vivo de cânceres descritos aqui.

[000116] Os anticorpos podem ser purificados através de métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Métodos de purificação incluem, dentre outros, precipitação seletiva, cromatografia de líquido, HPLC, eletroforese, cromatofocalização e diversas técnicas de afinidade.

[000117] Em algumas modalidades, os anticorpos descritos aqui podem também incluir formar multiméricas de anticorpos. Por exemplo, anticorpos da invenção podem tomar a forma de dímeros, trímeros de anticorpo ou multímeros de ordem superior de moléculas de imunoglobulina monoméricas.

[000118] Ligação cruzada de anticorpos pode ser feita através de diversos métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a ligação cruzada de anticorpos pode ser realizada através de agregação natural de anticorpos, através de técnicas de ligação química ou recombinante ou outros métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, preparados de anticorpo purificados podem formar espontaneamente agregados de proteína contendo homodímeros de anticorpo e outros multímeros de anticorpo de ordem superior. Em uma modalidade específica, ligação cruzada de anticorpos usando um anticorpo secundário para ligação aos anticorpos de interesse pode ser usada para formar um homodímero. O anticorpo com agente de ligação cruzada pode ser derivado de um animal diferente comparado com o anticorpo de interesse. Por exemplo, um anticorpo de cabra anticamundongo (Fab específico) pode ser adicionado a um anticorpo

monoclonal de camundongo para formar um homodímero. Esse anticorpo com agente de ligação cruzada bivalente reconhece a região Fab ou Fc dos dois anticorpos de interesse, formando um homodímero.

[000119] Alternativamente, homodímeros de anticorpo podem ser formados através de técnicas de ligação química conhecidas na técnica. Agentes de ligação cruzada químicos podem ser homo ou heterobifuncionais e se ligarão covalentemente a dois anticorpos, formando um homodímero. Em algumas modalidades, é desejável que o agente de ligação cruzada químico não interaja com a região de ligação a antígeno do anticorpo, uma vez que isso pode afetar a função do anticorpo. Conforme será apreciado por aqueles versados na técnica, anticorpos podem sofrer ligação cruzada na região Fab.

[000120] Em ainda outro aspecto da invenção, é proporcionado um complexo imune formado a partir da ligação de um anticorpo ou fragmento do mesmo, conforme descrito acima, a um receptor P2X7 expresso sobre uma célula viva. O receptor pode ser funcional ou não funcional.

[000121] Em outra modalidade, é proporcionado um complexo imune formado a partir da ligação de um anticorpo ou fragmento do mesmo a um peptídeo descrito acima.

[000122] Os complexos imunes da invenção, incluindo aqueles incluindo um epítipo ou peptídeo da invenção, são particularmente importantes, uma vez que detecção in vitro ou in vivo é indicativa da presença de ou predisposição a uma doença ou condição, incluindo pré-neoplasia e neoplasia.

[000123] Ainda, conforme descrito acima, detecção de um complexo imune formado a partir de ligação de um anticorpo ou fragmento do mesmo, conforme descrito acima, a um receptor P2X7 funcional sobre células vivas é um indicador importante da adequabilidade de um

indivíduo para tratamento de uma doença ou condição caracterizada por expressão de receptor P2X7 não funcional. Um pequeno percentual da população normalmente expressa receptores P2X7 no estado não funcional sobre suas células hematopoiéticas, tais como timócitos, células dendríticas, linfócitos, macrófagos e monócitos. Portanto, é importante ser capaz de identificar seu fenótipo homozigótico para receptores não funcionais em indivíduos que foram identificados como estando em risco de ou tendo câncer, por exemplo, em virtude da presença de P2X7 não funcional sobre outras células não hematopoiéticas.

[000124] Também, acredita-se que indivíduos tendo um fenótipo de receptor P2X7 não funcionais heterozigóticos se beneficiarão de identificação dos complexos imunes da invenção. Tratamentos que objetivam receptores P2X7 não funcionais podem ser configurados e titulados para levar seu fenótipo em consideração.

[000125] Esses métodos de detecção são descritos em maiores detalhes abaixo.

[000126] O anticorpo ou fragmento de anticorpo incluído no complexo imune pode ser preso a uma fase sólida, tal como um glóbulo ou uma lâmina, de modo que o complexo imune é preso a uma fase sólida quando formado. Alternativamente, o receptor P2X7, monômero ou fragmento do mesmo incluído no complexo imune pode ser preso a uma fase sólida.

[000127] O anticorpo pode ser rotulado para detecção de formação do complexo imune.

[000128] O complexo imune pode ainda incluir um anticorpo ou fragmento do mesmo, tal como um anticorpo de captura do complexo imune. O outro anticorpo ou fragmento do mesmo pode se ligar ao anticorpo receptor anti-P2X7. Também, o outro anticorpo ou fragmento do mesmo pode se ligar ao receptor ou fragmento do mesmo.

[000129] O outro anticorpo ou fragmento do mesmo pode se ligar a uma fase sólida, tal como uma fase descrita acima.

[000130] O outro anticorpo pode ser rotulado para detecção de formação do complexo imune. Exemplos de rótulos incluem fluoróforos, corantes, isótopos, etc.

[000131] Em outras modalidades, é proporcionada uma composição incluindo um peptídeo ou epítipo da invenção junto com um adjuvante ou outra molécula para potencialização de uma resposta imune ao peptídeo. O adjuvante pode ser seletivo para potencialização de uma resposta humoral ou celular ou ambos. Em determinadas modalidades, essas composições são úteis para vacinação contra doença relacionada ao receptor P2X₇ não funcional.

[000132] Em outras modalidades, é proporcionada uma composição incluindo um anticorpo da invenção junto com um veículo, excipiente ou diluente farmacêutico. Essas composições são úteis para administração sistêmica de anticorpos para o tratamento de câncer ou outra doença relacionada ao receptor P2X₇ não funcional. Em modalidades preferidas, o anticorpo é um anticorpo com um único domínio.

[000133] Em outras modalidades, é proporcionado um método de terapia, diagnóstico ou monitoramento de uma doença ou condição caracterizada por expressão de receptores P2X₇ não funcionais sobre células epiteliais, mesenquimais, germinais, neurais, pleurais ou sanguíneas, o método compreendendo administração de um anticorpo a um indivíduo requerendo a referida terapia, diagnóstico ou monitoramento, o referido anticorpo sendo um que se liga a receptores P2X₇ não funcionais sobre células vivas, mas não a receptores P2X₇ funcionais sobre células vivas. Em uma modalidade, o método inclui uma primeira etapa de uso de um anticorpo que se liga a receptores P2X₇ funcionais sobre células vivas, mas não a receptores P2X₇ não

funcionais.

[000134] Em determinadas modalidades, é proporcionado um uso de um anticorpo conforme descrito aqui para tratamento de um indivíduo tendo um câncer. Em outras modalidades, é proporcionado um uso de um anticorpo conforme descrito aqui na fabricação de um medicamento para tratamento de um indivíduo tendo um câncer. Em outras modalidades, é proporcionado um método para tratamento de um indivíduo tendo um câncer incluindo a etapa de contato de um tecido de um indivíduo, incluindo câncer, com um anticorpo para ligação a um epítipo ou peptídeo da invenção. O método pode ser operado in vitro ou in vivo.

[000135] Tipicamente, o câncer é de origem epitelial (mama, próstata, intestino, pulmão, pele, cérvix, uterino, vaginal), mesenquimal, germinal, neural, pleural ou sanguíneo.

[000136] O anticorpo pode ser um sítio de ligação a antígeno, domínio variável de imunoglobulina, anticorpo, Fab, dab, scFv, diacorpo, triacorpo, proteína de fusão, conjugado ou composição farmacêutica, conforme descrito acima.

[000137] A quantidade de dosagem, frequência de dosagem, vias de administração, etc. são descritas em detalhes abaixo.

[000138] Em outra modalidade, é proporcionada uma composição farmacêutica incluindo um sítio de ligação a antígeno para ligação de um epítipo ou peptídeo da invenção ou domínio variável de imunoglobulina, anticorpo, Fab, dab, scFv, diacorpo, triacorpo, proteína de fusão ou conjugado incluindo o sítio de ligação a antígeno e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[000139] Métodos de preparo e administração de anticorpos a um indivíduo que precisa dos mesmos são bem-conhecidos ou são prontamente determinados por aqueles versados na técnica. A via de administração pode ser, por exemplo, oral, parenteral (por exemplo,

intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, retal ou vaginal), através de inalação ou tópica. Uma forma de administração seria uma solução para injeção, em particular para injeção ou infusão intravenosa ou intra-arterial, compreendendo um tampão (por exemplo, tampão de acetato, fosfato ou citrato), um tensoativo (por exemplo, polissorbato), opcionalmente um agente estabilizante (por exemplo, albumina humana). Em outros métodos, os anticorpos podem ser distribuídos diretamente ao local da doença, desse modo, aumentando a exposição da célula ou tecido doente ao anticorpo.

[000140] Preparados para administração parenteral incluem soluções, suspensões e emulsões aquosas (veículos aquosos incluem água, soluções, emulsões ou suspensões alcoólicas/aquosas, incluindo solução salina e meios tamponados) ou não aquosas (solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais, tal como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila) estéreis. Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem tampão de fosfato a 0,01-0,1 M e, de preferência, 0,05M ou solução salina a 0,8%. Outros veículos parenterais comuns incluem soluções de fosfato de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactada ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem repositores de fluido e nutriente, repositores de eletrólito, tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer e semelhantes. Conservantes e outros aditivos podem também estar presentes tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelação e gases inertes e similares.

[000141] Mais particularmente, composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas (onde solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para o preparo extemporâneo de soluções ou dispersões injetáveis estéreis; em tais

casos, a composição deve ser estéril e deverá ser fluida até o ponto em que haja facilidade de fluxo em uma seringa. Ela deverá ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e, de preferência, ser conservada contra a ação contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etano, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e similares) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, mediante o uso de um revestimento, tal como lecitina, mantendo o tamanho de partícula requerido no caso de dispersões e através do uso de tensoativos. Formulações adequadas para uso nos métodos terapêuticos divulgados aqui são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16^a ed. (1980).

[000142] Prevenção da ação de micro-organismos pode ser obtida através de diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e similares. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio, na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser mantida incluindo, na composição, um agente o qual retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[000143] Em qualquer caso, soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas através de incorporação de um composto ativo (por exemplo, sítio de ligação a antígeno) na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados aqui, conforme requerido, seguido por esterilização filtrada. Em geral, dispersões são preparadas mediante incorporação do composto ativo em um veículo estéril, o qual contém um meio de

dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para o preparo de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparo preferidos são secagem a vácuo e liofilização, os quais proporcionam um pó de um ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução previamente filtrada estéril do mesmo. Os preparados para injeções são processados, enchidos em recipientes tais como ampolas, sacos, garrafas, seringas ou frascos e vedados sob condições assépticas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Ainda, os preparados podem ser embalados e vendidos na forma de um kit. Tais artigos de fabricação terão, de preferência, rótulos ou bulas indicando que as composições associadas são úteis para tratamento de um indivíduo sofrendo de ou predisposto a distúrbios.

[000144] Doses eficazes das composições da presente invenção para o tratamento de distúrbios conforme descrito aqui podem variar, dependendo de muitos fatores diferentes, incluindo meios de administração, local alvo, estado fisiológico do paciente, se o paciente é um ser humano ou animal, outras medicações administradas e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Usualmente, o paciente é um ser humano, mas mamíferos não humanos, incluindo mamíferos transgênicos, também podem ser tratados. Dosagens de tratamento podem ser tituladas usando métodos de rotina conhecidos por aqueles versados na técnica para otimizar a segurança e eficácia.

[000145] Para o tratamento de determinados distúrbios com um anticorpo, a dosagem pode oscilar, por exemplo, de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e, mais preferivelmente, 0,01 a 5 mg/kg (por exemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) do peso do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 1 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro da faixa de 1-10 mg/kg, de preferência pelo menos 1 mg/kg. Doses intermediárias

nas faixas acima também se destinam a estar dentro do escopo da invenção. Tais doses podem ser administradas aos indivíduos diariamente, em dias alternados, semanalmente ou de acordo com qualquer outro esquema determinado por meio de análise empírica. Um tratamento exemplificativo requer administração em múltiplas dosagens durante um período prolongado, por exemplo, de pelo menos seis meses. Regimes de tratamento exemplificativos adicionais requerem a administração uma vez a cada duas semanas ou uma vez por mês ou uma vez a cada 3 a 6 meses. Esquemas de dosagem exemplificativos incluem 1-10 mg/kg ou 15 mg/kg em dias consecutivos, 30 mg/kg em dias alternados ou 60 mg/kg semanalmente. Em alguns métodos, dois ou mais sítios de ligação a antígeno com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, caso no qual a dosagem de cada um dos sítios de ligação a antígeno administrados cai dentro das faixas indicadas.

[000146] O anticorpo para ligação ao epítipo ou peptídeo da invenção pode ser administrado em múltiplas ocasiões. Intervalos entre dosagens únicas podem ser semanalmente, mensalmente ou anualmente. Os intervalos também podem ser irregulares, conforme indicado por meio de medição dos níveis sanguíneos de polipeptídeo-alvo ou molécula-alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para obter uma concentração plasmática de polipeptídeo de 1-1000 µg/ml e, em alguns métodos, 25-300 µg/ml. Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação com liberação sustentada, caso no qual administração menos frequente é requerida. A dosagem e frequência variam, dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. A meia-vida de um anticorpo também pode ser prolongada via fusão a um polipeptídeo ou porção estável, por exemplo, albumina ou PEG. Em geral, anticorpos humanizados mostram a meia-vida mais longa, seguido por anticorpos quiméricos e

anticorpos não humanos. Em uma modalidade, o anticorpo pode ser administrado na forma não conjugada. Em outra modalidade, o anticorpo pode ser administrado múltiplas vezes na forma conjugada.

[000147] A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, composições compreendendo anticorpos ou um coquetel dos mesmos são administradas a um paciente que não sofre do estado doentio ou em um estado pré-doença para intensificar a resistência do paciente. Tal quantidade é definida como sendo uma "dose profilaticamente eficaz". Nesse uso, as quantidades precisas novamente dependem do estado de saúde e imunidade geral do paciente, mas em geral, oscilam de 0,1 a 25 mg por dose, especialmente 0,5 a 2,5 mg por dose. Uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente não frequentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento durante o resto de suas vidas.

[000148] Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta (por exemplo, de cerca de 1 a 400 mg/kg de molécula de ligação, por exemplo, anticorpo por dose, com dosagens de 5 a 25 mg sendo mais comumente usadas para radioimunoconjugados e doses maiores para moléculas conjugadas de citotoxina-fármaco) em intervalos relativamente curtos sendo, algumas vezes, requeridas até que progressão da doença seja reduzida ou terminada e, de preferência, até que o paciente mostre alívio parcial ou completo de sintomas da doença.

[000149] Agentes terapêuticos podem ser administrados através de meios parenterais, tópicos, intravenosos, orais, subcutâneos, intra-arteriais, intracranianos, intraperitoneais, intranasais ou intramusculares para tratamento profilático e/ou terapêutico. Em alguns métodos, os agentes são injetados diretamente em um tecido

particular onde células de receptor P2X7 não funcional se acumularam, por exemplo, injeção intracraniana. Injeção intramuscular ou infusão intravenosa são preferidas para administração de anticorpo.

[000150] Um anticorpo pode, opcionalmente, ser administrado em combinação com outros agentes que são eficazes no tratamento do distúrbio ou condição que requer tratamento (por exemplo, profilático ou terapêutico).

[000151] Em outra modalidade, é proporcionado um kit ou artigo de fabricação incluindo um sítio de ligação a antígeno, domínio variável de imunoglobulina, anticorpo, Fab, dab, scFv, diacorpo, triacorpo, proteína de fusão, conjugado ou composição farmacêutica, conforme descrito acima.

[000152] Em outras modalidades, é proporcionado um kit para uso em uma aplicação terapêutica mencionada acima, o kit incluindo:

- um recipiente contendo uma composição terapêutica na forma de um ou mais sítios de ligação a antígeno, domínio variável de imunoglobulina, anticorpo, Fab, dab, scFv, diacorpo, triacorpo, proteína de fusão, conjugado ou composição farmacêutica;

- um rótulo ou bula com instruções para uso.

[000153] Em determinadas modalidades, o kit pode conter um ou mais de outros princípios ou ingredientes ativos para tratamento de um câncer ou para prevenção de uma complicação relacionada ao câncer descrita acima.

[000154] O kit ou "artigo de fabricação" pode compreender um recipiente e um rótulo ou bula sobre ou associada ao recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, embalagem blister, etc. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição terapêutica a qual é eficaz para o tratamento da condição e pode ter um orifício de acesso estéril (por

exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O rótulo ou bula indica que a composição terapêutica é usada para o tratamento da condição de escolha. Em uma modalidade, o rótulo ou bula inclui instruções para uso e indica que a composição terapêutica pode ser usada para tratar um câncer ou prevenir uma complicação proveniente de câncer.

[000155] O kit pode compreender (a) uma composição terapêutica; e (b) um segundo recipiente com um segundo princípio ou ingrediente ativo contido no mesmo. O kit, nessa modalidade da invenção, pode ainda compreender uma bula indicando que o outro princípio ativo pode ser usado para tratar um distúrbio ou prevenir uma complicação proveniente de câncer. Alternativa ou adicionalmente, o kit pode ainda compreender um segundo (ou terceiro) recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWHI), solução salina tamponada, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

[000156] Em determinadas modalidades, é proporcionado um uso de um anticorpo conforme descrito aqui para determinar se um indivíduo tem um câncer. Em outras modalidades, é proporcionado um uso de um anticorpo conforme descrito aqui na fabricação de meios para determinar se um indivíduo tem um câncer. Em outras modalidades, é proporcionado um método para determinar se um indivíduo tem câncer, incluindo a etapa de contato de um tecido do indivíduo para o qual o câncer tem de ser determinado com um anticorpo de acordo com a invenção em condições para formação de um complexo imune de acordo com a invenção e determinar se o complexo imune foi formado, pelo que a formação de um complexo imune determina se o

indivíduo tem um câncer. O método pode ser operado in vitro ou in vivo.

[000157] Em uma modalidade, o anticorpo está na forma de um sítio de ligação a antígeno, domínio variável de imunoglobulina, Fab, dab, scFv, diacorpo, triacorpo, proteína de fusão, conjugado ou composição diagnóstica conforme descrito acima e detecta a ligação do reagente com os tecidos ou células.

[000158] Para diagnóstico in situ, o sítio de ligação a antígeno ou qualquer parte ativa e funcional do mesmo pode ser administrada ao organismo a ser diagnosticado através de métodos conhecidos na técnica tais como, por exemplo, injeção intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intra-arterial, de modo que uma ligação específica entre um sítio de ligação a antígeno de acordo com a invenção com uma região epitópica sobre o receptor P2X₇ não funcional possa ocorrer. O complexo de anticorpo/antígeno pode, convenientemente, ser detectado através de um rótulo preso ao sítio de ligação a antígeno ou um fragmento funcional do mesmo ou qualquer outro método de detecção conhecido na técnica.

[000159] Os imunoenaios usados em aplicações diagnósticas de acordo com a invenção e conforme descrito aqui contam, tipicamente, com antígenos rotulados, anticorpos ou reagentes secundários para detecção. Essas proteínas ou reagentes podem ser rotulados com compostos geralmente conhecidos por aqueles versados na técnica, incluindo enzimas, radioisótopos e substâncias fluorescentes, luminescentes e cromogênicas incluindo, mas não limitado a, partículas coloridas, tais como glóbulos de ouro coloidal e látex. Desses, rotulação radioativa pode ser usada para quase todos os tipos de ensaios e com a maioria das variações. Rótulos enzima-conjugados são particularmente úteis quando a radioatividade deve ser evitada ou quando resultados rápidos são necessários. Fluorocromas, embora

requerendo equipamento oneroso para seu uso, proporcionam um método de detecção muito sensível. Anticorpos úteis nesses ensaios incluem anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais e anticorpos policlonais purificados por afinidade.

[000160] Alternativamente, o anticorpo pode ser rotulado indiretamente através de reação com substâncias rotuladas que têm uma afinidade por imunoglobulina, tais como proteína A ou G ou anticorpos secundários. O anticorpo pode ser conjugado com uma segunda substância e detectado com uma terceira substância tendo uma afinidade pela segunda substância conjugada ao sítio de ligação a antígeno. Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado à biotina e o conjugado de sítio de ligação a antígeno-biotina detectado usando avidina ou estreptavidina rotulada. Similarmente, o anticorpo pode ser conjugado a um hapteno e o conjugado de anticorpo-hapteno detectado usando anticorpo anti-hapteno rotulado.

[000161] Imunoensaios atuais utilizam um método com anticorpo duplo para detecção da presença de um analito, em que o anticorpo é rotulado indiretamente através de reatividade com um segundo anticorpo que tenha sido rotulado com um rótulo detectável. O segundo anticorpo é, de preferência, um que se liga a anticorpos do animal do qual o anticorpo é derivado. Em outras palavras, se o anticorpo é um anticorpo de camundongo, então, o segundo anticorpo rotulado é um anticorpo anticamundongo. Para que o anticorpo seja usado no ensaio descrito aqui, o rótulo é, de preferência, um glóbulo revestido de anticorpo, particularmente um glóbulo magnético. Para que o sítio de ligação a antígeno seja empregado no imunoensaio descrito aqui, o rótulo é, de preferência, uma molécula detectável, tal como uma substância radioativa, fluorescente ou eletroquimioluminescente.

[000162] Um sistema de anticorpo duplo alternativo, frequentemente

referido como sistemas de formato rápido porque eles são adaptados para determinações rápidas da presença de um analito, também pode ser empregado dentro do escopo da presente invenção. O sistema requer alta afinidade entre o sítio de ligação a antígeno e o analito. De acordo com uma modalidade da presente invenção, a presença do receptor P2X₇ não funcional é determinada usando um par de sítios de ligação a antígeno, cada um específico para a proteína do receptor P2X₇. Um dos referidos pares de sítios de ligação a antígeno é referido aqui como um "sítio de ligação a antígeno detector" e o outro do referido par de sítios de ligação a antígeno é referido aqui como um "sítio de ligação a antígeno de captura". O sítio de ligação a antígeno da presente invenção pode ser usado como um sítio de ligação a antígeno de captura ou como um sítio de ligação a antígeno detector. O sítio de ligação a antígeno da presente invenção pode também ser usado como sítio de ligação a antígeno de captura e detector, juntos em um único ensaio. Uma modalidade da presente invenção, assim, usa o método de sanduíche de sítio de ligação a antígeno duplo para detecção de receptor P2X₇ não funcional em uma amostra de fluido biológico. Nesse método, o analito (proteína de receptor P2X₇ não funcional) está em sanduíche entre o sítio de ligação a antígeno detector e o sítio de ligação a antígeno de captura, o sítio de ligação a antígeno de captura sendo irreversivelmente imobilizado sobre um suporte sólido. O sítio de ligação a antígeno detector conterá um rótulo detectável, de forma a identificar a presença do sanduíche de sítio de ligação a antígeno-analito e, assim, a presença do analito.

[000163] Substâncias de fase sólida exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a, lâminas de microtitulação, tubos de ensaio de poliestireno, glóbulos magnéticos, plásticos ou de vidro e lâminas as quais são bem-conhecidos na técnica de radioimunoensaio e imunoensaio enzimático. Métodos para acoplamento de sítios de

ligação a antígeno a fases sólidas são também bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Mais recentemente, uma série de materiais porosos, tais como náilon, nitrocelulose, acetato de celulose, fibras de vidro e outros polímeros porosos têm sido empregados como suportes sólidos.

[000164] Em outra modalidade, é proporcionada uma composição diagnóstica incluindo um sítio de ligação a antígeno, domínio variável de imunoglobulina, anticorpo, Fab, dab, scFv, diacorpo, triacorpo, proteína de fusão ou conjugado conforme descrito acima, um diluente e opcionalmente um rótulo.

[000165] É preferido que o anticorpo a ser empregado em uma composição diagnóstica seja detectavelmente rotulado. Está disponível uma variedade de técnicas para rotulação de biomoléculas, as quais são bem-conhecidas por aqueles versados na técnica e são consideradas como estando dentro do escopo da presente invenção. Existem muitos rótulos diferentes e métodos de rotulação conhecidos por aqueles versados na técnica. Exemplos dos tipos de rótulos os quais podem ser usados na presente invenção incluem enzimas, radioisótopos, metais coloidais, compostos fluorescentes, compostos quimioluminescentes e compostos bioluminescentes.

[000166] Rótulos comumente usados compreende, inter alia, fluorocromos (tais como fluoresceína, rodamina, Texas Red, etc.), enzimas (tais como peroxidase de rábano, β -galactosidase, fosfatase alcalina), isótopos radioativos (tais como ^{32}P ou ^{125}I), biotina, digoxigenina, metais coloidais, compostos quimio- ou bioluminescentes (tais como dioxetanos, luminol ou acridínios). Procedimentos de rotulação, tais como acoplamento de enzimas ou grupos biotinila, iodinações, fosforilações, biotinilações, etc. são bem-conhecidos na técnica.

[000167] Métodos de detecção compreendem, mas não estão

limitados a, autorradiografia, microscopia por fluorescência, reações enzimáticas diretas e indiretas, etc. Ensaios de detecção comumente usados compreendem métodos radioisotópicos ou não radioisotópicos. Esses compreendem, inter alia, Western blotting, ensaios de sobreposição, RIA (Radio Immuno Assay - Radioimunoensaio) e IRMA (Immune Radioimmunometric Assay - Ensaio Radioimunométrico Imune), EIA (Enzyme Immuno Assay - Imuno Ensaio Enzimático), ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), FIA (Fluorescent Immuno Assay - Ensaio Imuno Fluorescente) e CLIA (Chemiluminescent Immune Assay - Ensaio Imune Quimioluminescente).

[000168] Em outra modalidade, é proporcionado um kit ou artigo de fabricação incluindo um sítio de ligação a antígeno, domínio variável de imunoglobulina, anticorpo, Fab, dab, scFv, diacorpo, triacorpo, proteína de fusão, conjugado ou uma composição diagnóstica, conforme descrito acima.

[000169] Em outras modalidades, é proporcionado um kit para uso em uma aplicação diagnóstica mencionada acima, o kit incluindo:

- um anticorpo de acordo com a invenção e opcionalmente:
- um peptídeo de acordo com a invenção;
- um rótulo ou bula com instruções para uso.

[000170] O kit ou "artigo de fabricação" pode compreender um recipiente e um rótulo ou bula sobre ou associada ao recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, embalagem blister, etc. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição diagnóstica a qual é eficaz para detecção de câncer e pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode estar em um saco de solução intravenosa ou um frasco tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção

hipodérmica). O rótulo ou bula indica que a composição diagnóstica é usada para a detecção da condição de escolha. Em uma modalidade, o rótulo ou bula inclui instruções para uso e indica que a composição diagnóstica pode ser usada para detectar um câncer.

[000171] O kit pode compreender (a) uma composição diagnóstica; e (b) um segundo recipiente com um segundo agente diagnóstico ou um segundo rótulo contido no mesmo. Ele pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial ou do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, etc.

Exemplo 1. Determinação de um modelo tridimensional de receptor P2X₇ não funcional para identificar epítomos putativos para ligação de anticorpo

[000172] A estrutura monomérica do P2X₇ foi baseada no modelamento realizado por Hansen *et al.* 1998 (Hansen, M.A., Barden, J.A., Balcar, V.J., Keay, K.A., Bennett, M.R. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 236, 670-675 - Structural Motif and Characteristics of The Extracellular Domain of P2X Receptors), no qual a homologia estrutural foi determinada entre subtipos de P2X. Homologia estrutural adicional foi obtida com a estrutura de transferase de Ser no banco de dados PDB, conforme aplicado ao maior dos dois domínios extracelulares identificados em Hansen supra.

[000173] Esse modelo se tornou a base para a identificação de resíduos cruciais para ligação de ATP. Esses resíduos identificados foram alterados para Ala usando mutagênese de sítio dirigida e os receptores com mutação foram expressos em células HEK para fins de medição da função do canal/poro P2X₇.

[000174] Os resíduos críticos que se descobriu serem individualmente responsáveis pela perda de função em virtude da incapacidade de ligação de ATP ao receptor expressão foram, então, mapeados em diferentes lados do modelo do grande domínio

extracelular. Como um exemplo, Arg 307 e Lys 311 (de SEQ ID No: 1) estavam sobre um lado do ECD, enquanto que Lys193, Arg 294, His 201 e Phe 275 (de SEQ ID No: 1) estavam sobre o outro lado do ECD em uma distância de aproximadamente 30 Angstroms.

[000175] Essa descoberta sugeriu que a montagem de monômeros requeria associação íntima em três dimensões entre os diferentes agrupamentos de aminoácidos essenciais. Modelamento de um trímero no qual os resíduos estavam próximos no espaço conformacional resultou em um modelo no qual os alvos epitópicos sobre monômeros adjacentes foram sugeridos.

[000176] Observou-se que a região de 200 a 216 de SEQ ID No: 1 (aqui E200) está exposta no P2X₇ não funcional, uma vez que apenas aqueles receptores não funcionais podiam se ligar a um anticorpo estimulado contra E200. Observou-se também que a região de 297 a 313 de SEQ ID No: 1 (aqui **E300**) está exposta em P2X₇ não funcional, uma vez que apenas aqueles receptores não funcionais podiam se ligar a um anticorpo estimulado contra E300. De acordo com nossa modelagem, esses epítomos são adjacentes no espaço conformacional no modelo trimérico montado.

[000177] Para testar a precisão do modelo do receptor montado, embora desconhecido através de difração por raios X por meio de análise de RMN, um modelo da interface consistindo em resíduos expostos capazes de se ligar a um anticorpo específico para a forma não funcional do receptor foi projetado. Elementos das regiões E200 e E300 presentes sobre faces monoméricas adjacentes foram selecionados e espaçados de acordo com o modelo, esse espaçamento sendo, idealmente, de 10 Angstroms. A orientação e espaçamento da interface proposta acessível em receptores não funcionais foi a base para a construção do alvo peptídico composto descrito abaixo.

[000178] A apresentação da região E200 ocorre apenas quando o resíduo Pro210 (de SEQ ID No: 1) está em *cis*. Bloqueio desse resíduo em *trans* resulta em anticorpos incapazes de ligação ao receptor, uma vez que a região E200 não é exposta. Bloqueio de Pro 210 em *trans* é consistente com a estrutura pertencente a receptores funcionais. Receptores funcionais têm uma conformação única (exclusiva). Todos os resíduos expostos sobre a superfície de resíduos funcionais são capazes de contribuir com epítomos que são idealmente evitados se anticorpos específicos têm de ser estimulados para se ligar a receptores não funcionais para aplicações que incluem objetivação terapêutica de receptores não funcionais que não reagem cruzadamente com receptores funcionais. Quando Pro 210 está em *trans*, então, os resíduos na região E200 estão ocultos para ligação de anticorpo pela formação correta do sítio de ligação a ATP formado pelo engolfamento correto dos monômeros de P2X₇. Apenas em *cis* esses resíduos estão expostos aos anticorpos seletivos capazes de diferenciar entre trímeros funcionais e não funcionais. Os anticorpos desenvolvidos contra os trímeros não funcionais que objetivam a interface monomérica e se ligam a resíduos sobre ambas as faces opostas podem ser descritos como ligantes trímero-específicos, uma vez que ligação aos monômeros é reduzida aproximadamente 50 vezes.

Exemplo 2. Design de Peptídeo

[000179] Seleção específica do peptídeo composto que forma uma interface acessível entre monômeros nos receptores P2X₇ não funcionais envolvia redução dos comprimentos de cada uma das regiões E200 e E300 de forma a selecionar anticorpos capazes de ligação em ponte entre monômeros com relação àqueles selecionados para ligação a uma ou outra face monomérica, isto é, E200 ou E300. Por essa razão, a região E200 foi reduzida, quanto ao comprimento,

de 200-216 para 200-211 (de SEQ ID No: 1), uma região ainda capaz de ligação simultânea de dois anticorpos e a região E300 foi ainda reduzida de 297-313 para 296-306 (de SEQ ID No: 1) para favorecer ligação em ponte de anticorpos E200 e E300 ao invés de ligação unicamente à E200 ou E300. A presença dos resíduos 211 e 296 (de SEQ ID NO: 1) foi projetada para complementar os resíduos AG também adicionados para espaçamento requerido para separar apropriadamente as regiões no espaço conformacional. A redução nos comprimentos individuais das regiões E200 e E300, combinado com o espaçamento apropriado, conforme deduzido a partir do modelo-guia, o resultado de 10 anos de trabalho, excluía a formação de anticorpos que provavelmente abrangiam resíduos muito grandemente separados sobre o receptor, levando à distorção e perda comensurável de afinidade.

[000180] Um peptídeo compósito na forma de uma sequência de GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK foi preparado através de síntese em fase sólida de acordo com técnicas padrões e conjugado usando um ligante de Maleimidocaproil-N-Hidróxi-succinimida (MCS).

Exemplo 3. Geração de anticorpos monoclonais

3.1 Metodologia

[000181] Camundongos foram inoculados com vários peptídeos compostos, conforme descrito acima, na forma de 200/300-peptídeo conjugado a toxoide de difteria. Um peptídeo tinha a sequência: GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK. Antes do reforço final, os animais sofreram triagem com relação à atividade e os melhores animais receberam um reforço, então, foram sacrificados e o baço removido. Células de baço foram isoladas e fundidas à linhagem de célula parceira de fusão Sp2/0 em uma proporção de não menos do que 1:2 e não mais do que 1:5, dependendo do formato usado. Células de baço restantes foram cultivadas em meio durante 3 dias e o

sobrenadante mantido para uso como um controle positivo no sistema de ensaio.

[000182] Fusão 1 - Compósito E200/E300, usando lâminas com 96 poços, 1 lâmina com camadas alimentadoras de macrófago, outras 4 com meio condicionado apenas.

[000183] As lâminas com macrófago foram numeradas 5 e 10.

Procedimentos de Hibridização

[000184] 1. Fazer um tubo de fusão 1 até 50 ml com EBSS, centrifugar a 600 rpm durante 8 min.

[000185] 2. Remover o sobrenadante do tubo 1, + 10 ml de EBSS, misturar, + 15 ml de EVSS.

[000186] Tubo de fusão 2, etapa 1.

[000187] Centrifugar os tubos 2 & 3 a 600 rpm durante 8 min.

[000188] 3. Tubo de fusão 2 conforme para a etapa 2, tubo de fusão 3 conforme para a etapa 1.

[000189] Centrifugar os tubos 2 & 3 a 600 rpm durante 8 min.

[000190] 4. Tubo de fusão 1, remover o sobrenadante e sacudir o tubo para soltar o pélete.

[000191] Configurar o timer para 8 min.

[000192] Adicionar 0,8 ml de mistura de PEG em uma pipeta de 1 ml, gota a gota durante 1 min, misturando suavemente.

[000193] Transferir o tubo para um banho de água durante 1 min.

[000194] Adicionar 1 ml de tampão de hepes, em uma pipeta de 1 ml, gota a gota durante 1 min, misturando suavemente.

[000195] Adicionar 20 ml de tampão de hepes, gota a gota a partir de uma pipeta de 10 ml, durante 5 min, misturando suavemente.

[000196] 5. Tubo 3 conforme para a etapa 2, então, centrifugar os tubos 1 & 3 juntos.

[000197] 6. Tubo 2 conforme a etapa 4.

[000198] 7. Tubo 1, remover o sobrenadante, adicionar 10 ml de Isc

(+ FBSI a 20%) +/- HAT. Ressuspender, adicionar mais 30 ml.

[000199] 8. Centrifugar os tubos 1 & 2 juntos.

[000200] 9. Tubo 3 conforme para a etapa 4.

[000201] 10. Tubo 1; remover sobrenadante, ressuspender em 10 ml de Isc (+ FBSI a 20%) + HAT e carregar 0,05 ml por poço para o formato de 24 poços ou ressuspender em 40 ml e carregar 0,1 por poço para o formato de 96 poços. Carregar 0,05 ml por poço das oito primeiras bandejas - 24 poços, 0,1 ml por poço para as primeiras 4 bandejas - 96 poços.

[000202] 11. Tubo 2 conforme para a etapa 7, tubo 3 conforme para a etapa 4, continuar o processo até que todos os tubos estejam carregados nas bandejas.

ELISAS

[000203] Epítomos foram revestidos a uma lâmina de PVC (cloreto de polivinila) e usados para capturar anticorpos dos sobrenadantes de célula. Desconhecidos foram comparados com um controle positivo e negativo.

[000204] EP200/300 com proteína veículo BSA presa foi usado para revestir lâminas ELISA para testagem.

Testagem de Sobrenadante

[000205] Conforme os poços se tornam confluentes, remover tudo, exceto 0,05 ml de meio para um tubo de amostra ou lâmina.

- Testar com relação à produção de anticorpo, positivos expandidos, descartar os negativos.

- Expandir em frascos de 25 cm contendo 2 ml de meio e deixar de pé.

- Expandir para 4 ml, 2 x 4 ml, 2 x frascos de 75 cm (12 ml). Expandir o volume para 30 ml/frasco. Estoques foram congelados quando confluentes.

- Retestar os sobrenadantes quando de congelamento.

Protocolo padrão usado para todos os ensaios ELISA

- Epítomos revestidos em uma concentração de 1 µg/ml, diluído em PBS, 50 µl/poço - agitador em TA durante a noite.
- Poços enxaguados com PBS (sem Ca/Mg).
- Poços bloqueados 1 hora com ovalbumina a 0,1% em PBS, 200 µl/poço.
- Enxaguar em PBS.
- Sobrenadantes a sofrer triagem (em duplicatas), 50 µl/poço - agitador durante 2 horas em TA.
- Enxaguar 3x em PBS.
- Anticorpo de coelho anti-HRP de camundongo, 1/1000 em bloco, 50 µl/poço - agitador durante 1,5 hora em TA.
- Enxaguar 4 x em PBS.
- Substrato Sigma ABTS (sal de diamônio de ácido 2,2' - Azino - bis (3 - Etilbenztiazolina - 6 -) a 1,1 mg/ml em Citrato a 0,05 M + 2 µl de Peróxido de hidrogênio/10 ml para ativar - fazer fresco.
- Adicionar ABTS às poços durante 20 min, 100 µl/poço, cessar com 25 µl/poço de ácido oxálico a 5%.
- Ler em um comprimento de onda de teste de 405/referência de 490 nm.

3.2 Resultados

[000206] O rendimento foi muito baixo em todas as lâminas, exceto aquelas contendo macrófagos. Três ciclos de triagem por ELISA identificaram 37 clones que secretam uma especificidade contra o peptídeo composto. Muitos desses clones morreram ou pararam de secretar. Aqueles que sobreviveram foram expandidos e congelados em ampolas. Sorologia, incluindo reatividade cruzada com E200 e E300, foi determinada no Exemplo a seguir.

Exemplo 4. Caracterização sorológica de anticorpos

[000207] Anticorpos estimulados contra o peptídeo composto sofreram triagem contra peptídeos tendo a sequência das regiões E200 ou E300. Embora capazes de se ligar a esses alvos, os anticorpos foram identificados como tendo ligação preferida pelo peptídeo composto.

4.1 Testagem de Reatividade Cruzada

[000208] Os anticorpos gerados a partir do Exemplo 3 sofreram triagem usando ELISA, conforme descrito acima, contra o peptídeo composto (COMP), U140 (um peptídeo tendo uma sequência de um epítopo que é encontrado sobre receptores funcionais e não funcionais), 200 (um peptídeo tendo a sequência da região E200), 300 (um peptídeo tendo a sequência da região E300) e U80 (um peptídeo tendo uma sequência de um epítopo que é encontrado sobre receptores funcionais e não funcionais). Os resultados são mostrados na tabela a seguir e na figura 9.

[000209] A reatividade cruzada do U80 é provavelmente em virtude da tag DT, uma vez que os animais foram imunizados com DT e U80 usado no ELISA tinha a tag DT.

20 min	T/C supn	BSA		COMP		U140		200		300		U80	
	2A11	0,125	0,137	3,625	3,602	0,17	0,508	0,138	0,194	0,144	0,186	0,181	0,154
	2F6	0,236	0,26	1,332	1,323	1,615	1,612	1,371	1,402	1,405	1,411	1,133	0,922
	3D6	0,326	0,335	1,293	1,219	1,563	1,427	1,014	1,037	1,123	1,109	0,99	1,079
	4F5	0,122	0,121	3,265	3,503	0,141	0,139	0,127	0,124	0,155	0,139	0,132	0,143
Comp	5C5	0,12	0,122	0,163	0,166	0,155	0,162	0,14	0,145	0,143	0,146	0,158	0,182
	5C8	0,155	0,157	0,256	0,27	0,315	0,304	0,234	0,214	0,241	0,244	0,378	0,404
	5D5	0,122	0,121	0,814	0,801	0,136	0,132	0,133	0,137	0,132	0,126	0,133	0,137
	5F3	0,125	0,123	3,531	3,57	0,165	0,157	0,139	0,175	0,149	0,146	0,152	0,223
	5F5	0,292	0,283	1,013	1,04	1,155	1,215	0,93	0,832	0,978	0,903	1,034	1,049
	lsc	0,126	0,122	0,144	0,114	0,142	0,164	0,129	0,128	0,128	0,179	0,15	0,49
Comp +ve		0,163	0,165	3,607	3,613	3,62	3,59	2,678	2,501	2,707	2,916	3,597	3,565

58/61

MEIOS		BSA	Comp	U140	200	300	U80
	2A11	0,131	1,881	3,614	1,886	0,339	0,323
	2F6	0,248	0,796	1,328	1,469	1,614	1,492
	3D6	0,331	0,814	1,256	1,391	1,495	1,221
	4F5	0,122	1,693	3,384	1,822	0,140	0,133
		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Comp	5C5	0,121	0,143	0,165	0,161	0,159	0,151
	5C8	0,156	0,207	0,263	0,293	0,310	0,269
	5D5	0,122	0,458	0,808	0,469	0,134	0,133
	5F3	0,124	1,827	3,551	1,868	0,161	0,148
	5F5	0,288	0,648	1,027	1,098	1,185	1,073
	Isc	0,124	0,133	0,129	0,128	0,153	0,147
Comp +ve		0,164	1,886	3,610	3,617	3,605	3,134

59/61

Exemplo 5. Ligação de anticorpo monoclonal 2F6 ao P2X₇ não funcional sobre células tumorais vivas

[000210] Os anticorpos da invenção foram analisados com relação à ligação a linhagens de células tumorais humanas expressando o receptor P2X₇ não funcional e células hematopoiéticas humanas expressando o receptor P2X₇ funcional através de análise por (Fluorescence Activated Cell Sorter - FACS). A Tabela 6 resume a ligação de um anticorpo monoclonal (MAb), 2F6, a essas células. Análise por FACS demonstrou a ligação do MAb 2F6 à linhagem de célula de tumor de próstata PC3, com uma intensidade média de fluorescência (MFI) de 334,62 comparado com uma MFI de 27,87 para o anticorpo de controle negativo. Ligação do MAb 2F6 à linhagem de célula de tumor de mama MCF-7 também foi observada, embora mais fraca (MFIs de 160,3 e 50,4 para 2F6 e controle 3D6, respectivamente). Contudo, virtualmente nenhuma ligação foi detectada aos linfócitos humanos testados (Tabela 6). A figura 8 ilustra os resultados de subsequentes experimentos de análise FACS e demonstra, similarmente, a ligação de MAb 2F6 à linhagem de célula de tumor de próstata PC3 e à linhagem de célula de tumor de mama MCF-7, mas não à amostra de linfócito humano.

Tabela 6. Análise por FACS de ligação de MAb 2F6 à linhagens de célula de tumor e linfócitos humanos

	Linhagem de célula de tumor de próstata PC3		Linhagem de célula de tumor de mama MCF-7		Linfócitos humanos	
MAb	Intensidade Média de Fluorescência (MFI)	Percentual de células positivas	Intensidade Média de Fluorescência (MFI)	Percentual de células positivas	Intensidade Média de Fluorescência (MFI)	Percentual de células positivas
IgM Controle Negativo (3D6)	27,87	1	50,40	0	17,68	0
HLA (W6/32) Controle Positivo	NT*	NT	1667,92	87	3897,33	100
2F6	334,62	47	160,30	5	22,34	1

* Não testado

[000211] Será entendido que a invenção descrita e definida no presente relatório descritivo se estende a todas as combinações de duas ou mais características individuais mencionadas ou evidentes a partir do texto ou desenhos. Todas essas diferentes combinações constituem vários aspectos alternativos da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo, caracterizado pelo fato de que possui a fórmula (A)(X_n)(B), em que o peptídeo possui a seguinte sequência: GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK (SEQ ID NO: 10).

FIG. 1

1 MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFY VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61 VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKL VHSV FDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLCP
121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD
241 NFSDVAIQGG IMGIEIYWD C NLD RWFH HCR PKYSFRRLDD KTTNVS LYPG YNFRYAKYYK
301 ENNVEKRTL I KVFGIRFDIL VFGTGGKFDI IQLVVYIGST LSYFGLA AVF IDFLIDTYSS
361 NCCRSHIYPW CKCCQPCVVN EYYYRKKCES IVEPKPTLKY VSFVDESHIR MVNQQLGRS
421 LQDVKGQEV P RPAMDFTDLS RLPLALHDTP PIPGQP EEIQ LLRKEATPRS RDSPVWCQCG
481 SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKP GACITTS ELFRKLVLSR HVLQFLLLYQ EPLLALDVDS
541 TNSRLRH CAY RCYATWRFGS QDMADFAILP SCCRWRIRKE FPKSEGQYSG FKSPY

(SEQ ID NO: 1)

FIG. 2

HNYTTRNIL (SEQ ID NO: 2)

FIG. 3

GHNYTTRNIL (SEQ ID NO: 3)

FIG. 4

DFPGHNYTTRNIL (SEQ ID NO:4)

FIG. 5

1 MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFS Y VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61 VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKL VHSVFD T ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLCP
121 EYPTRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNIL

(SEQ ID NO:5)

FIG. 6

KTTNVS LYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTL IKVFGIRFDILVFGTGGKFD

(SEQ ID NO: 6)

FIG. 7

KYYKENNVEKRTL IKVF

(SEQ ID NO: 7)

FIG. 7a

GHNYTTRNILP

(SEQ ID NO: 8)

FIG. 7b

AKYYKENNVEK

(SEQ ID NO: 9)

FIG. 7c

GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK

(SEQ ID NO: 10).

FIG. 8a

Ligação de MAb 2F6 à células PC3 através de análise por FACS

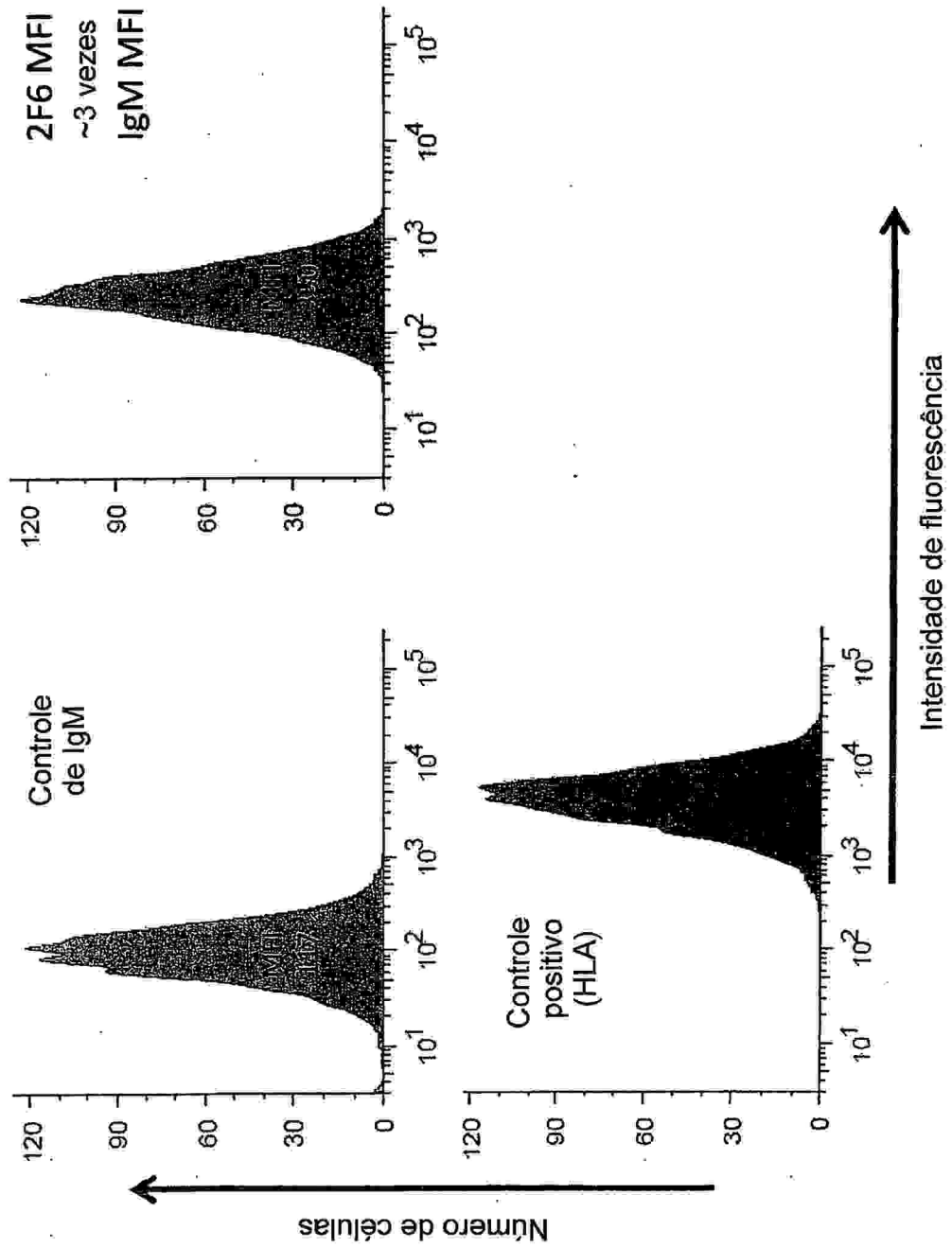


FIG. 8b

Ligação de MAb 2F6 à células MCF7 através de análise por FACS

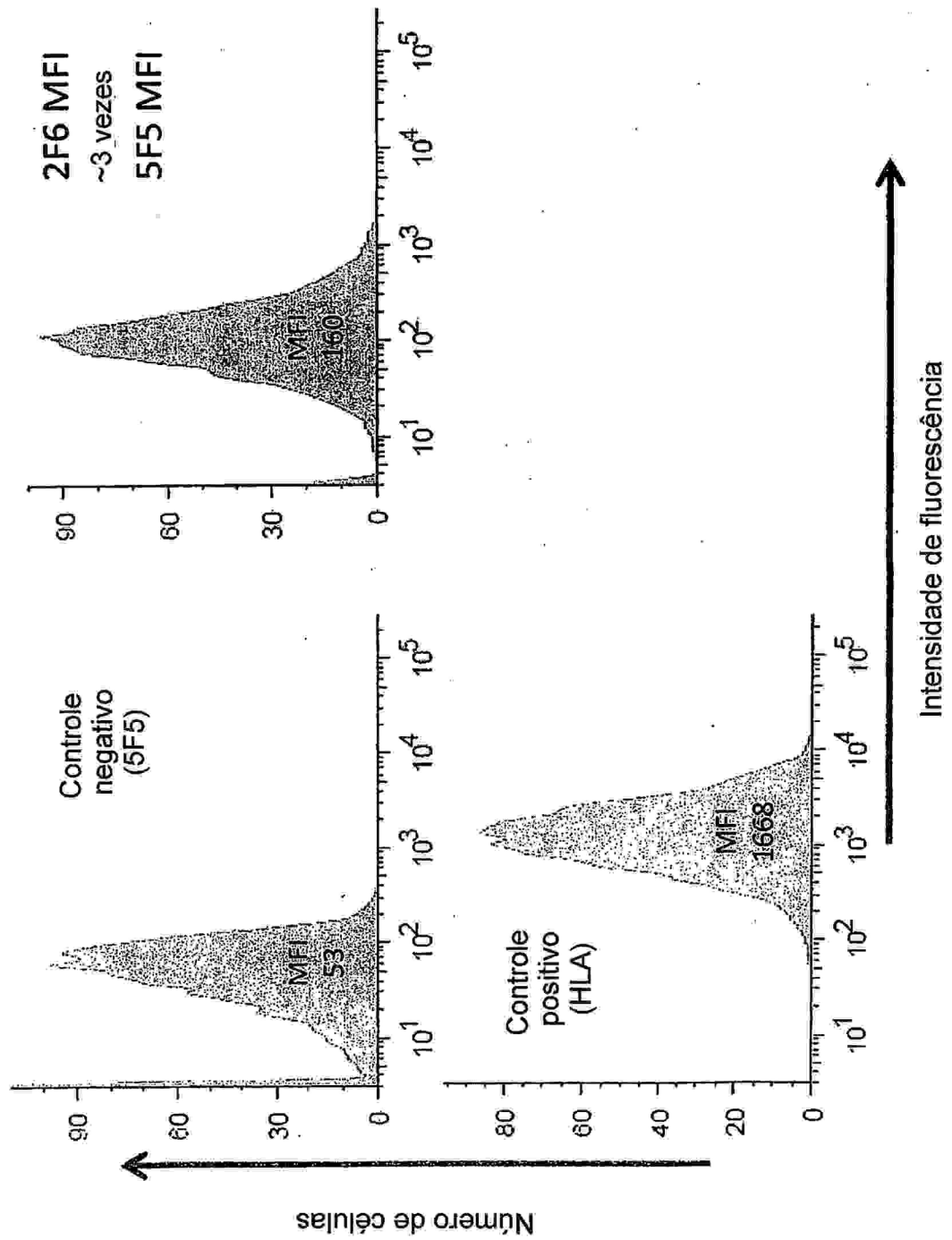
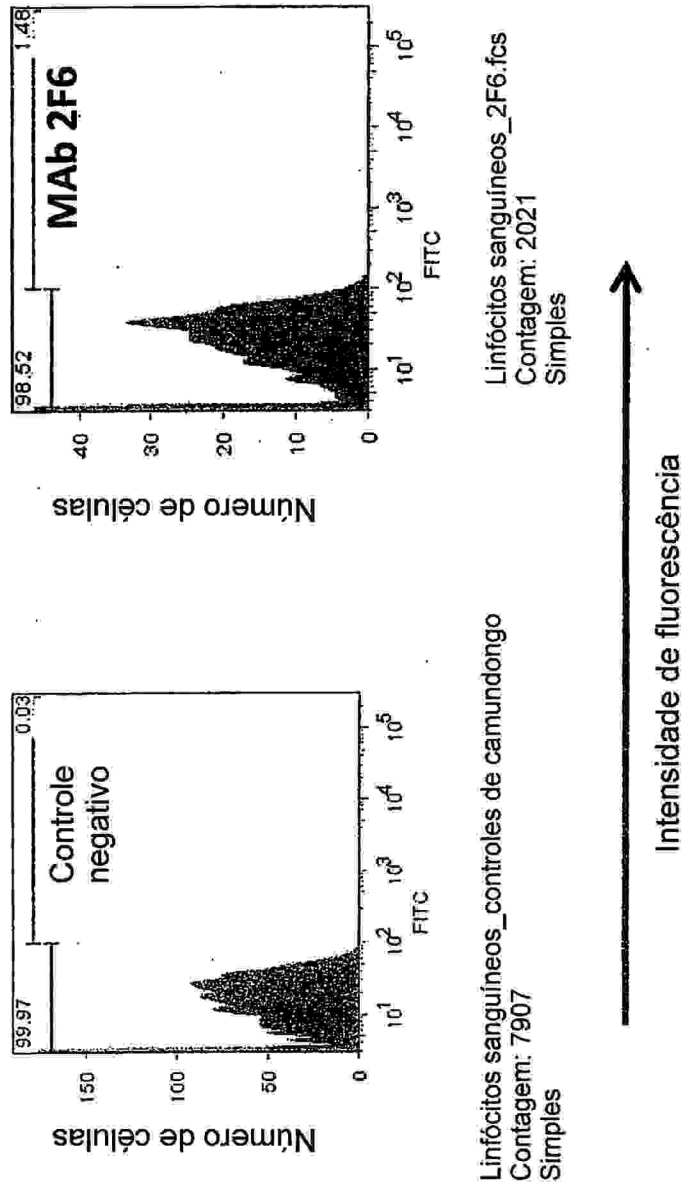


FIG. 8c

Não-ligação de MAb 2F6 ao P2X₇ funcional sobre linfócitos humanos através de análise por FACS



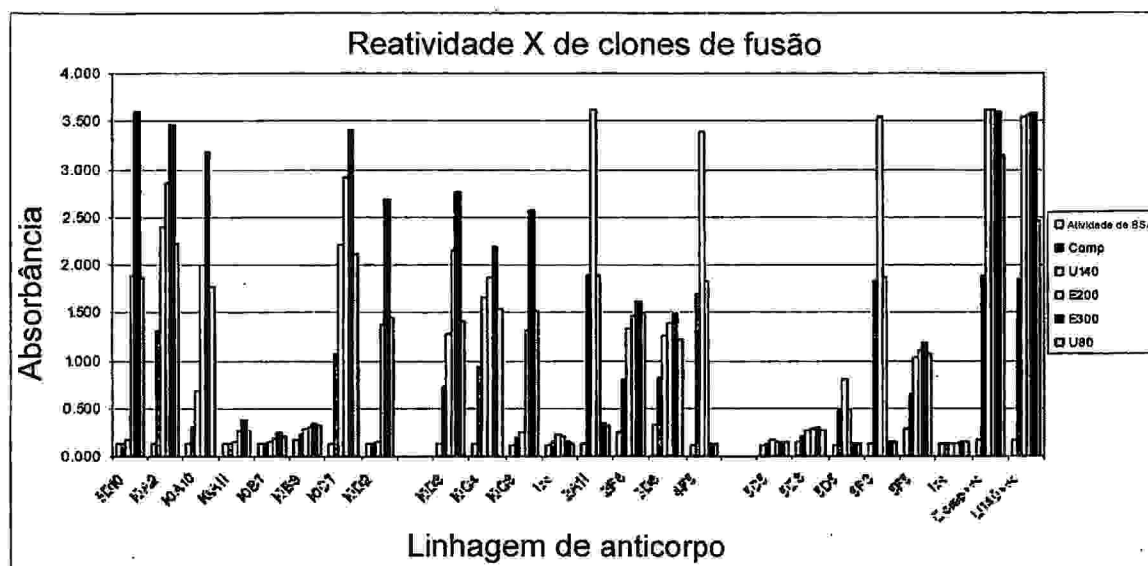


FIG. 9