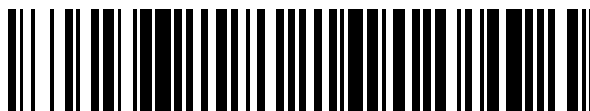


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 021**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010** **E 17209838 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 3321285**

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

30 Prioridad:

24.12.2009 AU 2009906286

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

20.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 021 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de receptores P2X₇ oligoméricos no funcionales

Campo de la divulgación

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

Antecedentes

10 La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es, y no debería tomarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o cualquier otra jurisdicción o que esta técnica anterior pudiera esperarse razonablemente que se estableciera, comprendiera y considerara como relevante por un especialista en la materia.

Los receptores purinérgicos (P2X) son canales selectivos de catión activados por ATP. Cada receptor está compuesto por tres subunidades o monómeros proteicos. Hasta la fecha, se han identificado siete genes separados que codifican monómeros de P2X: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ y P2X₇.

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

20 De forma interesante, se ha encontrado un receptor P2X₇ que contiene uno o más monómeros que tienen una isomerización cis en la Pro210 (según la SEQ ID NO: 1) y que está desprovisto de función de unión a ATP en células que se entiende que son incapaces de experimentar muerte celular programada, tales como células preneoplásicas y células neoplásicas. Se hace referencia a esta isoforma del receptor como un receptor "no funcional".

25 Los anticuerpos generados a partir de la inmunización con un péptido que incluye Pro210 en cis se unen a receptores P2X₇ no funcionales. Sin embargo, no se unen a receptores P2X₇ capaces de unirse a ATP. Por consiguiente, estos anticuerpos son útiles para detectar selectivamente muchas formas de carcinomas y cánceres hematopoyéticos y para el tratamiento de algunas de estas afecciones.

30 Los documentos WO 02/057306A1 y WO 03/020762A1 discuten ambos una sonda para distinguir entre receptores P2X₇ funcionales y receptores P2X₇ no funcionales en forma de un anticuerpo monoclonal. El documento WO 2008/043145 describe la producción de Ab anti-receptor P2X₇ no funcional que se ha provocado en ratones inmunizados con el péptido consistente en los residuos 200-216.

Hasta la fecha, ha sido muy difícil obtener reactivos serológicos que se unan a receptores P2X₇ no funcionales en células vivas con afinidad deseable. Los reactivos de alta afinidad son generalmente deseables en aplicaciones para la detección y el tratamiento de cáncer.

35 Existe la necesidad de reactivos mejorados para unir a receptores P2X₇, particularmente anticuerpos nuevos y fragmentos de los mismos que sean capaces de discriminar entre receptores P2X₇ de unión a ATP y sin unión a ATP. Existe también la necesidad de anticuerpos y fragmentos de los mismos que exhiban una unión preferencial a un receptor P2X₇ cuando se expresa en células vivas, con capacidad reducida de unión a un receptor P2X₇ una vez la célula diana ha muerto.

Compendio

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

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 1:



45 en la que:

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

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

en las que

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: (cargado/polar/aromático)(cargado/aromático)XXX(XX)(aromático/alifático)

(cargado/neutro)(neutro/alifático).

X a lo largo de la memoria descriptiva representa cualquier aminoácido.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 2:

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

en la que:

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

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

en las que:

10 CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: N(Y/F)XXX(Y/F)EX.

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

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: N(Y/F)(neutro)(cargado)(neutro)Y(Y/F)E(neutro).

20 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 4:

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

en la que:

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

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

25 en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: NFLESYFEA.

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

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

30 en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: N(Y/F)(cargado)(neutro)(cargado)Y(Y/F)E(neutro).

35 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 6:

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: NYRGDYVET.

5 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 7:

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

en la que:

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

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

10 en las que:

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

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 8:

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

15 en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: H(Y/F)(neutro)(cargado)(cargado)YYNI.

20 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 9:

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: H(Y/F)(neutro)(cargado)(neutro)YYNI.

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

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

en la que:

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

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

en las que:

35 CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: HYSKEYYNI.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 11:

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: HFQRGYYNI.

5 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 12:

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: (Y/N)(aromático)XXXYY(cargado)(neutro).

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 13:

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

en la que:

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

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

en las que:

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

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 14:

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

en la que:

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

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

en las que:

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

30 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 15:

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

en la que:

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

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

35 en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: YFPLVYYDV.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 16:

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

en la que:

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

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

en las que:

5 CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: NYLPMYYEV.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 17:

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: Y(cargado)XXX(Y(neutro))(neutro)(neutro).

15 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 18:

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

en la que:

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

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

20 en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de: YHVIQYLGP.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 19:

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

25 en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo consistente en:

**HYSSRFFDV, NFKLMYYNV, NYRGDYYET, HFSRGYYDV, NFLESYFEA,
NYLPMYYEV, HYIKVYYEA, HYSSRFFEY, NFRVMFFKA, HFQRGYYNI, HYSSRFFEY,
YHVIQYLGP, HYSKEYYNI, YFPLVYYDV, DFTVPFYNA, NYDKKYFDV, YFPLVYYDV.**

30 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 20:

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR1 tiene una secuencia aminoacídica de KASQNVGTNVA.

CDR3 tiene la secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3.

5 En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 21:

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

en la que:

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

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

10 en las que:

CDR1 tiene una secuencia aminoacídica de SYYSMS.

CDR3 tiene la secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 22:

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

en la que:

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

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

en las que:

20 CDR2 tiene una secuencia aminoacídica de SASFRYS.

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 23:

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

25 en la que:

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

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

en las que:

CDR2 tiene una secuencia aminoacídica de AINSNGGSTYYPDTVKG.

30 CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 24:

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

en la que:

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

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

en las que:

CDR1 tiene una secuencia aminoacídica de KASQNVGTNVA

CDR2 tiene una secuencia aminoacídica de SASFRYS

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 25:

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

en la que:

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

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

en las que:

10 CDR1 tiene una secuencia aminoacídica de SYYS

CDR2 tiene una secuencia aminoacídica de AINSNGGSTYYPDTVKG

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno según cualquier caso descrito anteriormente en el que FR1 sea cualquiera de **MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC** o

15 **DVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFS**.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno según cualquier caso descrito anteriormente en el que FR2 sea cualquiera de **WYQKPGQSPKALIY** o **WVRQTPEKRLELVA**.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno según cualquier caso descrito anteriormente en el que

20 FR3 sea cualquiera de **GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFC** o **RFTISRDNKNTLYLQMSSSLKSEDTAFYYCTR**.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno según cualquier caso descrito anteriormente en el que

FR4 sea cualquiera de **FGSGTRLEIK** o **WGAGTTVTVSS**.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 26:

25 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - ligador - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a

en la que:

FR1, FR2, FR3, FR4, FR1a, FR2a, FR3a y FR4a son cada una regiones marco;

CDR1, CDR2, CDR3, CDR1a, CDR2a, CDR3a son cada una regiones determinantes de la complementariedad;

en las que:

30 CDR1 tiene una secuencia aminoacídica de KASQNVGTNVA

CDR2 tiene una secuencia aminoacídica de SASFRYS

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3 o QQYNSYPFT.

CDR1a tiene una secuencia aminoacídica de SYYS

35 CDR2a tiene una secuencia aminoacídica de **AINSNGGSTYYPDTVKG**

CDR3a tiene una secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3 o QQYNSYPFT (SEQ ID NO: 33) cuando CDR3 es una secuencia aminoacídica de cualquier caso anterior que describa una secuencia de CDR3

FR1 tiene una secuencia aminoacídica de **MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC** (SEQ ID NO: 25)

FR2 tiene una secuencia aminoacídica de **WYQQKPGQSPKALIY** (SEQ ID NO: 26)

FR3 tiene una secuencia aminoacídica de **GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFC** (SEQ ID NO: 27)

FR4 tiene una secuencia aminoacídica de **FGSGTRLEIK** (SEQ ID NO: 28)

FR1a tiene una secuencia aminoacídica de **DVKLVESGGGLVKLGGSLLKLSAASGFTFS** (SEQ ID NO: 29)

5 FR2a tiene una secuencia aminoacídica de **WVRQTPEKRLELVA** (SEQ ID NO: 30)

FR3a tiene una secuencia aminoacídica de **RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTR** (SEQ ID NO: 31)

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

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 27:

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

en la que:

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

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

en las que:

15 CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de:

(cargado/polar/aromático)(aromático)(cargado/neutro)(cargado)(cargado/neutro)Y(aromático)(cargado)(neutro)

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 28:

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

20 en la que:

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

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

en las que:

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica de:

25 (cargado/polar/aromático)(F/Y)(cargado/neutro)(R/K)(cargado/neutro)(Y)(Y/F)(E/D)V.

En un caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno para la unión a un receptor P2X₇, estando definido el sitio de unión a antígeno por la fórmula general 30:

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

en la que:

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

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

en las que:

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

35 En un caso, el ligador de la fórmula general 26 tiene una secuencia aminoacídica de 15 residuos aminoacídicos. Típicamente, el "ligador" comprende predominantemente residuos de glicina y serina. Preferiblemente, el ligador es **GGGSGGGSGGGGS**.

En un caso, el sitio de unión a antígeno de la divulgación tiene una secuencia aminoacídica de CDR3 que comprende

HFSRGYYDV₀ NYDKKYFDV₁

En un caso, el sitio de unión a antígeno de la divulgación tiene una secuencia aminoacídica de CDR3 que consiste en **HFSRGYYDV₀ NYDKKYFDV₁**.

- 5 En otros casos, se proporciona un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia como se describe en la presente memoria, o incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria e incluye una o más mutaciones para aumentar la afinidad de dicho sitio para unión a un receptor P2X₇.
- En otro caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno como se describe en la presente memoria, en el que la secuencia aminoacídica que forma uno o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 es una secuencia humana.
- 10 En otro caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno como se describe en la presente memoria, en el que la secuencia aminoacídica que forma uno o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 es una secuencia canina o felina.
- El sitio de unión a antígeno puede genomanipularse para tener secuencias de un animal particular, por ejemplo, puede ser quimérico (concretamente, que contiene algunas pero no todas las secuencias encontradas en el individuo que recibe el anticuerpo). Como alternativa, puede consistir en secuencias alogénicas o singénicas. Es un ejemplo de las últimas un anticuerpo de perro para uso en el tratamiento de un perro.
- 15 El animal del que deriva el anticuerpo puede incluir un animal doméstico, de compañía o de granja, incluyendo perros, gatos, vacas, cerdos, caballos y ovejas.
- En otro caso, se proporciona un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab o scFv anti-receptor P2X₇ que incluye un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia descrita en la presente memoria, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria.
- 20 En otro caso, se proporciona un diacuerpo o triacuerpo que incluye un sitio de unión a antígeno que tiene una secuencia como se describe en la presente memoria, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria.
- 25 En otro caso, se proporciona una proteína de fusión que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, Fab, dab, scFv, diacuerpo o triacuerpo como se describe en la presente memoria.
- En otro caso, se proporciona un conjugado en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo o proteína de fusión como se describe en la presente memoria conjugado con un marcaje o un agente citotóxico.
- 30 En otro caso, se proporciona un anticuerpo para unión a un sitio de unión a antígeno de un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en la presente memoria.
- En otro caso, se proporciona un ácido nucleico que codifica un sitio de unión a antígeno, o una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria, o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en la presente memoria.
- 35 En otro caso, se proporciona un vector que incluye un ácido nucleico descrito en la presente memoria.
- En otro caso, se proporciona una célula que incluye un vector o ácido nucleico descrito en la presente memoria.
- En otro caso, se proporciona un animal o tejido derivado de mismo que incluye una célula descrita en la presente memoria.
- 40 En otro caso, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria, o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en la presente memoria y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 En otro caso, se proporciona una composición de diagnóstico que incluye un sitio de unión a antígeno, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria, o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en la presente memoria, un diluyente y opcionalmente un marcaje.
- En otro caso, se proporciona un kit o artículo de fabricación que incluye un sitio de unión a antígeno, o que incluye una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria o un dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe en la presente
- 50

memoria.

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

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

10 En otro caso, se proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico producidas a partir de la mutación de un sitio de unión a antígeno o una secuencia de CDR y/o FR como se describe en la presente memoria, en la que al menos una molécula de ácido nucleico en dicha colección codifica un sitio de unión a antígeno para unión a un receptor P2X₇.

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

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

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

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

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

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

40 Típicamente, los sitios de unión a antígeno según la divulgación se unen a receptores P2X₇ no funcionales en células vivas. En algunos casos, los sitios de unión a antígeno no se unen, o se unen con afinidad muy baja o indetectable, a receptores no funcionales en células muertas o moribundas. Que un sitio de unión a antígeno de la divulgación se una o no a un receptor P2X₇ puede determinarse usando métodos estándares conocidos en la materia.

45 En un caso, los sitios de unión a antígeno según la divulgación se unen a receptores P2X₇ en células vivas con afinidades (K_D) en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 uM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de una IgM, la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es entre aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 nM, preferiblemente de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 50 pM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de una IgG, la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es entre aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 nM, preferiblemente entre aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 pM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de un Fab, la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es entre aproximadamente 100 pM a aproximadamente 100 nM, preferiblemente de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 nM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de un scFv, la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es entre aproximadamente 10 nM a aproximadamente 1 uM, preferiblemente entre aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM. Típicamente, cuando el sitio de unión a antígeno es parte de un dab, la afinidad por receptores P2X₇ en células vivas es entre aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10 uM, preferiblemente de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 uM.

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

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

Breve descripción de los dibujos

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

5 Figura 2. Una secuencia de dominio extracelular del receptor P2X₇. El receptor P2X₇ (47-306) (SEQ ID NO: 2) (ECD2) es los aminoácidos 47 a 306 de SEQ ID NO: 1. Las tachaduras de aminoácidos designan aminoácidos que se eliminan de la secuencia del receptor P2X₇ de longitud completa.

Figura 3. Una secuencia de dominio extracelular del receptor P2X₇. El receptor P2X₇ (47-332) (SEQ ID NO: 3) (ECD1) es los aminoácidos 47 a 332 de SEQ ID NO: 1. Las tachaduras de aminoácidos designan aminoácidos que se eliminan de la secuencia del receptor P2X₇ de longitud completa.

Figura 4. Estructura del vector de expresión para V_H de 2F6.

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

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

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

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

Figura 9. (a) Ensayos de inhibición celular *in vitro*. Se encontró que la forma de IgM del anticuerpo original de la forma trimérica del receptor P2X₇ no funcional expresado en células cancerosas inhibía el crecimiento celular usando el ensayo Cell Titer Blue. Se muestra un ejemplo en que el anticuerpo IgM de control se ve que no tiene efecto sobre el crecimiento celular (columnas a la izquierda) para concentraciones crecientes de 2,5 a 40 ug/ml, mientras que 2F6 inhibía el crecimiento celular (columnas a la derecha) en el mismo intervalo de dosis en un ensayo de crecimiento de 3 días. (b), (c), (d) Otros tipos celulares se inhibían de forma similar por incubación con la forma IgM del anticuerpo. Se inhibía el crecimiento durante 5 días en mayor medida que durante 3 días. Se representan los datos de crecimiento respecto a las curvas de crecimiento de control usando el anticuerpo IgM de control. El crecimiento de COLO205 se inhibía significativamente durante 3 días y las células se eliminaban durante 5 días, incluso a la dosis baja de 2,5 ug/ml. Esto indica que diferentes estirpes celulares que expresan niveles ligeramente diferentes de receptor son más o menos susceptibles a la unión a anticuerpo. (e) En contraposición, la forma IgG_{2a} recombinante de un anticuerpo mostraba una inhibición celular más débil que la mostrada en las siguientes figuras obtenidas durante 3 días. El ensayo de inhibición del crecimiento celular (Cell Titer Blue) mostraba que la forma IgG_{2a} del anticuerpo tenía una inhibición del crecimiento celular tumoral reducida en comparación con la inhibición desencadenada usando la forma IgM del anticuerpo, en línea con la afinidad de unión reducida de la IgG que contiene, de hecho, dos dominios de unión en lugar de diez.

Figura 10. Reacción de bloqueo en el ensayo de destrucción celular. Se usa el ensayo de inhibición del crecimiento celular Cell Titer Blue durante el crecimiento celular de 3 días con la estirpe celular de cáncer de mama MCF-7. Se observa que las células de control viables en la columna derecha no tienen anticuerpo ni péptido. La columna de la izquierda es la señal derivada de las células incubadas con anticuerpo 2F6 IgM 10 ug/ml que contiene suficiente epítipo peptídico 500 ug/ml (epítipo E200-300 descrito como 200/300 en la Figura) para bloquear la inhibición del crecimiento celular evidenciada por los datos en las tres columnas centrales, que muestran que la inhibición del crecimiento no está afectada por la presencia de 50 ug/ml, 5 ug/ml o 0 ug/ml de péptido, respectivamente. Ocurre la inhibición total del crecimiento celular después de 5 días de exposición a 2F6.

Figura 11. Mecanismo de muerte celular inducida por 2F6 con activación de caspasa 3/7 asociada a la reactivación de la apoptosis. En este experimento, se muestra a la izquierda el efecto del fármaco de control gemcitabina, conocido por activar caspasas mediante la inducción de la apoptosis en células cancerosas COLO205. En contraposición, la ausencia de fármaco o anticuerpo no tiene efecto (columna de solo células). La presencia de IgM de control a dosis de hasta 40 ug/ml no tiene de forma similar efecto sobre la activación de caspasa, mientras que las cantidades crecientes de anticuerpo 2F6 muestran un aumento continuo de la activación de caspasa 3/7 asociado con la inducción de apoptosis por el anticuerpo durante el curso temporal de 3 días del experimento.

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

Figura 13. (a) 2-2-1hFc unido a células tumorales 4T1 vivas que muestran cierta unión membranosa (obj. x40). (b) 2-

2-1hFc unido a células moribundas junto con desechos membranosos de células ya destruidas. (c) 2-2-1hFc unido a células tumorales LL vivas que muestran una clara unión membranosa. (d) 2-2-1hFc unido a desechos membranosos de células ya destruidas.

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

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

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

Figura 17. Maduración por afinidad de secuencias de CDR3 de 2F6. Las secuencias aminoacídicas de derivados de scFv/Fab madurados por afinidad se enumeraban como clones mutantes, con la secuencia de CDR3 de 2F6 de tipo silvestre (WT) en la cabeza de la lista.

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

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

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

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

Figura 22. Resultados de citometría de flujo para la unión de anticuerpo policlonal de oveja purificado de alta afinidad a células PC3 que muestran una unión significativamente más fuerte que 2F6 hlgG_{2a} WT e indican las mejoras esperables de una serie de Fab madurados por afinidad una vez convertidos en agentes de unión a IgG divalentes.

Descripción detallada

Se hará referencia ahora con detalle a ciertos casos de la divulgación. Aunque la divulgación se describirá junto con los casos.

Como se usa en la presente memoria, excepto cuando el contexto requiera otra cosa, el término “comprender” y variaciones del término tales como “comprendiendo”, “comprende” y “comprendido” no pretenden excluir aditivos, componentes, enteros o etapas adicionales.

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

Con fines de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, siempre que sea

apropiado, los términos usados en singular incluirán también los plurales y viceversa. En caso de que cualquier definición expuesta contradiga cualquier documento, prevalecerá la definición expuesta a continuación.

"Receptor purinérgico" hace referencia generalmente a un receptor que usa una purina (tal como ATP) como ligando.

"Receptor P2X₇" hace referencia generalmente a un receptor purinérgico formado a partir de tres subunidades o monómeros proteicos, teniendo al menos uno de los monómeros una secuencia aminoacídica sustancialmente como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (véase la Figura 1). El *"receptor P2X₇"* puede ser un receptor funcional o no funcional como se describe a continuación. El *"receptor P2X₇"* engloba variantes de origen natural del receptor P2X₇, p. ej., en las que los monómeros de P2X₇ son variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas que incluyen formas truncadas o secretadas de origen natural de los monómeros que forman el receptor P2X₇ (p. ej., una forma consistente en la secuencia de dominio extracelular o forma truncada del mismo), formas variantes de origen natural (p. ej., formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas de origen natural. En ciertos casos de la divulgación, los polipéptidos monoméricos de P2X₇ de secuencia nativa divulgados en la presente memoria son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden la secuencia de aminoácidos de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 1. En ciertos casos, el *receptor P2X₇* puede tener una secuencia aminoacídica que está modificada, por ejemplo pueden sustituirse o eliminarse diversos aminoácidos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o puede insertarse un residuo.

"Receptor P2X₇ funcional" hace referencia generalmente a una forma del receptor P2X₇ que tiene un sitio de unión o hendidura para unión a ATP. Cuando se une a ATP, el receptor forma una estructura de tipo poro que posibilita la entrada de iones de calcio en el citosol, una consecuencia de lo cual puede ser la muerte celular programada. En la homeostasis normal, la expresión de receptores P2X₇ funcionales está generalmente limitada a células que experimentan muerte celular programada tales como timocitos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos y monocitos. Puede haber también alguna expresión de receptores P2X₇ funcionales en eritrocitos.

"Receptor P2X₇ no funcional" hace referencia generalmente a una forma de un receptor P2X₇ en que uno o más de los monómeros tienen una isomerización cis en la Pro210 (según la SEQ ID NO: 1). La isomerización puede surgir de cualquier evento molecular que conduzca a un mal plegamiento del monómero, incluyendo, por ejemplo, mutación de la secuencia primaria del monómero o procesamiento postraducciona anormal. Una consecuencia de la isomerización es que el receptor es incapaz de unirse a ATP. En esas circunstancias, el receptor no puede formar un poro y esto limita la extensión en que los iones de calcio pueden entrar en el citosol. Los receptores P2X₇ no funcionales se expresan en un amplio intervalo de cánceres epiteliales y hematopoyéticos.

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

"Anticuerpos" o *"inmunoglobulinas"* o *"Ig"* son proteínas gammaglobulinas que se encuentran en la sangre u otros fluidos corporales de vertebrados que funcionan en el sistema inmunitario uniéndose a antígeno, identificando y neutralizando por ello objetos extraños.

Los anticuerpos son generalmente una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena L está ligada a una cadena H por un enlace disulfuro covalente. Las dos cadenas H están ligadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente.

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

Los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clase o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α, δ, γ, ε y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basadas en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H, p. ej. los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basados en las secuencias aminoacídicas de sus dominios constantes.

El dominio constante incluye la porción Fc, que comprende las porciones carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos, tales como ADCC, se determinan por secuencias en la región Fc, siendo esta región también la parte reconocida por los receptores de Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

El apareamiento de una V_H y una V_L juntas forma una *"región variable"* o *"dominio variable"* que incluye los dominios aminotermiales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Puede hacerse referencia al dominio variable de la

cadena pesada como "VH". Puede hacerse referencia al dominio variable de la cadena ligera como "VL". El dominio V contiene un sitio de unión a antígeno que afecta a la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Las regiones V cubren aproximadamente 110 residuos de aminoácidos y consisten tramos relativamente invariantes llamados regiones marco (FR) (generalmente aproximadamente 4) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" (generalmente aproximadamente 3) que son cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Las FR adoptan en gran medida una configuración de lámina β y las regiones hipervariables forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β .

"Región hipervariable", "HVR" o "HV" hace referencia a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables, tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Se usan una serie de delimitaciones de región hipervariable y se engloban en la presente memoria. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).

Los residuos "marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de región hipervariable definidos en la presente memoria.

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

Un anticuerpo "íntegro" o "completo" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno así como una C_L y al menos los dominios constantes de cadena pesada C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (p. ej., dominios constantes de secuencia nativa humanos) o variantes de secuencia aminoacídica de los mismos.

"Estructuras relacionadas con anticuerpo completo" incluyen formas multimerizadas de anticuerpo completo.

"Fragmentos de anticuerpo completo que incluyen un dominio variable" incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos Fab consisten en una cadena L entera junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, concretamente tiene un solo sitio de unión a antígeno.

Un fragmento Fab' difiere de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxilo del dominio C_{H1} , incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación de la presente memoria para Fab' en que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

Un fragmento F(ab')₂ corresponde más o menos a dos fragmentos Fab ligados por disulfuro que tiene actividad de unión a antígeno divalente y sigue siendo capaz de reticular antígeno.

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

En una especie de Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera pueden ligarse covalentemente por un ligador peptídico flexible de tal modo que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la una especie de Fv bicatenaria. Por el plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos aminoacídicos para unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

"Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados formando una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido scFv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno.

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

"Diacuerpos" hace referencia a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos

comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Los fragmentos de anticuerpo pequeños se preparan construyendo fragmentos de sFv (véase el párrafo precedente) con ligadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de tal modo que se consiga el apareamiento intercatenario, pero no intracatenario, de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, concretamente un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno.

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

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

Un "*anticuerpo humano*" hace referencia a un anticuerpo que posee una secuencia aminoacídica que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha elaborado usando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos como se divulga en la presente memoria. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo colecciones de presentación en fago. Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han deshabilitado.

Las formas "*humanizadas*" de anticuerpos no humanos (p. ej. de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, perro, gato o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseada. En algunos casos, se reemplazan residuos de la región marco (FR) de inmunoglobulina humana por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá típicamente también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

"*Anticuerpo monoclonal*" hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, concretamente los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estado dirigidos a un único sitio antigénico o determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse no contaminados por otros anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante la metodología de hibridoma, o pueden elaborarse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, de animal eucariótico o planta. Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de colecciones de anticuerpo en fago.

Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen anticuerpos "quiméricos" en que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica a u homóloga de las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés de la presente memoria incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., monos catirrinos, simios, etc.) y secuencias de región constante humana.

La expresión "*anticuerpo anti-receptor P2X₇*" o "*anticuerpo que se une al receptor P2X₇*" hace referencia a un anticuerpo que es capaz de unirse al receptor P2X₇ con suficiente afinidad, de tal modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la orientación a receptor P2X₇, típicamente receptor P2X₇ no funcional. Preferiblemente, la extensión de la unión de un anticuerpo de receptor P2X₇ a una proteína receptora no relacionada es menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo al receptor P2X₇ medida, p. ej., por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertos casos, un anticuerpo que se une a un receptor P2X₇ tiene una constante de disociación (K_d) de < 1 uM, < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM o < 0,1 nM. Un anticuerpo anti-receptor P2X₇ no funcional es generalmente aquel que tiene algunas o todas estas características serológicas y que se une a receptores P2X₇ no funcionales, pero no a receptores P2X₇ funcionales.

Un anticuerpo "*madurado por afinidad*" es aquel con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan

como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esta alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la materia.

- 5 Un anticuerpo “*bloqueante*” o un anticuerpo “*antagonista*” es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un “*anticuerpo agonista*”, como se usa en la presente memoria, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

- 10 “*Afinidad de unión*” hace referencia generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (p. ej. un anticuerpo) y su copartícipe de unión (p. ej., un antígeno). Generalmente, “*afinidad de unión*” hace referencia a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (p.ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de la molécula X por su copartícipe Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la materia, incluyendo aquellos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen a antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen a antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Son conocidos en la materia una variedad de métodos de medida de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse con fines de la presente divulgación.

- 20 Como se usa en la presente memoria, las propiedades de los aminoácidos se definen en la siguiente tabla:

| Aminoácido | Código de 3 letras | Código de 1 letra | Propiedades |
|--------------|--------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Alanina | Ala | A | Alifático Hidrófobo Neutro |
| Arginina | Arg | R | Polar Hidrófilo Cargado (+) |
| Asparagina | Asn | N | Polar Hidrófilo Neutro |
| Aspartato | Asp | D | Polar Hidrófilo Cargado (-) |
| Cisteína | Cys | C | Polar Hidrófobo Neutro |
| Glutamina | Gln | Q | Polar Hidrófilo Neutro |
| Glutamato | Glu | E | Polar Hidrófilo Cargado (-) |
| Glicina | Gly | G | Alifático Neutro |
| Histidina | His | H | Aromático Polar Hidrófilo Cargado (+) |
| Isoleucina | Ile | I | Alifático Hidrófobo Neutro |
| Leucina | Leu | L | Alifático Hidrófobo Neutro |
| Lisina | Lys | K | Polar Hidrófilo Cargado (+) |
| Metionina | Met | M | Hidrófobo Neutro |
| Fenilalanina | Phe | F | Aromático Hidrófobo Neutro |
| Prolina | Pro | P | Hidrófobo Neutro |
| Serina | Ser | S | Polar Hidrófilo Neutro |
| Treonina | Thr | T | Polar Hidrófilo Neutro |
| Triptófano | Trp | W | Aromático Hidrófobo Neutro |
| Tirosina | Tyr | Y | Aromático Polar Hidrófobo |
| Valina | Val | V | Alifático Hidrófobo Neutro |

Los inventores han determinado las secuencias de CDR de una serie de clones de dominio variable que han

encontrado que se unen a receptor P2X₇ no funcional. Estas secuencias de CDR se muestran en la Tabla 1a siguiente.

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

5

Tabla 1a: Secuencias de CDR

| <u>CDR1</u> | <u>CDR2</u> | <u>CDR3</u> |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 5) | SASFRYS (SEQ ID NO: 6) | (cargado/polar/aromático)(cargado/aromático) XXX(Y/aromático/alifático)(cargado/neutro)(neutro/alifático) |
| | | N(Y/F)XXX(Y/F)EX |
| | | N(Y/F)(neutro)(cargado)(neutro)Y(Y/F)E(neutro) |
| | | NFLESYFEA (SEQ ID NO: 7) |
| | | N(Y/F)(cargado)(neutro)(cargado)Y(Y/F)E(neutro) |
| | | NYRGDYYET (SEQ ID NO: 8) |
| | | H(aromático)XXXYYNI |
| | | H(Y/F)(neutro)(cargado)(neutro)YYNI |
| | | H(Y/F)(neutro)(cargado)(cargado)YYNI |
| | | HYSKEYYNI (SEQ ID NO: 9) |
| | | HFQRGYYNI (SEQ ID NO: 10) |
| | | (Y/N)(aromático)XXXYY(cargado)(neutro) |
| | | (Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYDV |
| | | (Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYEV |
| | | YFPLVYYDV (SEQ ID NO: 11) |
| | | NYLPMYYEV (SEQ ID NO: 12) |
| | | Y(cargado)XXX(Y/neutro)(neutro)(neutro) |
| | | NFKLMYYNV (SEQ ID NO: 13) |
| | | (cargado/polar/aromático)(aromático)(cargado/neutro) (cargado)(cargado/neutro)Y(aromático)(cargado)(neutro) |
| | | (cargado/polar/aromático)(F/Y)(cargado/neutro)(R/K) (cargado/neutro)(Y)(Y/F)(E/D)V |
| | | (H/N)(F/Y)(S/D)(R/K)(G/K)Y(Y/F)DV |
| | | HFSRGYYDV (SEQ ID NO: 14) |
| | | HYIKVYYEA (SEQ ID NO: 15) |
| | | HYSSRFFEY (SEQ ID NO: 16) |

| | | |
|------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | NFRVMFFKA (SEQ ID NO: 17) |
| | | HYSSRFFEY (SEQ ID NO: 18) |
| | | YHVIQYLGP (SEQ ID NO: 19) |
| | | DFTVPFYNA (SEQ ID NO: 20) |
| | | NYDKKYFDV (SEQ ID NO: 21) |
| | | YFPLVYYDV (SEQ ID NO: 22) |
| | | HYSSRFFDV (SEQ ID NO: 34) |
| SYYMS (SEQ ID NO: 23) | AINSNNGG STYYPDT VKG (SEQ ID NO: 24) | (cargado/polar/aromático)(cargado/aromático)XXX (aromático/alifático)(cargado/neutro)(neutro/alifático) |
| | | N(Y/F)XXX(Y/F)EX |
| | | N(Y/F)(neutro)(cargado)(neutro)Y(Y/F)E(neutro) |
| | | NFLESYFEA |
| | | N(Y/F)(cargado)(neutro)(cargado)Y(Y/F)E(neutro) |
| | | NYRGDYYET |
| | | H(aromático)XXXYYNI |
| | | H(Y/F)(neutro)(cargado)(neutro)YYNI |
| | | H(Y/F)(neutro)(cargado)(cargado)YYNI |
| | | HYSKEYYNI |
| | | HFQRGYYNI |
| | | (Y/N)(aromático)XXXYY(cargado)(neutro) |
| | | (Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYDV |
| | | (Y/N)(aromático)(neutro)(neutro)(neutro)YYEV |
| | | YFPLVYYDV |
| | | NYLPMYYEV |
| | | Y(cargado)XXXYY(neutro)(neutro)(neutro) |
| | | YHVIQYLGP |
| | | NFKLMYYNV |
| | | (cargado/polar/aromático)(aromático)(cargado/neutro) (cargado)(cargado/neutro)Y(aromático)(cargado)(neutro) |
| | | (cargado/polar/aromático)(F/Y)(cargado/neutro)(R/K) (cargado/neutro)(Y)(Y/F)(E/D)V |
| | | (H/N)(F/Y)(S/D)(R/K)(G/K)Y(Y/F)DV |
| | | HFSRGYYDV |

| | | |
|--|--|-------------------|
| | | HYIKVYYEA |
| | | HYSSRFFEY' |
| | | NFRVMFFKA |
| | | HYSSRFFEY |
| | | DFTVPFYNA |
| | | NYDKKYFDV' |
| | | YFPLVYYDV |
| | | HYSSRFFDV |

Tabla 1b

| Sitio de unión a antígeno | V _H | V _L | scFV |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2F6 (WT) | DVKLVESGGGLVKLG GSLKLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEKRLE LVAAINSNGGSTYYPD TVKGRFTISRDNANT LYLQMSSLKSEDTAFY YCTRHYSSRFFDVWG AGTTVTVSS (SEQ ID NO: 35) | MADIVMTQSQKFMSTSV GDRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLA EFFCQQYNSYPFTFGSG TRLEIK (SEQ ID NO: 36) | MADIVMTQSQKFM STSVGDRVSVTCK ASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRF TGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEFFCQ QYNSYPFTFGSGT RLEIKGGGGSGGG GSGGGGSDVKLV ESGGGLVKLGSL KLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEK RLELVAAAINSNGG STYYPDTVKGRFTI SRDNANTLYLQM SSLKSEDTAFYYC TRHYSSRFFDVW GAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 37) |

| | | | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Mutante n.º 18</p> | <p>DVKLVESGGGLVKLG GSLKLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEKRLE LVAAINSNGGSTYYPD TVKGRFTISRDNANT LYLQMSSLKSEDATFY YCTRHFSRGYYDVWG AGTTVTVSS (SEQ ID NO: 38)</p> | <p>MADIVMTQSQKFMSTSV GDRVSVTCKASQNVGTNI VAWYQQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLA EFFCQQYNSYPFTFGSG TRLEIK</p> | <p>MADIVMTQSQKFM STSVGDRVSVTCK ASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRF TGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEFFCQ QYNSYPFTFGSGT RLEIKGGGGSGGG GSGGGGSDVKLV ESGGGLVKLGSL KLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEK RLELVAAINSNGG STYYPDTVKGRFTI SRDNANTLYLQM SSLKSEDATFYCY TRHFSTRGYDVW GAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 39)</p> |
| <p>Mutante n.º 78</p> | <p>DVKLVESGGGLVKLG GSLKLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEKRLE LVAAINSNGGSTYYPD TVKGRFTISRDNANT LYLQMSSLKSEDATFY YCTRNYDKKYFDVWG AGTTVTVSS (SEQ ID NO: 40)</p> | <p>MADIVMTQSQKFMSTSV GDRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALIY SASFRYSGVPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLA EFFCQQYNSYPFTFGSG TRLEIK</p> | <p>MADIVMTQSQKFM STSVGDRVSVTCK ASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIY</p> |

| | | | |
|--|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | SASFRYSGVPDRF TGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEFFCQ QYNSYPFTFGSGT RLEIKGGGGSGGG GSGGGGSDVKLV ESGGGLVKLGSL KLSCAASGFTFSS YYMSWVRQTPEK RLELVAAINSNGG STYYPDTVKGRTI SRDNAKNTLYLQM SSLKSEDTAFYYC TRNYDKKYFDVW GAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 41) |
|--|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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

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

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

- 15 En otros casos, se proporciona un sitio de unión a antígeno o CDR y/o FR que tiene una secuencia como se describe anteriormente e incluyendo una o más mutaciones para aumentar la afinidad de dicho sitio por la unión a un anti-receptor $P2X_7$. La mutación puede dar como resultado una sustitución, inserción o delección de un residuo en una o más de CDR1, CDR2 o CDR3, o una o más de FR1, FR2, FR3 o FR4.

- En ciertos casos, los sitios de unión a antígeno de la divulgación y las moléculas que comprenden los mismos se unen a un epítipo que se expresa exclusivamente en receptores $P2X_7$ sin unión a ATP (también conocidos como "receptores no funcionales"). El epítipo y péptidos que lo forman se han encontrado útiles para generar anticuerpos monoclonales que se unen a receptores $P2X_7$ no funcionales expresados en células vivas.

- 20 La unión a células vivas es importante porque la expresión del receptor $P2X_7$ no funcional en o sobre células, siendo ejemplos células epiteliales, se cree que es un biomarcador de muchos cánceres tales como cánceres epiteliales y otras afecciones. Por consiguiente, con anticuerpos monoclonales que se unen a células vivas, se hace posible proporcionar productos terapéuticos sistémicos en forma del anticuerpo mismo o bien un conjugado de anticuerpo-agente citotóxico a un amplio intervalo de enfermedades caracterizadas por la expresión de receptores $P2X_7$ no funcionales.
- 25 También se hace posible proporcionar la formación de imágenes *in vivo* y el diagnóstico o monitorización de enfermedades caracterizadas por la expresión de receptores $P2X_7$ no funcionales.

El epítipo se encuentra solo en el receptor $P2X_7$, concretamente el trímero formado por monómeros de $P2X_7$. Más

particularmente, el epítipo cubre monómeros de P2X₇ adyacentes en el receptor P2X₇ trimérico. Los monómeros de P2X₇ individuales que están no alineados como en un receptor trimérico no funcional no contienen por lo tanto el epítipo. Esto permite ventajosamente estadificar tumores. Esto es más difícil de hacer con anticuerpos que se unen tanto a P2X₇ monomérico como al receptor trimérico.

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

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

- una segunda región en forma de una región de un segundo monómero del receptor;

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

y en la que la primera y segunda regiones se disponen adyacentes entre sí en el receptor, permitiendo así la unión de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti-P2X₇ a la primera y segunda regiones que forman el epítipo.

15 Típicamente, el epítipo es un epítipo conformacional. En estos casos, la primera y segunda regiones definen cada una un espacio molecular que incluye cada uno uno o más residuos de la SEQ ID NO: 1. Típicamente, la primera región es aquella que define un espacio molecular que incluye uno o más residuos de la SEQ ID NO: 1: que están expuestos para unión a un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de la isomerización en cis de Pro210 de un monómero que tiene una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. Estos residuos incluyen Gly 200, His 201, Asn 202, Tyr 203, Thr 204, Thr 205, Arg 206, Asn 207, Ile 208, Leu 209 y Pro210. En un caso, la primera región incluye al menos uno de estos residuos. Típicamente, la primera región incluye al menos 4 de estos residuos, aunque pueden ser menos, por ejemplo 2 o 3, dependiendo de cuántos residuos se presenten en la segunda región. 20 En un caso, la primera región incluye al menos 1 par de residuos mostrados en la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2

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

| | | | | | | | | |
|--|--|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | | Thr 204 | Thr 205 | Arg 206 | Asn 207 | Ile 208 | Leu 209 |
| | | | Tyr 203 | Tyr 203 | Tyr 203 | Tyr 203 | Tyr 203 | Tyr 203 |
| | | | | Thr 205 | Arg 206 | Asn 207 | Ile 208 | Leu 209 |
| | | | | Thr 204 | Thr 204 | Thr 204 | Thr 204 | Thr 204 |
| | | | | | Arg 206 | Asn 207 | Ile 208 | Leu 209 |
| | | | | | Thr 205 | Thr 205 | Thr 205 | Thr 205 |
| | | | | | | Asn 207 | Ile 208 | Leu 209 |
| | | | | | | Arg 206 | Arg 206 | Arg 206 |
| | | | | | | | Ile 208 | Leu 209 |
| | | | | | | | Asn 207 | Asn 207 |
| | | | | | | | | Leu 209 |
| | | | | | | | | Ile 208 |

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

La primera región puede contener adicionalmente uno o más residuos periféricos que están íntimamente implicados en la formación del sitio de unión a ATP en el mayor de los dos plegamientos de dominio extracelular. Estos son Lys 193, Phe 275 y Arg 294. Arg 125 está localizado en el menor de los dos plegamientos de dominio extracelular. Por tanto, en ciertos casos, la primera región incluye además uno o más de los siguientes residuos de SEQ ID NO: 1: Arg 125, Lys 193, Phe 275 y Arg 294. Se entenderá que la primera región no consiste en estos residuos solos. Es decir, la primera región, como se discute anteriormente, define un espacio molecular que incluye uno o más de los residuos de la SEQ ID NO: 1 que están expuestos para unión a un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de la isomerización en *cis* de la Pro210 de un monómero que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. En este contexto, los Arg 125, Lys 193, Phe 275 y Arg 294 se proporcionan solo además, pero no como alternativa a, por ejemplo uno o más de los residuos Gly 200, His 201, Asn 202, Tyr 203, Thr 204, Thr 205, Arg 206, Asn 207, Ile 208 y Leu 209.

Típicamente, la segunda región es aquella que define un espacio molecular que incluye uno o más de los residuos de SEQ ID NO: 1: que están expuestos para unión a un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo como consecuencia de la isomerización en *cis* de Pro210 de un monómero que tiene una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. Estos residuos incluyen Lys 297, Tyr 298, Tyr 299, Lys 300, Glu 301, Asn 302, Asn 303, Val 304, Glu 305 y Lys 306. En un caso, la segunda región incluye al menos uno de estos residuos. Típicamente, la segunda región incluye al menos 4 de estos residuos, aunque pueden ser menos, por ejemplo 2 o 3, dependiendo de cuántos residuos se presenten en

la primera región. En un caso, la segunda región incluye al menos 1 par de residuos mostrados en la Tabla 3 siguiente:

Tabla 3

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

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

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

En ciertos casos, el epítipo es o incluye un epítipo lineal. Los ejemplos incluyen cuando la primera región incluye una de las siguientes secuencias de la SEQ ID NO: 1 en la Tabla 4:

Tabla 4

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

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

Tabla 5

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

En ciertos casos, la primera región contiene más residuos que la segunda región.

En otros casos, la segunda región contiene más residuos que la primera región.

La primera región y la segunda región pueden contener cada una de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 residuos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos. Cuando hay más residuos en la segunda región, puede haber menos residuos en la primera región, concretamente menos de 4, por ejemplo 2 o 3. Lo mismo se aplica al contrario.

Como se describe en la presente memoria, la primera y segunda regiones se disponen adyacentes entre sí en el receptor permitiendo así la unión de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti-P2X₇ a la primera y segunda regiones que forman el epítipo. Con más detalle, los inventores han encontrado que, aunque localizadas en monómeros separados, la primera y segunda regiones en combinación forman un epítipo que puede unirse por un único sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Generalmente, la primera y segunda regiones del epítipo están espaciadas entre sí no más de aproximadamente 40 ángstromes. Si la distancia es mayor que esta, la afinidad de unión del anticuerpo tiende a disminuir ya que el sitio de unión a antígeno tiene que atravesar una distancia mayor entre los monómeros en el receptor, en cuyo caso se unen menos residuos. Generalmente, la primera y segunda

regiones están espaciadas entre así aproximadamente 10 ángstromes, aunque son posibles distancias mayores de 40 ángstromes, tales como 15, 20, 25, 30 o 35 ángstromes.

El epítipo descrito en la presente memoria puede proporcionarse en forma sustancialmente purificada o aislada, por ejemplo, como fragmento de un receptor P2X₇ de origen natural o como receptor P2X₇ sintético o recombinante.

5 Marks et al. (1992) BioTechnology 10:779, que describe la maduración por afinidad por transposición de dominios VH y VL; Barbas et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809; Schier et al. (1995) Gene 169: 147-155; Yelton et al. (1995) J. Immunol. 155: 1994; Jackson et al (1995), J. Immunol. 154(7): 3310 y Hawkins et al, (1992) J. Mol. Biol. 226: 889, que describen mutagénesis aleatoria de regiones hipervariables y/o residuos de marco, son ejemplos de procedimientos conocidos en la materia para maduración por afinidad de sitios de unión a antígeno. En ciertos casos, se mutageniza un ácido nucleico que codifica una o más secuencias mostradas en la Tabla 1a o b para crear una colección diversa de secuencias. La colección se criba entonces frente a una diana que incluye un epítipo de un receptor P2X₇ no funcional. Se muestra un método ejemplar en los Ejemplos de la presente memoria.

15 En otro caso, se proporciona un sitio de unión a antígeno como se describe anteriormente en el que una secuencia aminoacídica que forma una o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 deriva de una secuencia humana o está en forma de una secuencia humana.

El sitio de unión a antígeno puede presentarse en forma humanizada que incluye secuencias de inmunoglobulina no humanas (p. ej. de murino) y humanas. Típicamente, solo las secuencias de CDR del sitio de unión a antígeno son de una especie no humana tal como ratón, rata o conejo. En algunos casos, los residuos de marco del sitio de unión a antígeno pueden ser también no humanos. Cuando el sitio de unión a antígeno se proporciona en forma de un anticuerpo completo, típicamente al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc) es humana, permitiendo así diversas funciones efectoras humanas.

Los métodos para humanizar sitios de unión a antígeno no humanos son bien conocidos en la materia, incluyendo ejemplos de procesos adecuados aquellos en Jones et al., (1986) Nature. 321: 522; Riechmann et al., (1988) Nature, 332: 323; Verhoeyen et al., (1988) Science, 239: 1534.

25 Los métodos de presentación en fago descritos en la presente memoria que usan colecciones de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulinas humanas son útiles para generar sitios de unión a antígeno humano y anticuerpos humanos.

También pueden usarse mamíferos transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanos. Estos ratones pueden generarse por inserción aleatoria u orientada de los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana en citoblastos embrionarios. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera del hospedador pueden volverse no funcionales por la inserción o por algún otro evento de recombinación, por ejemplo, por delección homocigótica de la región JH del hospedador. Los citoblastos embrionarios transfectados se expanden y microinyectan en blastocitos produciendo ratones quiméricos que se crían entonces para producir descendencia homocigótica que expresa sitios de unión a antígeno humanos. Después de inmunización con un epítipo de P2X₇, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales humanos. Es un beneficio de los sistemas animales transgénicos que es posible producir isotipos terapéuticamente útiles debido a la redistribución de los transgenes de inmunoglobulina humana durante la diferenciación de linfocitos B y posteriormente experimentar cambio de clase y mutación somática en los ratones transgénicos.

40 Los dominios variables que incluyen CDR y FR de la divulgación pueden haberse hecho menos inmunogénicos reemplazando los residuos expuestos en la superficie para hacer que el anticuerpo aparezca como propio para el sistema inmunitario. Padlan, E: A., 1991, Mol. Immunol. 28, 489 proporciona un método ejemplar. Generalmente, se conserva la afinidad debido a que el empaquetamiento interno de los residuos de aminoácido en la vecindad del sitio de unión a antígeno permanece sin cambios y generalmente los residuos de CDR o residuos adyacentes que influyen en las características de unión no se van a sustituir en estos procesos.

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

Los fragmentos de anticuerpo de menor peso molecular, en comparación con los anticuerpos completos, pueden tener un acceso mejorado a tumores sólidos y un aclaramiento más rápido que puede ser particularmente útil en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vivo*.

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

En ciertos casos, se proporciona el sitio de unión a antígeno en forma de un fragmento Fv monocatenario (scFv). Fv y scFv son adecuados para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo* ya que tienen sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes. Pueden construirse proteínas de fusión que incluyen scFv procurando la fusión de una proteína efectora en cualquiera del extremo amino o carboxilo de un scFv. Preferiblemente, el scFv está en forma de un dominio V_H fusionado por un ligador con un dominio V_L. En un caso, el ligador es de al menos 15 aminoácidos de longitud. Típicamente, el ligador es de al menos 10 aminoácidos de longitud. En un caso, el ligador comprende generalmente residuos de glicina o serina. Típicamente, el ligador es **GGGSGGGSGGGSG**.

En un caso, el scFv tiene la secuencia:

**MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASFRY
SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFCQQYNSYPFTFGSGTRLEIKGGGSG
GGSGGGGSDVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFSSYYMSWVRQTPEKRLEL
VAAINSNGGSTYYPDTVKGRTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTRHYSSRFF
DWWGAGTTVTVSS**

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

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

Un polipéptido heterólogo puede fusionarse recombinantemente o conjugarse químicamente con un extremo N o C de un sitio de unión a antígeno o molécula que contiene el mismo de la divulgación.

El polipéptido heterólogo con el que el anticuerpo o sitio de unión a antígeno está fusionado puede ser útil para orientar a células que expresan el receptor P2X₇, o útil para alguna otra función tal como purificación o aumentar la vida media *in vivo* de los polipéptidos, o para uso en inmunoensayos que usan métodos conocidos en la materia.

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

**MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASFRY
SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFCQQYNSYPFTFGSGTRLEIKGGGSG
GGSGGGGSDVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFSSYYMSWVRQTPEKRLEL
VAAINSNGGSTYYPDTVKGRTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTRHYSSRFF
DWWGAGTTVTVSSAAADYKDDDDKAAAHHHHHH**

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

Los sitios de unión a antígeno de la divulgación pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, concretamente isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los sitios de unión a antígeno de la divulgación pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la materia. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos, así como en bibliografía de investigación. Pueden ocurrir modificaciones en cualquier lugar del sitio de unión a antígeno, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales aminoacídicas y los extremos amino o carboxilo, o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que puede estar presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o variables en

varios sitios en un sitio de unión a antígeno dado. También, un sitio de unión a antígeno dado puede contener muchos tipos de modificación. Un sitio de unión a antígeno puede ser ramificado, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los sitios de unión a antígeno cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales de postraducción o pueden elaborarse mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, enlace covalente de flavina, enlace covalente de un resto hemo, enlace covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, enlace covalente de un lípido o derivado de lípido, enlace covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia, tal como arginilación, y ubiquitinación.

En otro caso, se proporciona un conjugado en forma de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFsv, diacuerpo, triacuerpo o proteína de fusión como se describe anteriormente conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un marcaje tal como un isótopo radiactivo (concretamente, un radioconjugado). En otro aspecto, la divulgación proporciona además métodos de uso de los immunoconjugados. En un aspecto, un immunoconjugado comprende cualquiera de los dominios variables anteriores enlazados covalente con un agente citotóxico o un agente detectable.

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

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

Puede generarse un polinucleótido que codifica una CDR o FR según una cualquiera de las fórmulas generales descritas anteriormente, o un sitio de unión a antígeno que comprende el mismo, a partir de un ácido nucleico de cualquier fuente, por ejemplo, por síntesis química o aislamiento de una colección de ADNc o genómica. Por ejemplo, puede generarse una colección de ADNc a partir de una célula productora de anticuerpo tal como un linfocito B, célula plasmática o células de hibridoma y dirigirse el ácido nucleico relevante, aislado por amplificación por PCR usando oligonucleótidos, al clon particular de interés. Los ácidos nucleicos aislados pueden clonarse entonces en vectores usando cualquier método conocido en la materia. La secuencia nucleotídica relevante puede mutagenizarse entonces usando métodos conocidos en la materia, p. ej. técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar sitios de unión a antígeno que tienen diferente secuencia aminoacídica, por ejemplo para crear sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.

En otro caso, se proporciona un vector que incluye un ácido nucleico descrito anteriormente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. Puede insertarse la secuencia de ácido nucleico apropiada en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, se inserta ADN en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándares que son conocidas por el especialista en la materia.

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

Las secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del sitio de unión a antígeno de la divulgación pueden obtenerse usando técnicas recombinantes estándares como se describen anteriormente. Los polinucleótidos pueden sintetizarse usando técnicas de sintetizador de nucleótidos o PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar

polinucleótidos heterólogos en hospedadores procarióticos. Pueden usarse muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia con los fines de la presente divulgación, la selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y de la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogos, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en que reside.

En general, se usan en relación con estos hospedadores vectores de plásmido que contienen secuencias de replicón y control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora. Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que posibilita al vector replicar en una o más células hospedadoras seleccionadas, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322, que contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y proporciona por tanto un medio fácil para identificar células transformadas, es adecuado para la mayoría de bacterias gramnegativas, el origen de plásmido de 2 μ m es adecuado para levadura y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. pBR322, sus derivados u otros plásmidos o bacteriófagos microbianos pueden contener también, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas.

Además, pueden usarse vectores de fago que contienen secuencias de replicón y control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, puede utilizarse un bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 en la elaboración de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras sensibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la divulgación puede comprender dos o más pares de promotores-cistrones (siendo el cistron un segmento de ADN que contiene toda la información para la producción de un único polipéptido). Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en 5' de un cistron que modula su expresión. Los promotores procarióticos entran típicamente en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistron bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, p. ej., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Son bien conocidos un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede ligarse operativamente a ADN cistronico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzima de restricción e inserción de la secuencia promotora aislada en el vector de la divulgación. Pueden usarse tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos para amplificación directa y/o expresión de los genes diana. En algunos casos, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y rendimientos mayores del gen diana expresado en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo.

Son conocidos promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para uso con hospedadores procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o trc. Los promotores para uso en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente con el ADN que codifica un sitio de unión a antígeno de la divulgación. Sin embargo, son también adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, posibilitando así a un especialista en la materia ligar operativamente a ellos cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana usando ligadores y adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la divulgación, cada cistron en el vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada con el fin de esta divulgación debería ser una que sea reconocida y procesada (concretamente, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procarióticas que no reconocen ni procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, se sustituye la secuencia señal por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo consistente en secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En un caso de la divulgación, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de la misma.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la divulgación puede ocurrir en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción en cada cistron. A ese respecto, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan formando inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (p. ej., las cepas *E. coli* *trxB*) proporcionan condiciones citoplasmáticas que son favorables para la formación de enlace disulfuro, permitiendo así un plegamiento y ensamblaje apropiados de las subunidades de proteína expresadas.

La presente divulgación proporciona un sistema de expresión en que la relación cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de los sitios de unión a antígeno secretados y apropiadamente ensamblados de la divulgación. Tal modulación se logra al menos en parte por modulación simultánea de las fuerzas traduccionales para los componentes polipeptídicos.

- 5 En términos de expresión en células hospedadoras eucarióticas, los componentes vectoriales incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

- 10 Un vector para uso en una célula hospedadora eucariótica puede contener también una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que se reconoce y procesa (concretamente, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero, así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo la señal gD de herpes simple.

El ADN para tal región precursora está ligado en marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo

- 15 Generalmente, no es necesario un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, puede usarse típicamente el origen SV40 solo porque contiene el promotor temprano.

- 20 Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej. ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, p.ej. el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

- 25 Son un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero aquellos que posibilitan la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el sitio de unión a antígeno, tales como DHFR o timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc. Es una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre la estirpe celular CHO deficiente en actividad DHFR (p. ej., ATCC CRL-9096), preparada y propagada. Por
30 ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar por cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (MtX), un antagonista competitivo de DHFR. Como alternativa, pueden seleccionarse las células hospedadoras (particularmente hospedadoras de tipo silvestre que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) por
35 crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicósido, p. ej. kanamicina, neomicina o G418.

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor ligado operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de unión a antígeno para dirigir la síntesis de ARNm. Son bien conocidos promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales.

- 40 Los genes eucarióticos tienen generalmente una región rica en AT localizada aproximadamente a 25 a 30 pares de bases en 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Es otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases en 5' del inicio de transcripción de muchos genes una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucarióticos, está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poliA al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de
45 expresión eucarióticos.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, incluyendo enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

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

- 55 La transcripción del sitio de unión a antígeno de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus de polioma, virus de viruela aviar, adenovirus (tales como adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus,

virus de hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, p. ej. el promotor de actina o promotor de inmunoglobulina y de promotores de choque térmico, a condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas celulares hospedadores.

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

10 Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucarióticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un sitio de unión a antígeno.

15 En otro caso, se proporciona una célula que incluye un vector o ácido nucleico descrito anteriormente. La molécula de ácido nucleico o vector puede estar presente en la célula hospedadora u hospedador modificado genéticamente como molécula independiente fuera del genoma, preferiblemente como una molécula que es capaz de replicación, o puede integrarse establemente en el genoma de la célula hospedadora u hospedador.

20 La célula hospedadora de la presente divulgación puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica.

Son ejemplos de células procarióticas aquellas usadas generalmente para clonación como *E. coli* o *Bacillus subtilis*. Además, las células eucarióticas comprenden, por ejemplo, células fúngicas o animales.

Son ejemplos de células fúngicas adecuadas células de levadura, preferiblemente aquellas del género *Saccharomyces* y lo más preferiblemente aquellas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

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

30 Son obtenibles estirpes celulares adecuadas adicionales conocidas en la materia a partir de depósitos de estirpes celulares, como la American Type Culture Collection (ATCC).

35 En otro caso, se proporciona un animal que incluye una célula descrita anteriormente. En ciertos casos, los animales y tejidos de los mismos que contienen un transgén son útiles en la producción de los sitios de unión a antígeno de la divulgación. La introducción de las moléculas de ácido nucleico como transgenes en hospedadores no humanos y su posterior expresión pueden emplearse para la producción de sitios de unión a antígeno, por ejemplo, la expresión de tal transgén en la leche del animal transgénico proporciona medios de obtención de los sitios de unión a antígeno en cantidades cuantitativas. Los transgenes útiles a este respecto comprenden las moléculas de ácido nucleico de la divulgación, por ejemplo, secuencias de codificación de los sitios de unión a antígeno descritos en la presente memoria, ligados operativamente a estructuras promotoras y/o potenciadoras de un gen específico de glándula mamaria, como caseína o beta-lactoglobulina. El animal puede ser mamíferos no humanos, lo más preferiblemente ratones, ratas, ovejas, terneros, perros, monos o simios.

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

45 Son bien conocidos métodos de preparación y administración de sitios de unión a antígeno del mismo a un sujeto necesitado de ello o se determinan fácilmente por los especialistas en la materia. La vía de administración del sitio de unión a antígeno puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica.

50 El término parenteral como se usa en la presente memoria incluye, p. ej., administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal.

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

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. En la divulgación en cuestión, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferiblemente 0,05 M o solución salina al 0,8 %. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer y similares. Pueden estar presentes también conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

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

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

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (p. ej., sitio de unión a antígeno) en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados en la presente memoria, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, son métodos preferidos de preparación secado a vacío y liofilización, que procuran un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución esterilizada por filtración anteriormente del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se rellenan en envases tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales y se sellan en condiciones asépticas según métodos conocidos en la materia. Además, las preparaciones pueden empaquetarse y comercializarse en forma de un kit. Tales artículos de fabricación tendrán preferiblemente etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un sujeto que padece, o está predispuesto, a trastornos.

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

Para el tratamiento de ciertos trastornos con un sitio de unión a antígeno, la dosificación puede oscilar, p. ej., de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. Se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén también dentro del alcance de la divulgación. Pueden administrarse a los sujetos tales dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar conlleva la administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos 6 meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales conllevan la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más sitios de unión a antígeno con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada sitio de unión a antígeno administrado entra dentro de los intervalos indicados.

Un sitio de unión a antígeno divulgado en la presente memoria puede administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos pueden ser también irregulares como se indica por la medida de los niveles sanguíneos de polipéptido diana o molécula diana en el

paciente. En algunos métodos, se ajusta la dosificación para conseguir una concentración plasmática de polipéptido de 1-1000 ug/ml y en algunos métodos de 25-300 ug/ml. Como alternativa, los sitios de unión a antígeno pueden administrarse como una formulación de liberación mantenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del sitio de unión a antígeno en el paciente.

5 La vida media de un sitio de unión a antígeno puede prolongarse también mediante fusión con un polipéptido o resto estable, p. ej. albúmina o PEG. En general, los anticuerpos humanizados muestran la vida media más larga, seguidos por los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. En un caso, el sitio de unión a antígeno de la divulgación puede administrarse en forma no conjugada. En otro caso, los sitios de unión a antígeno para uso en los métodos divulgados en la presente memoria pueden administrarse múltiples veces en forma conjugada. En aun otro caso, los

10 sitios de unión a antígeno de la divulgación pueden administrarse en forma no conjugada y entonces en forma conjugada, o viceversa.

La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que comprenden anticuerpos o un cóctel de los mismos a un paciente ya no en el estado patológico o en un estado prepatológico para potenciar la resistencia del

15 paciente. Tal cantidad se define como una "dosis profiláctica eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero generalmente oscilan de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, se requiere a veces una dosificación relativamente alta (p. ej., de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de molécula de unión, p. ej. sitio de unión a antígeno, por dosis, usándose más comúnmente dosificaciones de 5 a 25 mg para radioinmunoconjugados y dosis mayores para moléculas conjugadas de citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta reducir o terminar la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de enfermedad. Después de ello, puede

20 administrarse un régimen profiláctico.

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

Pueden administrarse agentes terapéuticos por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. En algunos métodos, se inyectan los agentes directamente en un tejido particular donde se han acumulado células receptoras de P2X₇ no funcional, por ejemplo, por inyección intracraneal. La inyección intramuscular o infusión intravenosa son preferidas para administración de anticuerpo. En algunos métodos, se inyectan anticuerpos

30 terapéuticos particulares directamente en el cráneo. En algunos métodos, se administran anticuerpos como una composición o dispositivo de liberación mantenida.

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

En otro caso, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo, Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión o conjugado como se describe anteriormente, un diluyente y opcionalmente un marcaje.

40

En ciertos casos, los sitios de unión a antígeno o moléculas que incluyen los mismos están marcados detectablemente. Pueden usarse muchos marcajes diferentes, incluyendo enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Se usan comúnmente fluorocromos (fluoresceína, rodamina, rojo Tejas, etc.), enzimas (peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, etc.), isótopos radiactivos ³²P o ¹²⁵I), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes o bioluminiscentes (dioxetanos, luminol o acridinios).

45

Los métodos de detección dependen del tipo de marcaje usado e incluyen autorradiografía, microscopía de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas. Los ejemplos incluyen ensayos de recubrimiento de transferencia Western, RIA (radioinmunoensayo) e IRMA (ensayo inmunoradioinmunométrico), EIA (inmunoensayo enzimático), ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas), FIA (inmunoensayo fluorescente) y CLIA (inmunoensayo quimioluminiscente).

50

En otro caso, se proporciona un kit o artículo de fabricación que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se describe anteriormente.

55

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

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

- una etiqueta o prospecto con instrucciones de uso.

5 En ciertos casos, el kit puede albergar uno o más principios activos o ingredientes adicionales para el tratamiento de un cáncer o para la prevención de una complicación relacionada con cáncer descrita anteriormente, o una afección o enfermedad asociado con la expresión de receptor P2X₇ no funcional.

10 El kit o "artículo de fabricación" puede comprender un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, paquetes de blíster, etc. Los envases pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase alberga una composición terapéutica que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición terapéutica se usa para tratar la afección de elección. En un caso, la etiqueta o prospecto incluye instrucciones para uso e indica que la composición terapéutica puede usarse para tratar un cáncer o para prevenir una complicación surgida del cáncer.

15 El kit puede comprender (a) una composición terapéutica y (b) un segundo envase con un segundo principio activo o ingrediente albergado en el mismo. El kit en este caso de la divulgación puede comprender además un prospecto que indica que la composición terapéutica y el otro principio activo pueden usarse para tratar un trastorno o prevenir una complicación surgida del cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el kit puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyecciones (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

20 En ciertos casos, la composición terapéutica puede proporcionarse en forma de un dispositivo desechable o reutilizable que incluye un recipiente para albergar la composición terapéutica. En un caso, el dispositivo es una jeringa. El dispositivo puede albergar 1-2 ml de la composición terapéutica. La composición terapéutica puede proporcionarse en el dispositivo en un estado que está listo para usar o en un estado que requiere mezclado o adición de componentes adicionales.

25 En otro caso, se proporciona un kit o artículo de fabricación que incluye un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado o composición farmacéutica como se describe anteriormente.

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

30 - un envase que alberga una composición de diagnóstico en forma de uno o más de un sitio de unión a antígeno, dominio variable de inmunoglobulina, anticuerpo Fab, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, proteína de fusión, conjugado;

- una etiqueta o prospecto con instrucciones para uso.

35 El kit o "artículo de fabricación" puede comprender un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, paquetes en blíster, etc. Los envases pueden estar formados por una variedad de materiales tale como vidrio o plástico. El envase alberga una composición de diagnóstico que es eficaz para la detección del cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición de diagnóstico se usa para detectar la afección de elección. En un caso, la etiqueta o prospecto incluye instrucciones para uso e indica que la composición de diagnóstico puede usarse para detectar un cáncer o una enfermedad o afección caracterizada por la expresión de receptor P2X₇ no funcional.

40 El kit puede comprender (a) una composición de diagnóstico y (b) un segundo envase con un segundo agente de diagnóstico o segunda etiqueta contenido en el mismo. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, cargas, etc.

45 En otro caso, se proporciona un método para producir un sitio de unión a antígeno anti-P2X₇ como se describe anteriormente, que incluye expresar un ácido nucleico como se describe anteriormente en una célula o animal no humano como se describe anteriormente.

50 La producción de un sitio de unión a antígeno de la divulgación requiere generalmente un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el sitio de unión a antígeno de la divulgación. Puede obtenerse un polinucleótido que codifica un sitio de unión a antígeno de la divulgación y subclonarse en un vector para la producción de un sitio de unión a antígeno por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia, incluyendo

técnicas descritas en la presente memoria. Se contemplan muchos sistemas de expresión diferentes, incluyendo el uso de células de mamífero que incluyen células humanas para la producción y secreción de sitios de unión a antígeno. Los ejemplos de células incluyen 293F, CHO y la estirpe celular NSO.

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

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

20 Dependiendo del uso pretendido de la molécula de proteína, pueden seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión bacterianos. En un ejemplo, pueden usarse vectores que causan la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente, tales como el vector de expresión pUR278 de *E. coli*, donde se va a producir una gran cantidad de sitio de unión a antígeno. El producto de expresión puede producirse en forma de una proteína de fusión con lacZ. Pueden usarse también otros vectores bacterianos incluyendo vectores pIN y similares. Pueden usarse también vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). Estas proteínas de fusión son generalmente solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de afinidad de glutatión-agarosa seguidas de elución en presencia de glutatión libre. Puede proporcionarse un sitio de escisión de proteasa trombina y/o factor Xa en el polipéptido expresado de modo que el producto del gen diana clonado pueda liberarse del resto GST.

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

35 Pueden utilizarse sistemas de expresión basados en virus con células de mamífero tales como un adenovirus, con lo que la secuencia de codificación de interés puede estar ligada al promotor tardío adenovírico y la secuencia líder tripartita. Puede usarse entonces recombinación *in vitro* o *in vivo* para insertar este gen quimérico en el genoma adenovírico. Las inserciones en la región E1 o E3 darán como resultado un virus recombinante viable que es capaz de expresar el sitio de unión a antígeno en células hospedadoras infectadas. Pueden requerirse señales de iniciación específicas, incluyendo el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes, para una traducción eficaz de las secuencias de codificación de sitio de unión a antígeno insertadas. Pueden obtenerse señales y codones de inicio y control traduccional de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Pueden usarse elementos potenciadores de la transcripción y terminadores de la transcripción para potenciar la eficacia de expresión de un sistema basado en virus.

45 Cuando se requiere una producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Generalmente, se usa un gen marcador seleccionable con el que, después de transfección, se hacen crecer las células durante 1-2 días en medio enriquecido y se transfieren entonces a un medio que contiene un medio selectivo en que pueden cribarse las células que contienen el correspondiente marcador seleccionable, por ejemplo, resistencia a antibióticos. El resultado es que las células que han integrado establemente el plásmido en sus cromosomas crecen y forman focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse a estirpes celulares. Los genes de timidina cinasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa del virus del herpes simple son ejemplos de genes que pueden emplearse en células tk⁻, hgprt⁻ o aprT⁻, respectivamente, proporcionando así sistemas de selección apropiados. Los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato; *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico; *neo*, que confiere resistencia a aminoglicósido G-418 e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina, son ejemplos de genes que pueden usarse en sistemas de selección anti-metabolitos.

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

Pueden producirse grandes cantidades de sitios de unión a antígeno de la divulgación mediante un proceso escalable que empieza con un sistema de expresión piloto en un laboratorio de investigación que se aumenta de escala a un biorreactor de escala analítica (típicamente, biorreactores de 5 l a aproximadamente 50 l) o biorreactores de escala de producción (por ejemplo, pero sin limitación, de 75 l, 100 l, 150 l, 300 l o 500 l). Los procesos escalables deseados incluyen aquellos en los que hay niveles de bajos a indetectables de agregación medida por HPSEC o rCGE, típicamente no más de un 5 % de agregación en peso de proteína hasta no más de 0,5 % en peso de agregación de proteína. Adicionalmente o como alternativa, pueden desearse niveles indetectables de fragmentación medida en términos de área de pico total que representa el sitio de unión a antígeno intacto en un proceso escalable, de modo que al menos un 80 % y tanto como un 99,5 % o más del área de pico total represente sitio de unión a antígeno intacto. En otros casos, el proceso escalable de la divulgación produce sitios de unión a antígeno a una eficacia de producción de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 300 mg/l o superior.

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

Las enfermedades preneoplásicas y neoplásicas son ejemplos particulares a los que pueden aplicarse los métodos de la divulgación. Los ejemplos amplios incluyen tumores de mama, tumores colorrectales, adenocarcinomas, mesotelioma, tumores de vejiga, tumores de próstata, tumor de células germinales, hepatoma/colangiocarcinoma, tumores neuroendocrinos, neoplasma pituitario, tumor de células redondas y pequeñas, carcinoma espinocelular, melanoma, fibroxantoma atípico, seminomas, no seminomas, tumores estromales de células de Leydig, tumores de células de Sertoli, tumores cutáneos, tumores renales, tumores testiculares, tumores cerebrales, tumores de ovario, tumores de estómago, tumores bucales, tumores de vejiga, tumores óseos, tumor cervicales, tumores esofágicos, tumores laríngeos, tumores hepáticos, tumores pulmonares, tumores vaginales y tumor de Wilm.

Los ejemplos de cánceres particulares incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma, adenoma, adenofibroma, adenolinfoma, odontoma, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnoscénica, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, ameloblastoma, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfóide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, apudoma, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (cutáneas), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer intestinal, glioma del tallo cerebral, tumores de cerebro y SNC, cáncer de mama, branquioma, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer cervical, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma de linfocitos T cutáneos, carcinoma (p. ej., de Walker, de células basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumoral de Ehrlich, de Krebs 2, de células de Merkel, mucinoso, pulmonar no microcítico, de células en avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, espinocelular y de células transicionales), carcinosarcoma, displasia cervical, cistossarcoma filoides, cementoma, cordoma, coristoma, condrosarcoma, condroblastoma, craneofaringioma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistoadenocarcinoma, cistoadenoma, dermatofibrosarcoma protuberante, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, carcinoma ductal, disgerminoma, cánceres endocrinos, cáncer endométrico, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conductos biliares extrahepáticos, cáncer de ojo, melanoma, retinoblastoma, cáncer de trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibroma, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, tumores de células gigantes, ganglioneuroma, glioma, glomangioma, tumor de células granulosa, ginandroblastoma, malignidades hematológicas, tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, mola hidatidiforme, hipercalcemia, cáncer hipofaríngeo, hamartoma, hemangioendoteloma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, hemangiosarcoma, trastornos histiocíticos, histiocitosis maligna, histiocitoma, hepatoma, hidradenoma, hondrosarcoma, enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado, opoma, melanoma intraocular, cáncer de células de islote, sarcoma de Kaposi, cáncer renal, histiocitosis de células de Langerhan, cáncer laríngeo, leiomioma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer hepático, cáncer de pulmón, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leiomioma, leucemia (p. ej., de linfocitos B, de células mixtas, de linfocitos nulos, de linfocitos T, crónica de linfocitos T, asociada a HTLB-II, linfangiosarcoma, linfocítica aguda, linfocítica crónica, de mastocitos y mieloide), leucosarcoma, tumor de células de Leydig, liposarcoma, leiomioma, leiomioma, leiomioma, linfangioma, linfangiocitoma, linfagioma, linfangioma, linfangiosarcoma, cáncer de mama masculino, tumor renal rabdoide maligno, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, meduloblastoma, meningioma, melanoma, mesenquimoma, mesonefoma, mesotelioma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, mixoma, mixosarcoma, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nijmegen, cáncer cutáneo no melanoma, carcinoma pulmonar no microcítico (NSCL), neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibromatosis, neurofibroma,

neuroma, neoplasmas (p. ej., de hueso, mama, sistema digestivo, colorrectal e hígado), cánceres oculares, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad bucal, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma, ostomía, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de pituitaria, policitemia vera, cáncer de próstata, osteoma, osteosarcoma, carcinoma ovárico, papiloma, paraganglioma, paraganglioma no cromafín, pinealoma, plasmacitoma, protooncogén, cánceres raros y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, reticuloendoteliosis, rhabdomioma, cáncer de glándula salival, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, carcinoma pulmonar microcítico (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de médula espinal, carcinoma espinocelular (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, sarcoma (p. ej., sarcomas experimental de Ewing, de Kaposi y de mastocitos), tumor de células de Sertoli, sinovioma, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer tiroideo, cáncer de células transicionales (de vejiga), cáncer de células transicionales (renales de pelvis/uréter), cáncer trofoblástico, teratoma, tumor de células de teca, timoma, tumor trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Otras enfermedades y afecciones incluyen diversas afecciones inflamatorias. Los ejemplos pueden incluir un componente proliferativo. Los ejemplos particulares incluyen acné, angina, artritis, enfermedad de neumonía por aspiración, empiema, gastroenteritis, inflamación, gripe intestinal, NEE, enterocolitis necrosante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, PID, pleuresía, dolor de garganta, enrojecimiento, rubor, irritación de garganta, gripe estomacal e infecciones del tracto urinario, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

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

La cantidad de dosificación, frecuencia de dosificación, vías de administración, etc. se describen con detalle anteriormente.

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

Para diagnóstico *in situ*, puede administrarse el sitio de unión a antígeno al organismo para diagnosticar por inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial u otras vías de tal modo que pueda ocurrir una unión específica entre un sitio de unión a antígeno según la divulgación con una región epitópica del receptor P2X₇ no funcional. El complejo de anticuerpo/antígeno puede detectarse convenientemente mediante un marcaje enlazado con el sitio de unión a antígeno o fragmento funcional del mismo o cualquier otro método de detección conocido en la materia.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico según la divulgación y como se describen anteriormente se basan típicamente en antígenos marcados, anticuerpos o reactivos secundarios para detección. Estas proteínas o reactivos pueden marcarse con compuestos generalmente conocidos por los especialistas en la materia, incluyendo enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo, pero sin limitación, partículas coloreadas, tales como oro coloidal y perlas de látex. De estos, puede usarse el marcaje radiactivo para casi todos los tipos de ensayos y con muchas variaciones. Los marcajes conjugados a enzima son particularmente útiles cuando debe evitarse la radiactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren un equipo costoso para su uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

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

En ciertos casos, los inmunoensayos utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en el que el sitio de unión a antígeno se marca indirectamente por reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con un marcaje detectable. El segundo anticuerpo es preferiblemente uno que se une a anticuerpos del animal del que deriva el sitio de unión a antígeno. En otras palabras, si el sitio de unión a antígeno es un anticuerpo de ratón, entonces el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para el sitio de unión a antígeno para

usar en el ensayo descrito anteriormente, este marcaje es preferiblemente una perla recubierta con anticuerpo, particularmente una perla magnética. Para el sitio de unión a antígeno para emplear en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, el marcaje es preferiblemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

Puede emplearse también dentro del alcance de la presente divulgación un sistema de doble anticuerpo alternativo, al que se hace referencia a menudo como sistemas de formato rápido porque están adaptados para determinaciones rápidas de la presencia de un analito. El sistema requiere alta afinidad entre el sitio de unión a antígeno y el analito. Según un caso de la presente divulgación, se determina la presencia del receptor P2X₇ no funcional usando un par de sitios de unión a antígeno, cada uno específico de proteína receptora P2X₇. Se hace referencia a uno de dichos pares de sitios de unión a antígeno en la presente memoria como un "sitio de unión a antígeno detector", y se hace referencia al otro de dicho par de sitios de unión a antígeno en la presente memoria como "sitio de unión a antígeno de captura". El sitio de unión a antígeno de la presente divulgación puede usarse como sitio de unión a antígeno de captura o bien sitio de unión a antígeno detector. El sitio de unión a antígeno de la presente divulgación puede usarse también como sitio de unión a antígeno de captura o bien como detector, conjuntamente en un único ensayo. Un caso de la presente divulgación usa por tanto el método de emparedamiento de sitio de unión a antígeno doble para detectar receptor P2X₇ no funcional en una muestra de fluido biológico. En este método, se empareda el analito (proteína receptora P2X₇ no funcional) entre el sitio de unión a antígeno detector y el sitio de unión a antígeno de captura, estando irreversiblemente inmovilizado el sitio de unión a antígeno de captura sobre un soporte sólido. El sitio de unión a antígeno detector contendría un marcaje detectable para identificar la presencia del emparedado de sitio de unión a antígeno-analito y por tanto la presencia del analito.

Las sustancias en fase sólida ejemplares incluyen, pero sin limitación, placas de microvaloración, tubos de ensayo de poliestireno, perlas magnéticas, de plástico o vidrio y portaobjetos que son bien conocidos en el campo del radioinmunoensayo y el inmunoensayo enzimático. Los métodos para acoplar sitios de unión a antígeno a fases sólidas son también bien conocidos por los especialistas en la materia. Más recientemente, se han empleado una serie de materiales porosos tales como nailon, nitrocelulosa, celulosa acetato, fibras de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

Los ejemplos que siguen pretenden ilustrar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Generación y purificación del anticuerpo 2F6

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

Antecedentes: Los sitios de unión a antígeno que se unen a un monómero de receptor P2X₇ son conocidos, sin embargo, hasta la fecha no son conocidos anticuerpos que se unan específicamente a epítomos conformacionales en receptores P2X₇ expresados en células vivas en forma trimérica, específicamente que cubran la interfase entre monómeros adyacentes. Los sitios de unión a ATP se forman en la interfase empaquetada correctamente entre monómeros con los residuos 200-210 en un monómero y los residuos 296-306 en el monómero adyacente, expuestos cuando los receptores son incapaces de unirse a ATP, como ocurre en células cancerosas.

Materiales y métodos: Generación de péptidos E200 y E300. Se elaboró el epítipo peptídico complejo E200-300 formado parcialmente a partir de un péptido E200 (residuos 200-211 en la secuencia del receptor P2X₇ humano) y el péptido E300 (residuos 295-306 en la secuencia del receptor P2X₇ humano) espaciados con la adición del dipéptido GA mediante síntesis en fase sólida en Chiron Mimotopes. Se sintetizó un intervalo de conjugados para identificar aquellos más probablemente útiles con fines de cribado. Estos incluían los conjugados proteicos BSA, OT, ovalbúmina y KLH ligados con el residuo de Cys C-terminal en el péptido E200-300 a través de maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS). Una cuarta variante implicaba biotinilar el péptido E200-E300 en el extremo C.

Se inmunizaron ratones BALB-C con E200-300 conjugado con toxoide de difteria (E200-300DT) usando 25 ug/dosis los días 0, 16, 37, 56, 88 y 162. Se procuró la inyección del día 0 por vía subcutánea (sc) en coadyuvante CpG (ImmunoEasy, lotes n.º 11547836, 11235150 y 11549008, Qiagen). Las inyecciones de los días 16, 37 y 88 se procuraron mitad sc y mitad por vía intramuscular (im). Las inyecciones de los días 56 y 162 se procuraron por vía intravenosa (iv). Cuatro días después del refuerzo iv final, se extrajo sangre a los ratones inmunizados y se cribó en sus sueros la actividad de E200-E300 anti-P2X₇ por ELISA. Los tres animales que exhibían el título de E200-E300 anti-P2X₇ más alto se sacrificaron y sus retiraron sus bazos. Se aislaron las células de bazo y se fusionaron con células de la estirpe de células de mieloma de ratón Sp2/0 a una relación de 5:1. Se sembraron las células fusionadas en medio RPMI1640. Se seleccionaron los hibridomas sucesivamente en HAT seguido de HT suplementado con IL-6 de ratón. Se identificaron inicialmente los clones candidatos adecuados como positivos de ELISA en cribados tanto en fase sólida como en fase de solución. Se extrajeron los agentes de unión de baja afinidad y se secuenció entonces el ADN de los clones candidatos antes del silenciamiento inducido por los efectos del producto de anticuerpo clonal sobre la supervivencia de la célula hospedadora.

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

- 5 Se confirmó que cada subclón tenía una secuencia idéntica. Se extrajeron las cadenas V_H y V_L y se cortaron y empalmaron en una secuencia de IgG2a de ratón (Figuras 2 y 3) con el fin de desarrollo molecular adicional, mientras que se hizo crecer IgM en ascitis de ratón para caracterización adicional.

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

- 10 Se hizo crecer IgG2a-2F6 en células HEK293 parentales transfectadas con pcDNA3.1-mIgG2a-2F6 portador de resistencia a G418. Se seleccionaron las células en G418 durante 21 días para crear el agrupamiento resistente.

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

15

Tabla 6: Compendio del cultivo celular

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

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

20

Tabla 7: Compendio de la cromatografía de proteína A

| | Proceso | Resultado/Comentario |
|--------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Sobrenadante recolectado | Ajuste de pH a 7,1 con Tris 1 M, pH 8,3 | Se añadieron 10 ml pH de partida= 7,03 pH final= 7,08 |
| Equilibrado | ≥ 5 VC de 1x DBPS, pH ~7,4 | 6,8 VC |
| Carga | ≥ 1 min de tiempo de residencia | 10 ml/min (6,1 min de tiempo de residencia) |
| Lavado | ≥ 3 VC de 1x DPBS | 5,3 VC |
| Elución | ≥ 3 VC de ácido acético 0,1 M | 3,4 VC |
| Pico | Recogido manualmente | 35 ml |
| Neutralización | Acetato de sodio 1,0 M | 3,5 ml |

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

Tabla 8: Compendio de la cromatografía de intercambio aniónico

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

Se cargó directamente el flujo continuo de intercambio aniónico concentrado en una columna de desalado de 140 ml (GE Healthcare, Sephadex G-25 fina). Se limpió la columna y se higienizó con hidróxido de sodio 0,2 M antes de equilibrar en 1 x DPBS. El tampón de migración era 1 x DPBS.

Se filtró en una cámara de bioseguridad el producto desalado a través de un filtro de 0,2 µm en un envase estéril. Se retiraron asépticamente las muestras de producto finales del bruto filtrado. Se almacenaron el bruto filtrado y las muestras de producto finales a 4 °C.

Tabla 9: Compendio del intercambio de tampón

| | Proceso | Resultado/Comentario |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Equilibrado | 1x DBPS, pH ~7,4 (hasta meseta de conductividad y pH neutro) | Como el patrón |
| Carga | Máximo 28 l | 23 ml cargados |
| Pico | Recogido manualmente | 39,9 ml |
| Filtración | Filtro de 0,2 µm en cámara de bioseguridad | Millex GV, filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm, 33 mm |
| Producto final | Masa o volumen | 37,6 ml |

Se ensayaron en el producto final concentración de proteína, endotoxina, contenido de ADN, pureza y agregación. Se almacenó el producto a 4 °C antes del análisis.

Tabla 10: Compendio de resultados de ensayo para el producto final

| Prueba | Método de prueba | Especificación | Resultado | Pasa/falla |
|---------------------------|---------------------------------------|----------------|--------------|------------|
| Concentración de proteína | Absorbancia a 280 nm, CE= 1,4 | ≥ 1,0 mg/ml | 1,6 mg/ml | Pasa |
| ADN | Kit Quanti-iT de PicoGreen Invitrogen | ≤ 380 ng/ml | 15 ± 1 ng/ml | Pasa |

| | | | | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|------|
| Endotoxina | Charles River Endosafe PTS Cartucho de 0,05-5 UE/ml | < 3 UE/ml | 0,121 UE/ml (0,076 UE/mg) | Pasa |
| Agregación y pureza | SE-HPLC TOSOH Biosciences TSKgel G3000 SWX | ≤ 5 % de agregación ≥ 95 % de pureza | < 1 % de agregado >98 % de pureza (Figura 7) | Pasa |
| PAGE-SDS | Gel Nu-Page Bis- Tris al 4-13 % Tampón MOPS Tinción SimplyBlue Safe | Para información | (Figura 8) | N/A |

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

Conclusión: Se identificaron sitios de unión a antígeno en forma de secuencias líder para unión a alta afinidad a receptores P2X₇ en células vivas. Se seleccionaron los sitios de unión a antígeno para cubrir la interfase entre monómeros adyacentes que forman el receptor trimérico cuando se expone el sitio de unión a ATP subyacente en la conformación de receptor no funcional. El epítipo compuesto diana iba a permanecer inaccesible en la conformación única del receptor ensamblado capaz de función para evitar toda la reactividad cruzada con células normales que expresan el receptor P2X₇.

Ejemplo 2 – Caracterización bioquímica de formas del anticuerpo 2F6

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

Antecedentes: Es conocido que las células cancerosas expresan receptores no funcionales que consisten en un trímero de monómeros de receptor P2X₇. Cuando son capaces de funcionar, los receptores P2X₇ ensamblados sobre la superficie celular se unen a ATP con el efecto de que el canal formado entre los monómeros ensamblados en un trímero experimenta una transición a un poro más amplio capaz de aumentar en gran medida la entrada de iones de calcio en la célula para iniciar la actividad caspasa, conduciendo a apoptosis y muerte celular. La apoptosis se anula o inhibe en células cancerosas que son incapaces de morir aunque el receptor P2X₇ esté desplegado sobre la superficie celular. Estos receptores se denominan P2X₇ no funcionales y se han encontrado en una amplia variedad de cánceres.

Resultados: Las formas del anticuerpo 2F6, tanto IgM (Figuras 9a-d) como IgG2a (Figura 9e), inhibían el crecimiento celular en un intervalo de estirpes de células cancerosas incluyendo PC3 de próstata, COLO205 de colon, MDAMB231 de mama, A375 de melanoma y MCF7 de mama, como se determina en un ensayo de crecimiento celular Cell Titer Blue. Se sembraron las células a densidad apropiada y se hicieron crecer durante un periodo de 3 días o 5 días para alcanzar un nivel cercano a la confluencia al final del periodo de prueba en presencia de anticuerpos de control y en presencia de anticuerpos de prueba, de tipo IgM o bien IgG2a de 2F6 en el intervalo de concentración 0-40 ug/ml. Se realizó la prueba del crecimiento de la estirpe celular con densidades de siembra que oscilan de 100-2000 células/pocillo. En comparación con los anticuerpos de control que no tenían efecto sobre el crecimiento de los diversos tipos de células tumorales, una concentración creciente de cualquiera de los tipos IgM o IgG2a de 2F6 inhibía el crecimiento celular.

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

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

presencia de anticuerpo creciente, con 20-40 ug/ml suficiente para iniciar la actividad completa.

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

- 5 Conclusión: La interacción de las formas del anticuerpo 2F6, tanto IgM como IgG2a, con receptores P2X₇ no funcionales sobre células cancerosas causa la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis y muerte celular.

Ejemplo 3- Unión de anticuerpo a tejido tumoral vivo

- 10 **Objetivo:** Establecer si los anticuerpos dirigidos a un epítipo compuesto accesible único que cubre monómeros adyacentes en el trímero de P2X₇ expresado en superficies de células cancerosas son más capaces de unirse diferencialmente a la diana sobre la superficie de células cancerosas vivas en comparación con la diana residual en células cancerosas muertas.

- 15 **Antecedentes:** El anticuerpo 2F6 se une a monómeros adyacentes en receptores P2X₇ expresados en células cancerosas, pero no a receptores que se expresan en células normales que expresan receptores P2X₇ funcionales o capaces de función tales como aquellos en glóbulos blancos y rojos. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente a receptores P2X₇ no funcionales por orientación a un epítipo confinado a un monómero del receptor es también capaz de unirse a tales dianas monoméricas, que pueden liberarse del compartimento citoplasmático de células muertas, reduciendo así el potencial terapéutico al unirse parcialmente a receptores P2X₇ de células muertas además de a receptores P2X₇ de células vivas, necesitándose un aumento de la dosificación eficaz.

- 20 **Materiales y métodos:** Se trataron por vía intravenosa ratones Balb/C hembra inoculados con tumores mamarios de múrido 4T1 singénicos ortotópicos en su tercera almohadilla grasa mamaria, o ratones NOD/SCID hembra inoculados con el tumor de xenoinjerto Hep3b humano ortotópico en sus hígados, con un anticuerpo de dominio humano (2-2-1 hFc) dirigido a una diana monomérica (epítipo E200 en P2X₇) o bien 2F6-hlgG1 dirigido al epítipo compuesto E200-300. Todos los procedimientos se aprobaron por el Comité de ética animal de la Universidad de Adelaida (M46-2008).
- 25 Se midió la penetración del anticuerpo en los tumores usando anticuerpo de cabra anti-humano de Jackson Immunosearch en secciones tumorales que se retiraron de los ratones dos días después del tratamiento de anticuerpo. Se fijaron los tumores en formalina tamponada neutra al 10 % durante 48 horas, se embebieron en parafina, se seccionaron a 5 um, se desparafinaron y se tiñeron para anticuerpo humano. Se usó el sistema de detección secundario Biocare Mach 4, que comprende una sonda de anticuerpo de cabra específica seguido de un polímero con HRP y se tiñó entonces con DAB.
- 30

- 35 **Resultados:** Los anticuerpos que se orientan al sitio de unión a monómero E200 en el trímero se unen a células vivas en los tumores 4T1 (Figura 13a), aunque se unen de forma similar a células que están muertas y células moribundas con desechos celulares (Figura 13b). En el caso de tumores pulmonares de Lewis, la unión a células vivas (Figura 13c) parece moderada y membranosa, pero las células ya destruidas (Figura 13d) permanecen capaces de secuestrar tales anticuerpos (22-1hFc).

- 40 Se investigó en los mismos tipos tumorales la unión a células vivas y muertas residuales usando 2F6 hlgG1. La unión a células vivas en 4T1 mostraba un claro marcaje membranoso (Figura 14a) y, en contraposición con el agente de unión monomérico 2-2-1hFc, la unión de anticuerpo a la interfase entre monómeros estaba inhibida en gran medida por la unión a desechos celulares, aunque permanecía unido a células moribundas (Figura 14b). De forma similar, la unión a tumores pulmonares de Lewis mostraba una fuerte unión membranosa (Figura 14c). Las células moribundas tenían un marcaje de anticuerpo residual, pero los desechos celulares permanecían claros (Figura 14d). La figura muestra también glóbulos rojos que permanecen enteramente no marcados, si bien expresan receptores P2X₇, aunque en una conformación capaz de función que no expone el epítipo E200-300 al anticuerpo.

- 45 **Conclusión:** Se produjeron sitios de unión a antígeno tales que un anticuerpo dirigido contra la diana compleja que cubre la interfase intermonomérica tenía ventaja frente a anticuerpos confinados en un sitio de unión en el monómero, al que mucho menos del anticuerpo 2F6 se dirigía erróneamente por unión a desechos celulares creados por la muerte de células vivas, reduciendo así la dosis terapéutica requerida.

Ejemplo 4 – Eficacia terapéutica de 2F6 hlgG1

- 50 **Objetivo:** Se determinó la eficacia terapéutica de 2F6 hlgG1 en modelos tumorales de xenoinjerto de ratón y se comparó con un anticuerpo policlonal de oveja de alta afinidad creado para la misma diana y purificado por afinidad.

- 55 **Antecedentes:** Los anticuerpos dirigidos a la diana epitópica monomérica E200 en P2X₇ no funcionales expresados en células cancerosas tienen efectos terapéuticos exhibidos de destrucción de células tumorales e inhibición del crecimiento tumoral. Estos anticuerpos terapéuticos unidos en el intervalo subnanomolar exhiben una constante de unión dos órdenes de magnitud mayores que 2F6 hlgG1. Se desarrolló de forma similar un anticuerpo policlonal de oveja de alta afinidad contra el mismo epítipo E200-300 compuesto para examinar la eficacia probable de un anticuerpo en forma de 2F6 después de maduración por afinidad para mejorar la constante de unión.

Materiales y métodos:

Se obtuvieron los reactivos para el cultivo de células tumorales de mama ratón 4T1 de los siguientes suministradores: medio de cultivo celular RPMI1640, FCS, Glutamax, HBSS y penicilina/estreptomicina de Invitrogen Australia (Mt Waverley, VIC, Australia) y azul de tripano de Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia). Matrigel™ se obtuvo de BD Biosciences (North Ryde, NSW, Australia).

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

Los materiales para tinción con hematoxilina y eosina de secciones tumorales se obtuvieron de los siguientes suministradores: portaobjetos Superfrost Plus de Menzel (Alemania); alúmina con hematoxilina y eosina de HD Scientific (NSW, Australia); etanol, ácido hidroclicórico concentrado y carbonato de litio de Sigma Aldrich; medio de montaje DePex de BDH (RU).

Se extrajeron células tumorales de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EE. UU).

Se cultivaron células tumorales (pase 2 de la solución madre de trabajo) en medio de cultivo celular RPMI1640, suplementado con 10 % de FCS, 1 % de Glutamax y 1 % de penicilina-estreptomicina. Se recolectaron las células por tripsinación, se lavaron dos veces con HBSS y se contaron. Se resuspendieron entonces las células en HBSS:Matrigel™ (1:1, v/v) a una concentración final de 5×10^7 células/ml.

Se produjeron las dosificaciones cada 3 días a concentraciones de anticuerpo de 1 o 10 mg/kg i.v. o con PBS para control de tratamiento o sorafenib a 5 ml/kg diariamente como control positivo en el modelo pulmonar de Lewis. Se asignaron aleatoriamente los ratones a grupos iguales de 10 ratones, basándose en el volumen tumoral el día 0 de los estudios.

Se iba a retirar cualquier animal del estudio si su volumen tumoral alcanzaba 2.000 mm³. El tratamiento de cualquier animal cesaría si el peso corporal cayera por debajo del 85 % del de entrada en el estudio. Los animales se eliminarían también si se observara una reacción adversa grave al tratamiento.

Se anestesiaron los ratones para recogida de sangre y se sacrificaron por desangrado por hemorragia cardiaca terminal 48 horas después de la dosis final los días 11 o 14 después del tratamiento inicial.

Se recogió sangre completa por punción cardiaca de todos los ratones de todos los grupos a la terminación.

Se dejaron coagular las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido de 2 horas a 4 °C y se centrifugaron entonces (2000 x g) durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el componente sérico en crioviales recientes y se almacenó a -20 °C.

Se extirpó el tumor de todos los ratones de todos los grupos, se pesó y se conservó en formalina tamponada neutra al 10 %.

Se extirparon los pulmones de todos los ratones. Se contaron las metástasis de superficie pulmonar y se clasificaron según el tamaño: pequeñas (< 1 mm), medianas (≥ 1 mm y < 3 mm) y grandes (≥ 3 mm). Se conservaron los pulmones extirpados en formalina tamponada neutra al 10 %.

Se realizaron todos los cálculos estadísticos usando SigmaStat 3.0 (SPSS Australasia, North Sydney, NSW, Australia).

Se usó una prueba de t pareada para determinar la significancia del cambio de peso corporal en un grupo de tratamiento entre el día 0 y el día de medida final para el grupo. Solo aquellos ratones que sobrevivían hasta el día de terminación se incluyeron en el análisis.

Se realizó una prueba de t de pesos tumorales, tamaño de tumor histológico y recuentos de metástasis de pulmón e hígado en todos los animales.

Se realizó un análisis de varianza monofactorial (ANOVA) de pesos tumorales, tamaños de tumores histológicos y recuentos de metástasis hepáticas en todos los grupos que sobrevivían hasta los días de terminación de los estudios (día 14 para 4T1 y día 11 para pulmón de Lewis).

Cuando se encontraban diferencias significativas usando ANOVA monofactorial, se realizaron procedimientos de comparación múltiple frente al grupo de control (método de Holm-Sidak). Se usó el control preinmune (grupo 2) como grupo de control el día 9. Como los ratones en este grupo habían muerto, se usó el control de vehículo (grupo 1) como grupo de control el día 14. Aunque, en algunos casos, los datos fallaran la prueba de normalidad o prueba de varianzas iguales, se realizaron análisis estadísticos usando valores absolutos.

Un valor de p menor de 0,05 se consideraba significativo.

Resultados: Después de 14 días, se extirparon los pulmones de ratones 4T1 de los ratones Balb/C para medir el número de metástasis pulmonares. El grupo de control de 10 ratones tenían $6,4 \pm 1,0$, mientras que el grupo tratado con 2F6-hlgG1 mostraba $3,4 \pm 0,7$ o un 53 % del control como se muestra en la Figura 15. El volumen metastásico medio en los dos grupos se redujo adicionalmente de $5,77$ a $1,28 \text{ mm}^3$ o un 22 % y el volumen metastásico total se redujo en 88 % de 369 a 43 mm^3 o un 11,8 % del control.

Se usó el modelo de pulmón de Lewis singénico con grupos de control adicionales. Aparte del grupo de control de PBS de 10 ratones (grupo 1), se incluyó un grupo de control positivo que usaba sorafenib diario a 5 ml/kg (Grupo 5) junto con grupos de tratamiento de anticuerpo consistentes en anticuerpo policlonal E200-E300 de oveja purificado por afinidad a 10 mg/kg (Grupo 2), 2F6-hlgG1 a 1 mg/kg (grupo 3) y 2F6-hlgG1 a 10 mg/kg (Grupo 4). Los resultados obtenidos fueron:

| | Metástasis de superficie pulmonar medias | EEM |
|---------|------------------------------------------|-----|
| Grupo 1 | 2,3 | 0,4 |
| Grupo 2 | 0,1 | 0,1 |
| Grupo 3 | 0,9 | 0,2 |
| Grupo 4 | 0,2 | 0,1 |
| Grupo 5 | 0,1 | 0,1 |

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

Conclusión: El sitio de unión a epítipo intermonomérico complejo diana es accesible en células tumorales. Los anticuerpos con una Kd que oscila de $0,5 \text{ nM}$ (anticuerpo policlonal de oveja purificado por afinidad) a 50 nM (2F6-hlgG1) muestran una eficacia similar, sugiriendo que la constante de unión óptima para terapia humana está en el intervalo nM bajo.

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

Objetivo: Los experimentos aquí descritos eran para desarrollar formas de anticuerpo (concretamente scFv/Fab) que exhibieran constantes de unión aumentadas para mejorar tanto la unión específica a receptores P2X₇ no funcionales en células cancerosas sin receptores funcionales como en células normales tales como linfocitos, y obtener por tanto la inhibición del crecimiento de células cancerosas a una menor concentración de anticuerpo que la conseguida con el anticuerpo monoclonal recombinante 2F6.

Antecedentes: Las formas del anticuerpo 2F6 exhibían una unión específica a receptores P2X₇ en células cancerosas vivas, sin embargo, para uso como diagnóstico o terapia, un anticuerpo puede requerir afinidad mejorada.

Se usó la secuencia de CDR3 HYSSRFFDV de 2F6 como punto de partida para rondas iterativas de aleatorización y cribado porque se creyó la más probable que procurara secuencias líder de anticuerpo con afinidades aumentadas que podrían explorarse con fines de prueba en modelos de prueba terapéuticos.

Materiales y métodos: Se amplificaron los fragmentos génicos V_H y V_L de 2F6 y se ensamblaron en un vector de expresión/secreción de *E. coli*. Se transformaron tanto scFv como Fab de 2F6 en *E. coli* y se indujo la expresión del constructo génico. Se recolectaron los cultivos de *E. coli* 5 horas después de la inducción y se analizó en scFv y Fab la unión usando ELISA y Biacore contra antígeno E200-E300 inmovilizado.

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

Se introdujo mutagénesis en scFv de 2F6 mediante una combinación de PCR con tendencia al error, aleatorización NNK y variación de la longitud de secuencia de HCDR3. La colección mutada en el vector fagémido era del orden de 1×10^7 . El cribado en la colección de los mutantes de mayor afinidad empleaba una combinación de presentación en fago con ensayos de expresión de filtro usando antígeno E200-300 biotinilado. Una selección de clones de fago candidatos a scFv de mayor afinidad experimentó expresión a pequeña escala de fragmentos de anticuerpo solubles con afinidades medidas usando ELISA y Biacore.

Resultados: Las secuencias de HCDR3 de derivados de scFv/Fab obtenidos por maduración por afinidad que mostraban unión potenciada frente a 2F6 se muestran en la Figura 17:

Se muestran las afinidades de unión en ELISA y la tabla de compendio en la Figura 18. La IgM multivalente tiene una mayor CE_{50} que el formato de IgG para la diana epitópica. El Fab recombinante de 2F6 exhibe mucho menor unión (2 órdenes de magnitud) los candidatos madurados por afinidad.

Conclusión: Se produjeron sitios de unión a antígeno de múdo de tal modo que en un formato de Fab se mejoraba la afinidad relativa al anticuerpo monoclonal recombinante 2F6.

Ejemplo 6 – Caracterización bioquímica de Fab madurados por afinidad

Objetivo: Determinar si los Fab madurados por afinidad exhibían especificidad por receptores P2X₇ no funcionales expresados en células vivas.

Antecedentes: Las formas del anticuerpo 2F6 originales IgM e IgG2a solo se unían a receptores P2X₇ no funcionales expresados en células vivas con alta afinidad, no a receptores P2X₇ monoméricos ni receptores P2X₇ funcionales. Se realizaron experimentos para confirmar que esta especificidad no se perdía durante la maduración por afinidad.

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

Resultados: Los Fab se unían selectivamente a receptores no funcionales en células vivas COLO-205 (Figura 19a) y células PC3 (Figura 19b) con mayor afinidad que Fab WT de 2F6. Se observaron afinidades similares usando diversas preparaciones de formato 2F6 mlgG2a que muestran además afinidad potenciada frente a la secuencia WT (Figura 20). En contraposición, cuando se probaron estos mismos Fab purificados por afinidad recombinantes frente a linfocitos humanos que expresaban receptores P2X₇ funcionales, ocurría una unión despreciable. Se añadió un control de HLA positivo (Figura 21). En comparación con 2F6 mlgG2a WT, la unión a células PC3 por Flow usando el anticuerpo policlonal de oveja purificado por afinidad E200-300 mostraba mucha mayor unión (Figura 22), en línea con las mejoras esperadas por la maduración por afinidad.

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

Listado de secuencias

<110> Biosceptre (Aust) Pty Ltd

<120> Anticuerpos de receptores P2X₇ oligoméricos no funcionales

<130> P39112EP-D1-PCT

<150> AU2009906286

<151> 2009-12-24

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 595

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

ES 2 732 021 T3

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 021 T3

Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175
 Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190
 Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu

ES 2 732 021 T3

| | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-----------------|--|-----|
| | 405 | | 410 | | 415 |
| Leu Gly Arg Ser | Leu Gln Asp Val | Lys Gly Gln Glu Val | Pro Arg Pro | | |
| | 420 | 425 | 430 | | |
| Ala Met Asp Phe Thr Asp | Leu Ser Arg | Leu Pro Leu | Ala Leu His Asp | | |
| | 435 | 440 | 445 | | |
| Thr Pro Pro Ile Pro Gly | Gln Pro Glu Glu Ile | Gln Leu Leu Arg Lys | | | |
| | 450 | 455 | 460 | | |
| Glu Ala Thr Pro Arg Ser | Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys | Gln Cys Gly | | | |
| | 465 | 470 | 475 | | 480 |
| Ser Cys Leu Pro Ser | Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys | Leu Glu Glu | | | |
| | 485 | 490 | 495 | | |
| Leu Cys Cys Arg Lys Lys | Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr | Ser Glu Leu | | | |
| | 500 | 505 | 510 | | |
| Phe Arg Lys Leu Val Leu | Ser Arg His Val Leu Gln Phe | Leu Leu Leu | | | |
| | 515 | 520 | 525 | | |
| Tyr Gln Glu Pro Leu Leu | Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg | | | | |
| | 530 | 535 | 540 | | |
| Leu Arg His Cys Ala Tyr | Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser | | | | |
| | 545 | 550 | 555 | | 560 |
| Gln Asp Met Ala Asp Phe | Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg | | | | |
| | 565 | 570 | 575 | | |
| Ile Arg Lys Glu Phe Pro | Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys | | | | |
| | 580 | 585 | 590 | | |
| Ser Pro Tyr | | | | | |
| | 595 | | | | |

<210> 2

<211> 260

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 2

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

ES 2 732 021 T3

Thr Lys Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn
 20 25 30
 Gly Val Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr
 35 40 45
 Phe Pro Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys
 50 55 60
 Thr Glu Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg
 65 70 75 80
 Thr Leu Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro
 85 90 95
 Gln Ser Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn
 100 105 110
 Gln Lys Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu
 115 120 125
 Glu Ala Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val
 130 135 140
 Leu Ile Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg
 145 150 155 160
 Asn Ile Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln
 165 170 175
 Asn Pro Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr
 180 185 190
 Gly Asp Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile
 195 200 205
 Glu Ile Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg
 210 215 220
 Pro Lys Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser
 225 230 235 240
 Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn
 245 250 255
 Asn Val Glu Lys
 260

5

<210> 3
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 021 T3

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 262

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 021 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

His His His His His His
260

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

10 <220>
<223> péptido

<400> 5
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

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

20 <220>
<223> péptido

<400> 6
Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Ser
1 5

25 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> péptido

<400> 7
 Asn Phe Leu Glu Ser Tyr Phe Glu Ala
 1 5

5 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> péptido

<400> 8
 Asn Tyr Arg Gly Asp Tyr Tyr Glu Thr
 1 5

15 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> péptido

<400> 9
 His Tyr Ser Lys Glu Tyr Tyr Asn Ile
 1 5

25 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> péptido

<400> 10
 His Phe Gln Arg Gly Tyr Tyr Asn Ile
 1 5

35 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> péptido

45 <400> 11
 Tyr Phe Pro Leu Val Tyr Tyr Asp Val
 1 5

50 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> péptido

<400> 12
 Asn Tyr Leu Pro Met Tyr Tyr Glu Val
 1 5

60 <210> 13
 <211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 $\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ péptido

```
<400> 13
Asn Phe Lys Leu Met Tyr Tyr Asn Val
1          5
```

10 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> péptido

```
<400> 14
His Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Asp Val
1          5
```

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido

```
<400> 15
His Tyr Ile Lys Val Tyr Tyr Glu Ala
1          5
```

35 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido

40 <400> 16
 His Tyr Ser Ser Arg Phe Phe Glu Val
 1 5

45 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido

```
<400> 17
Asn Phe Arg Val Met Phe Phe Lys Ala
1          5
```

55 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> péptido

| | |
|----|----------------------------------------------------------------|
| | <400> 18 His Tyr Ser Ser Arg Phe Phe Glu Val 1 5 |
| 5 | <210> 19 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia Artificial |
| 10 | <220> <223> péptido |
| | <400> 19 Tyr His Val Ile Gln Tyr Leu Gly Pro 1 5 |
| 15 | <210> 20 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia Artificial |
| 20 | <220> <223> péptido |
| | <400> 20 Asp Phe Thr Val Pro Phe Tyr Asn Ala 1 5 |
| 25 | <210> 21 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia Artificial |
| 30 | <220> <223> péptido |
| | <400> 21 Asn Tyr Asp Lys Lys Tyr Phe Asp Val 1 5 |
| 35 | <210> 22 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia Artificial |
| 40 | <220> <223> péptido |
| 45 | <400> 22 Tyr Phe Pro Leu Val Tyr Tyr Asp Val 1 5 |
| 50 | <210> 23 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia Artificial |
| 55 | <220> <223> péptido |
| | <400> 23 Ser Tyr Tyr Met Ser 1 5 |
| 60 | <210> 24 <211> 17 |

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 24

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

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 25

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

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
20 25

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 26

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

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 28

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

5 <210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido

 <400> 29
 Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

 <220>
 <223> péptido

 20 <400> 30
 Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala
 1 5 10

 25 <210> 31
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido

 30 <400> 31
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

 35 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido

 40 <400> 32
 Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 45 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> péptido

 <400> 33
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

5 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido

 10 <400> 34
 His Tyr Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val
 1 5

 15 <210> 35
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> péptido

 <400> 35
 Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

 25 <210> 36
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> péptido

ES 2 732 021 T3

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 37

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

ES 2 732 021 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

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

<220>
<223> péptido

ES 2 732 021 T3

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 39

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

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

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

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

ES 2 732 021 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 40

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 40

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

ES 2 732 021 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5
<210> 41
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<223> péptido

<400> 41
Met Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 732 021 T3

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

REIVINDICACIONES

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

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

en la que:

FR1, FR2, FR3, FR4, FR1a, FR2a, FR3a y FR4a son cada una regiones marco;

CDR1, CDR2, CDR3, CDR1a, CDR2a, CDR3a son cada una regiones determinantes de la complementariedad;

en las que:

CDR1a tiene una secuencia aminoacídica de KASQNVGTNVA;

CDR2a tiene una secuencia aminoacídica de SASFRYS; y

CDR3a tiene una secuencia aminoacídica de QQYNSYPFT;

en las que:

CDR1 tiene una secuencia aminoacídica de SYYMS;

CDR2 tiene una secuencia aminoacídica de AINSNGGSTYYPDTVKG, y

CDR3 tiene una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo consistente en HYSSRFFDV, NYRGDYYET, NFLESYFEA, NYLPMYYEV, HYSSRFFEY, NFRVMFFKA, YHVIQYLGP e YFPLVYYDV.

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

i) HYSSRFFDV; o

ii) NYRGDYYET; o

iii) NFLESYFEA; o

iv) NYLPMYYEV; o

v) HYSSRFFEY; o

vi) NFRVMFFKA; o

vii) YHVIQYLGP; o

viii) YFPLVYYDV.

3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que FR1 tiene una secuencia aminoacídica de: DVKLVESGGGLV~~K~~LGSLKLSAASGFTFS.

4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que FR2 tiene una secuencia aminoacídica de: WVRQTPEKRLELVA.

5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que FR3 tiene una secuencia aminoacídica de: RFTISRDN~~A~~KNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTR.

6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que FR4 tiene una secuencia aminoacídica de: WGAGTTVTVSS.

7. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que

FR1a tiene una secuencia aminoacídica de MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC;

FR2a tiene una secuencia aminoacídica de WYQQKPGQSPKALIY;

FR3a tiene una secuencia aminoacídica de GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFC y

FR4a tiene una secuencia aminoacídica de **FGSGTRLEIK**.

8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 7, en el que el ligador tiene una secuencia aminoacídica de 15 residuos aminoacídicos.

5

9. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 8, en el que el ligador tiene una secuencia aminoacídica **GGGSGGGGSGGGGS**.

10. El anticuerpo o fragmento de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo consistente en un dominio variable de inmunoglobulina, Fab, Fab', F(ab')₂, dab, scFv, diacuerpo, triacuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo monocatenario, fragmento de anticuerpo multiespecífico o Fv.

10

11. Uso de un sitio de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o el diagnóstico de cáncer o una afección o enfermedad asociada con la expresión de receptor P2X₇ no funcional.

15

12. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en el tratamiento o el diagnóstico de cáncer o una afección o enfermedad asociada con la expresión de receptor P2X₇ no funcional.

13. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso según la reivindicación 12, o uso según la reivindicación 11, en los que el diagnóstico incluye la etapa de poner en contacto tejidos o células para los que se va a determinar la presencia o ausencia de cáncer con un reactivo en forma de un sitio de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y detectar la unión del reactivo con los tejidos o células

20

14. Un método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer o una enfermedad o afección asociada con la expresión del receptor P2X₇ no funcional, que incluye la etapa de poner en contacto tejidos o células para los que se va a determinar la presencia o ausencia de cáncer con un reactivo en forma de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y detectar la unión del reactivo con los tejidos o células.

Figura 1

SEQ ID NO: 1

```

1      MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFSY VCFALVSDKL YQRKEPVISS
61     VHTKVKGIAE VKEEIVENGV KKLVHSVFDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLRCP
121    EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181    LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD
241    NFSDVAIQGG IMGIEIYWDC NLDRAWFHHCR PKYSFRRLDD KTTNVSLYPG YNFRYAKYYK
301    ENNVEKRTLI KVFGRFDIL VFGTGGKFDI IQLVVYIGST LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS
361    NCCRSHIYPW CKCCQPCVVN EYYRKKCES IVEPKPTLKY VSFVDESHIR MVNQQLGRS
421    LQDVKGQEVV RPAMDFTDLS RLPLALHOTP PIPGQPEEIQ LLRKEATPRS RDSPVWCQCG
481    SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPGACITTS ELFRKLVLSR HVLQFLLLYQ EPLLALDVDS
541    TNSRLRHCAV RYATWRFGS QDMADFAILP SCCRWRIRKE FPKSEGQYSG FKSPY

```


Figura 2

SEQ ID NO: 2

```

1          SDKL YQRKEPVISS
61  VHTKVKGIAE VKEEIVENGV KKLVHSVFDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEORLCP
121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD
241 NFSDVAIQGG IMGIEIYWDC NLDRWFHHCN PKYSFRRLLD KTTNVSLLPG YNFRYAKYYK
301 ENNVEK

```

Figura 3

SEQ ID N: 3

```

1          VSDKL YQRKEPVISS
61  VHTKVKGIAE VKEEIVENGV KKLVHSVFDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQRLCP
121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA
181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD
241 NFSDVAIQGG IMGIEIYWDC NLDRAWFHHCR PKYSFRRLDD KTTNVSLYPG YNFRYAKYYK
301 ENNVEKRTLI KVFGRFDIL VFGTGGKFDI IQ

```

Figura 4

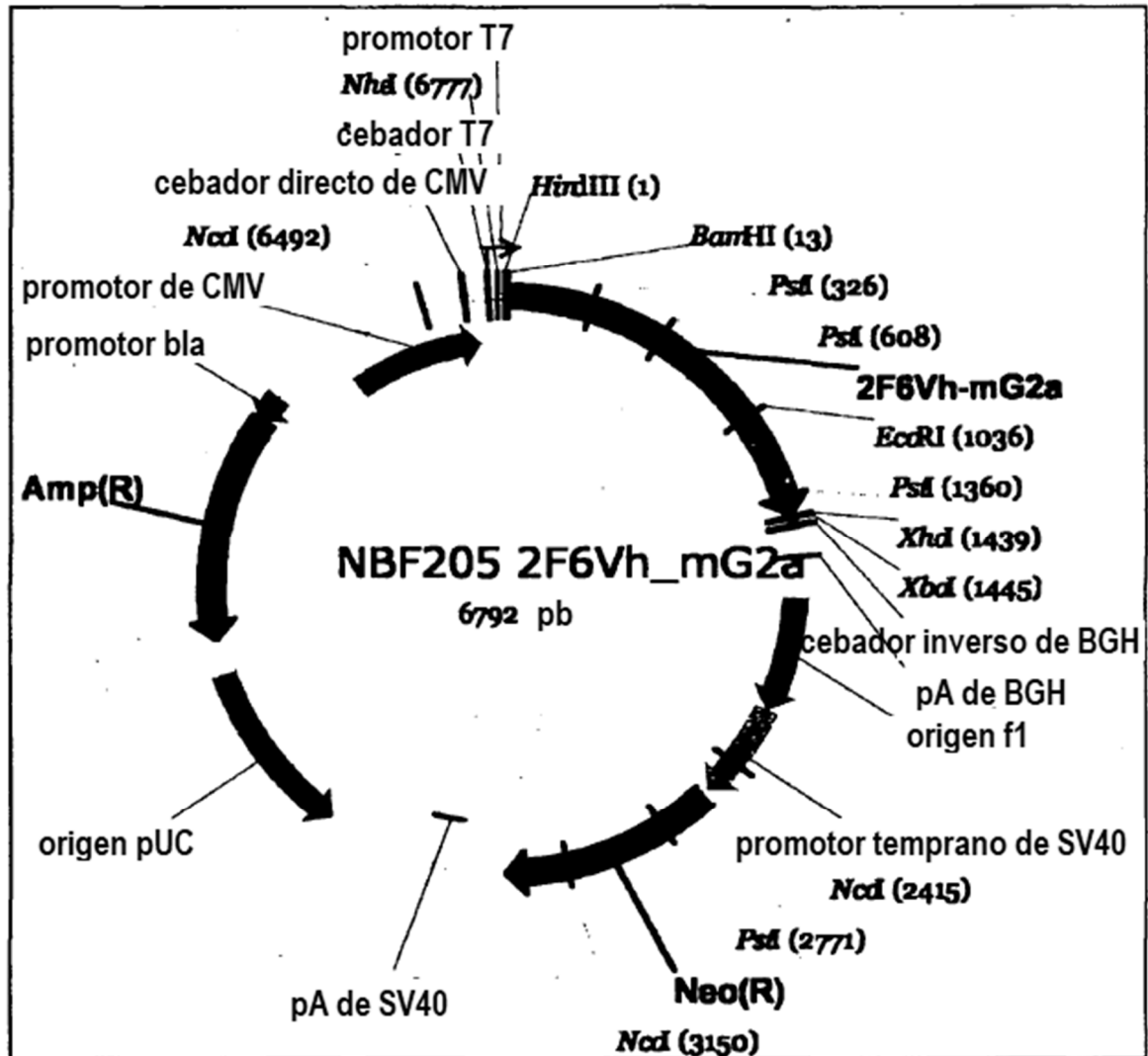


Figura 5

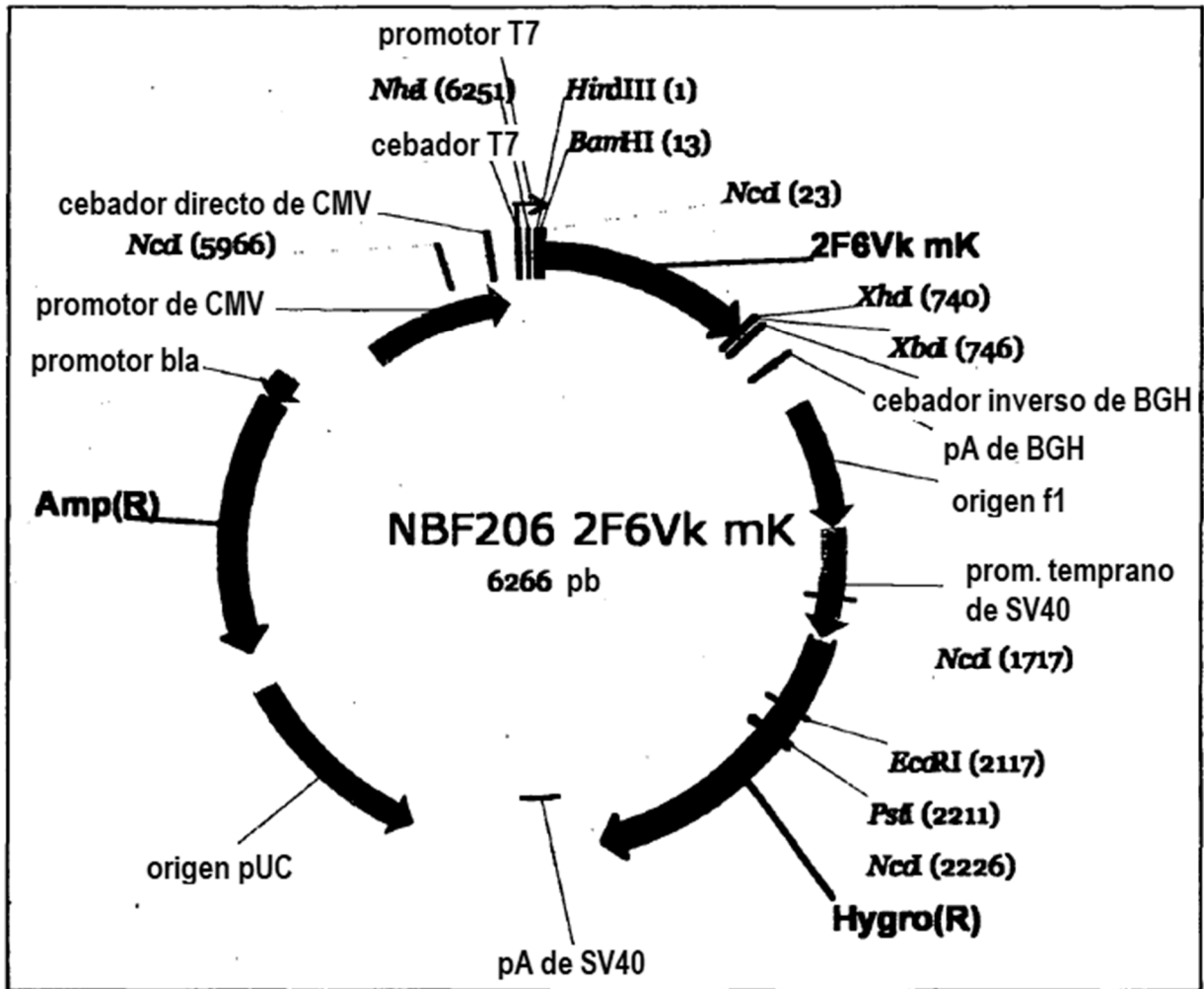


Figura 6

(a)

SEQ ID NO: 4

MADIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASFRY
SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEFFCQQYNSYPFTFGSGTRLEIKGGGGSG
GGGSGGGGSDVKLVESGGGLVKLGGSLKLSCAASGFTFSSYYMSWVRQTPEKRLEL
VAAINSNGGSTYYPDTVKGRTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAFYYCTRHYSSRFF
DWWGAGTTVTVSSAAADYKDDDDKAAAHHHHHH

(b)

2F6 IgG2a, #AIBN20090907

| | Nombre | Tiempo de retención | Área | % de área | Altura |
|---|--------|---------------------|--------|-----------|--------|
| 1 | Pico1 | 5.985 | | | |
| 2 | Pico2 | 8.473 | 823930 | 100.00 | 33247 |
| 3 | Pico3 | 8.933 | | | |

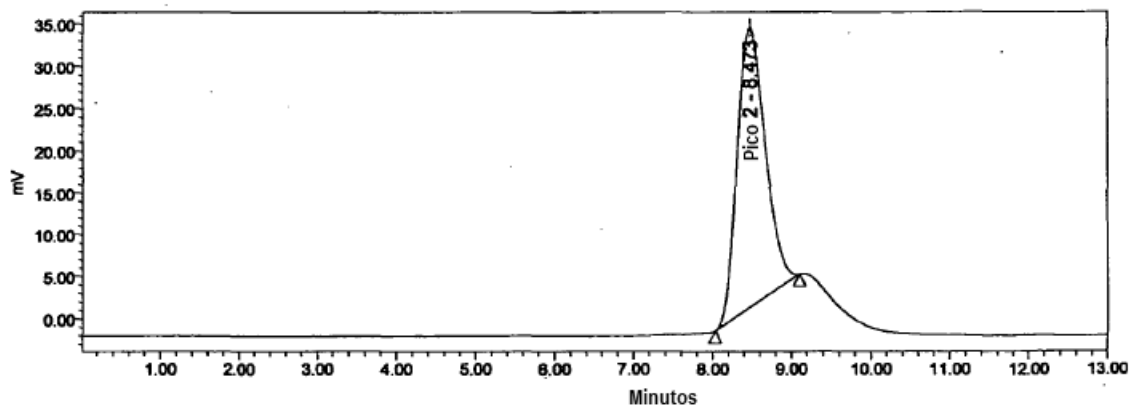


Figura 7

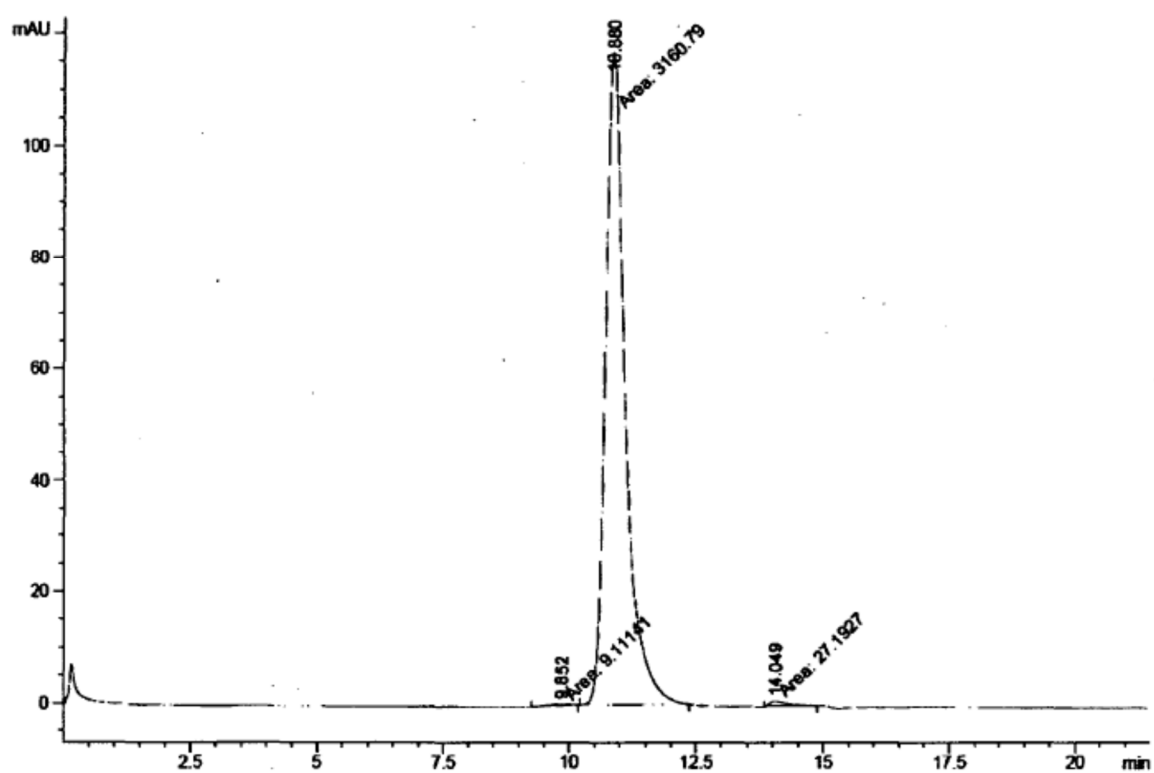
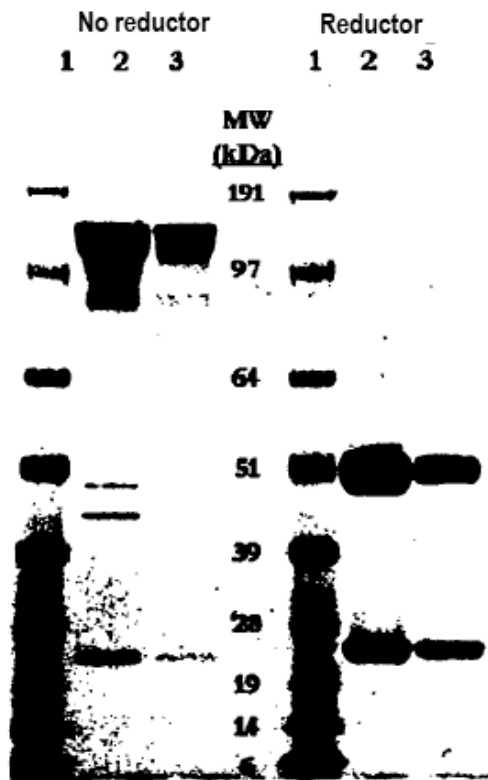


Figura 8



Carriles de PAGE-SDS:

1) Marcador de peso molecular
(marcador preteñido SeeBlue2 de
Invitrogen)

2) Producto final lote n.º 20090907

3) Producto final lote n.º 20090907 diluido 4 veces

Figura 9a

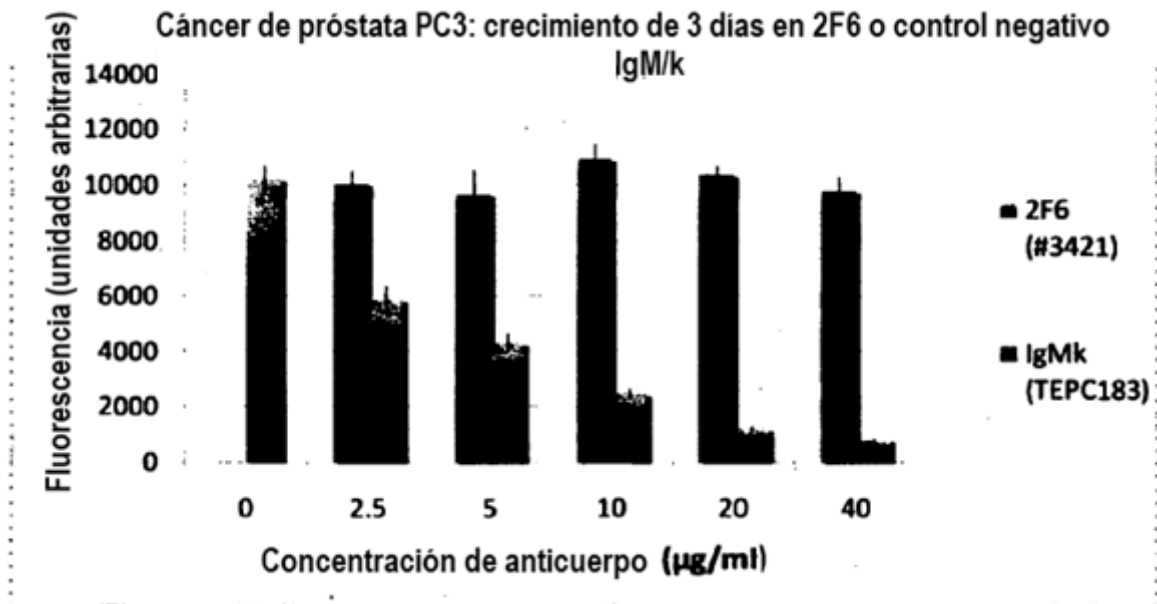


Figura 9b

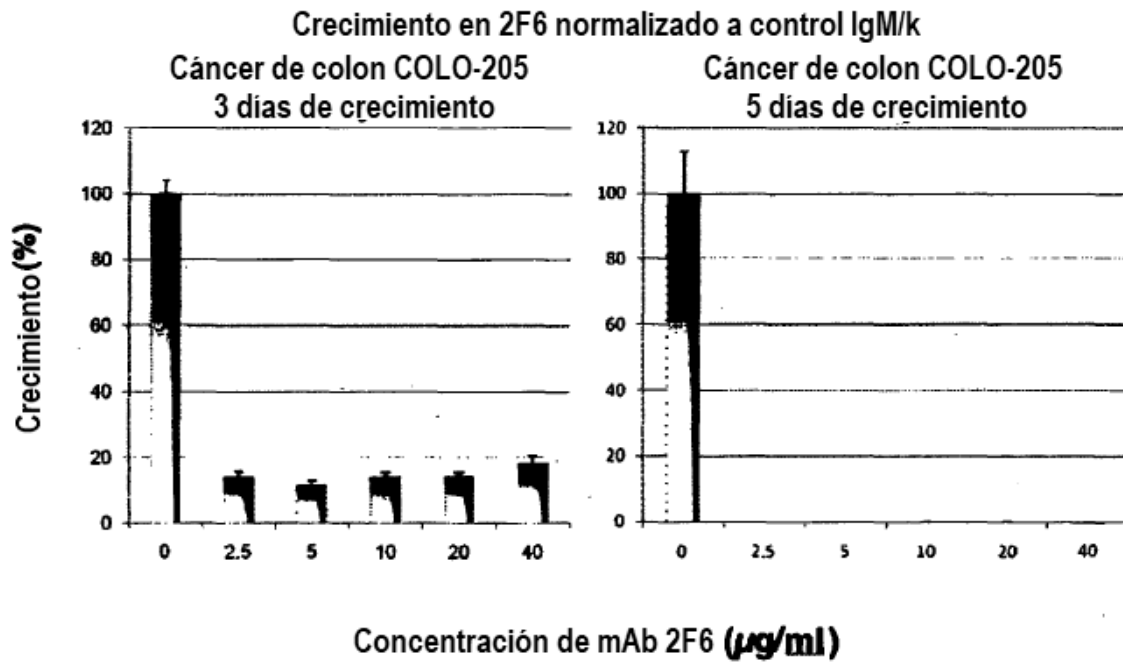


Figura 9c

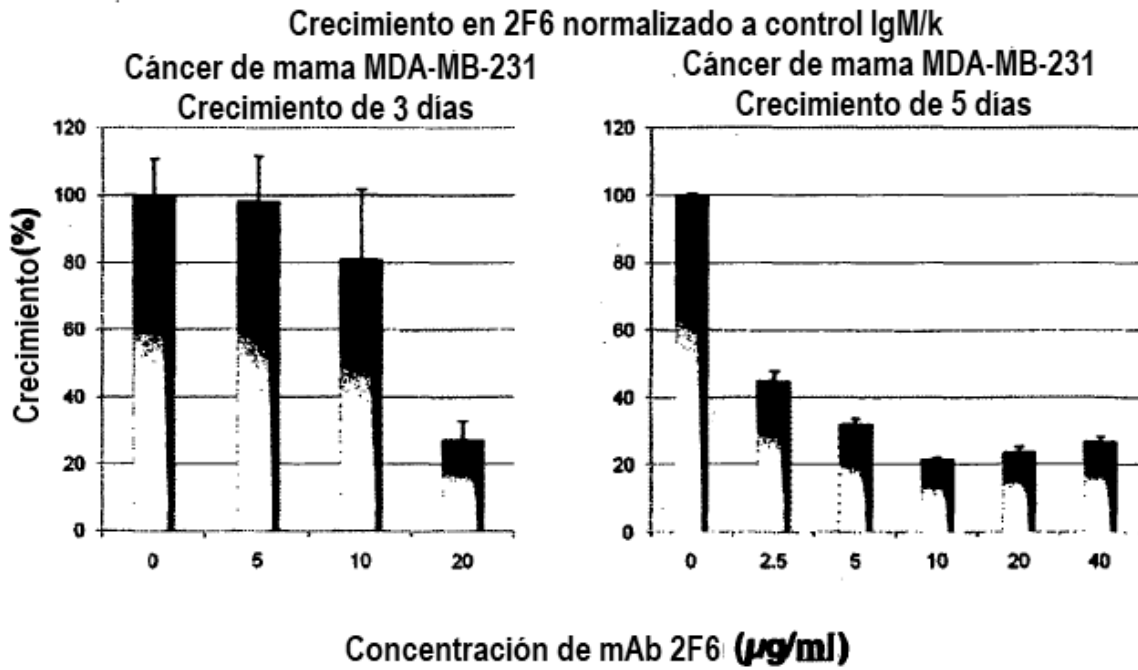


Figura 9d

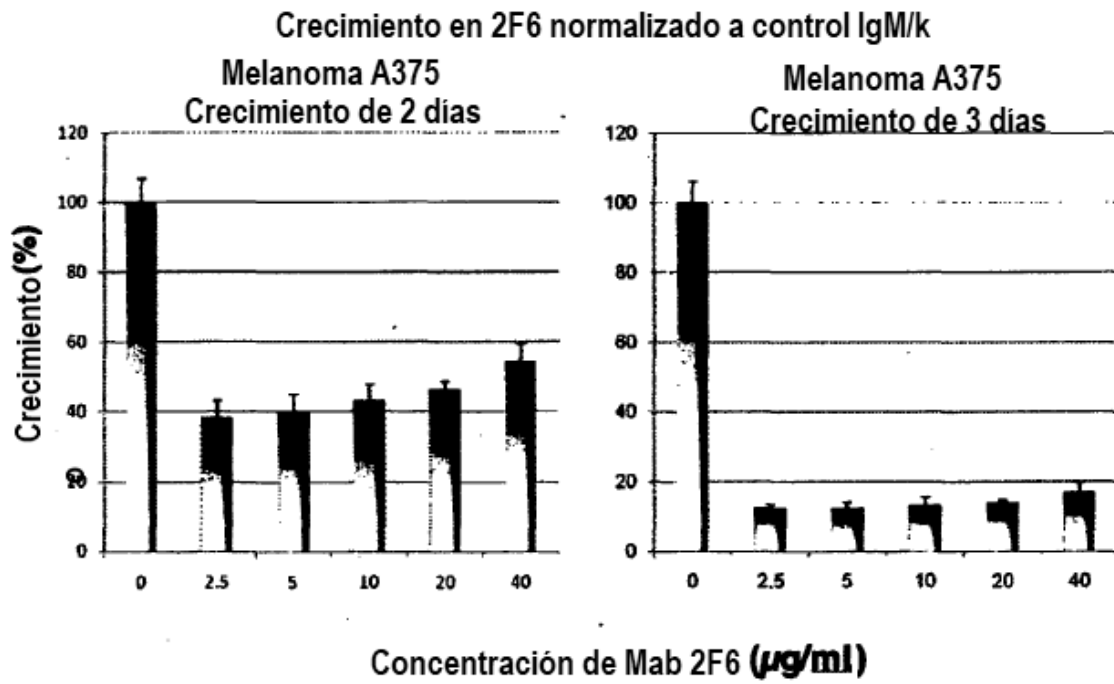


Figura 9e

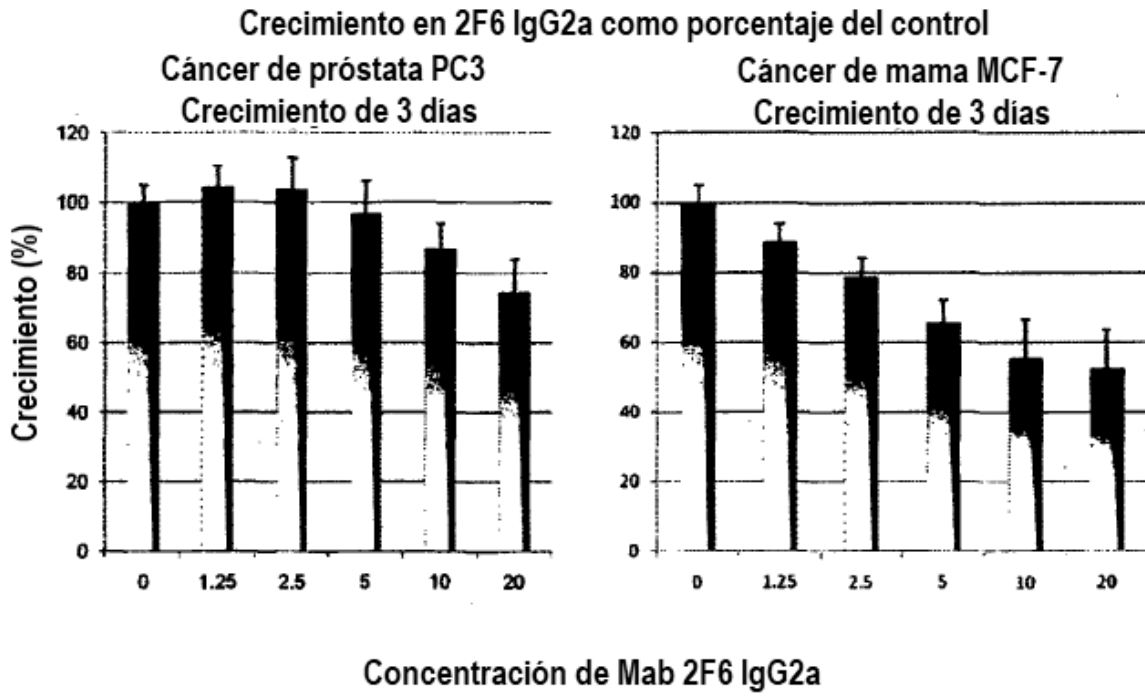
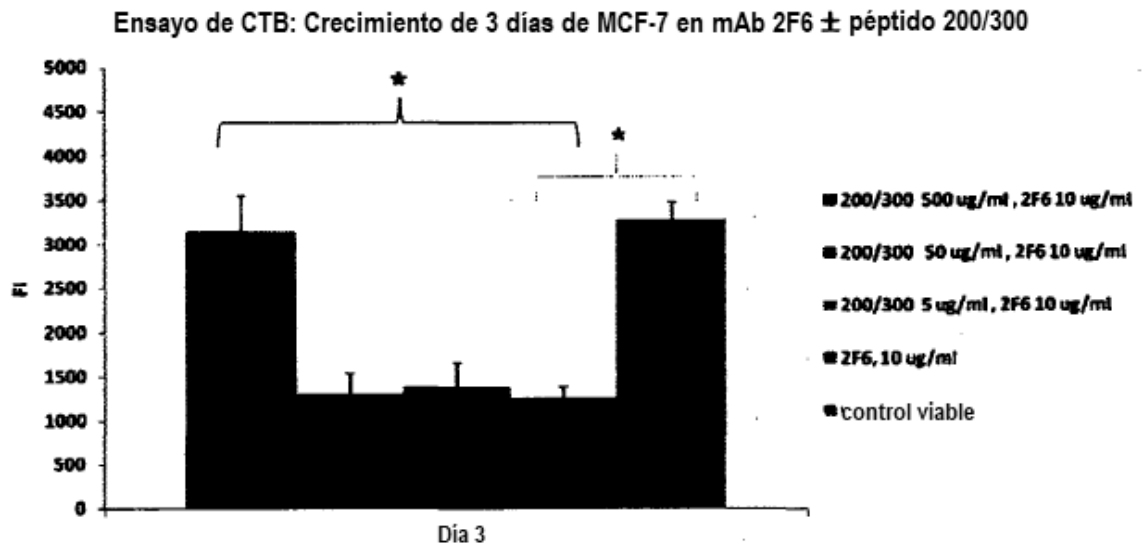


Figura 10



* Valores significativamente diferentes, prueba de t, factores= 2, tipo= 2, $P < 0,05$

Figura 11

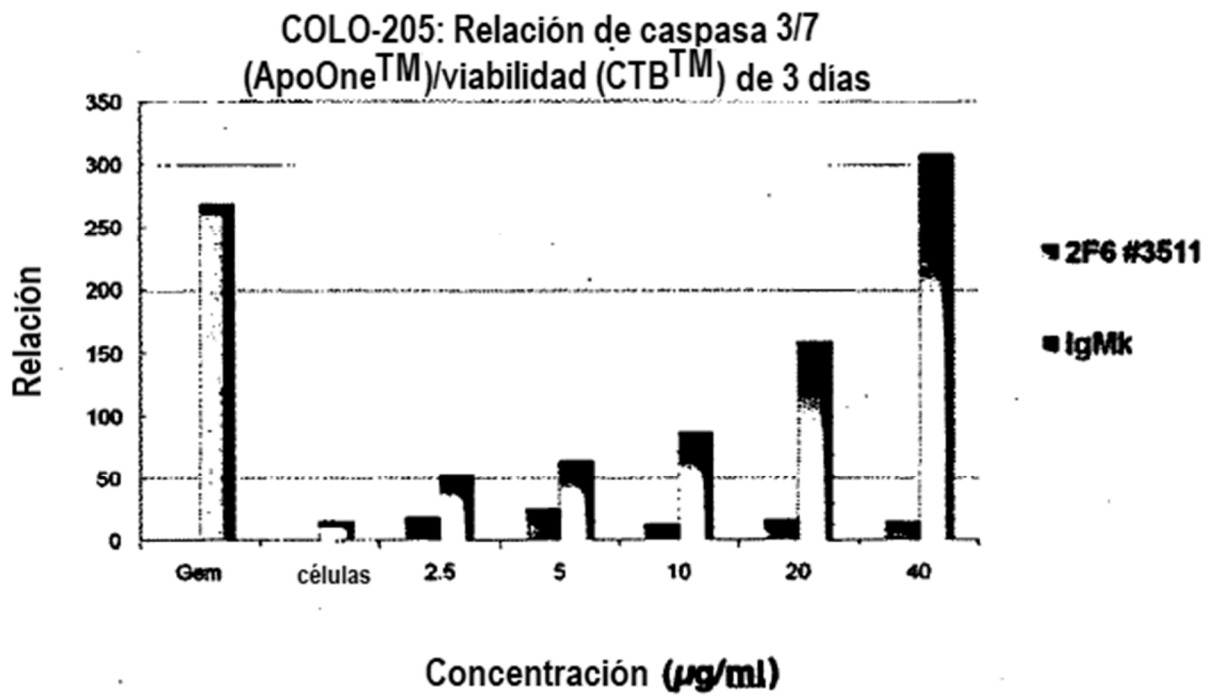


Figura 12



Células de control MCF-7 (día 1)

MCF-7, 2F6 20 µg/ml (día 1)

Fotomicrografía de contraste de fases, objetivo de 20x

Fotomicrografía de contraste de fases, objetivo de 20x

viable

muerta

Figura 13a

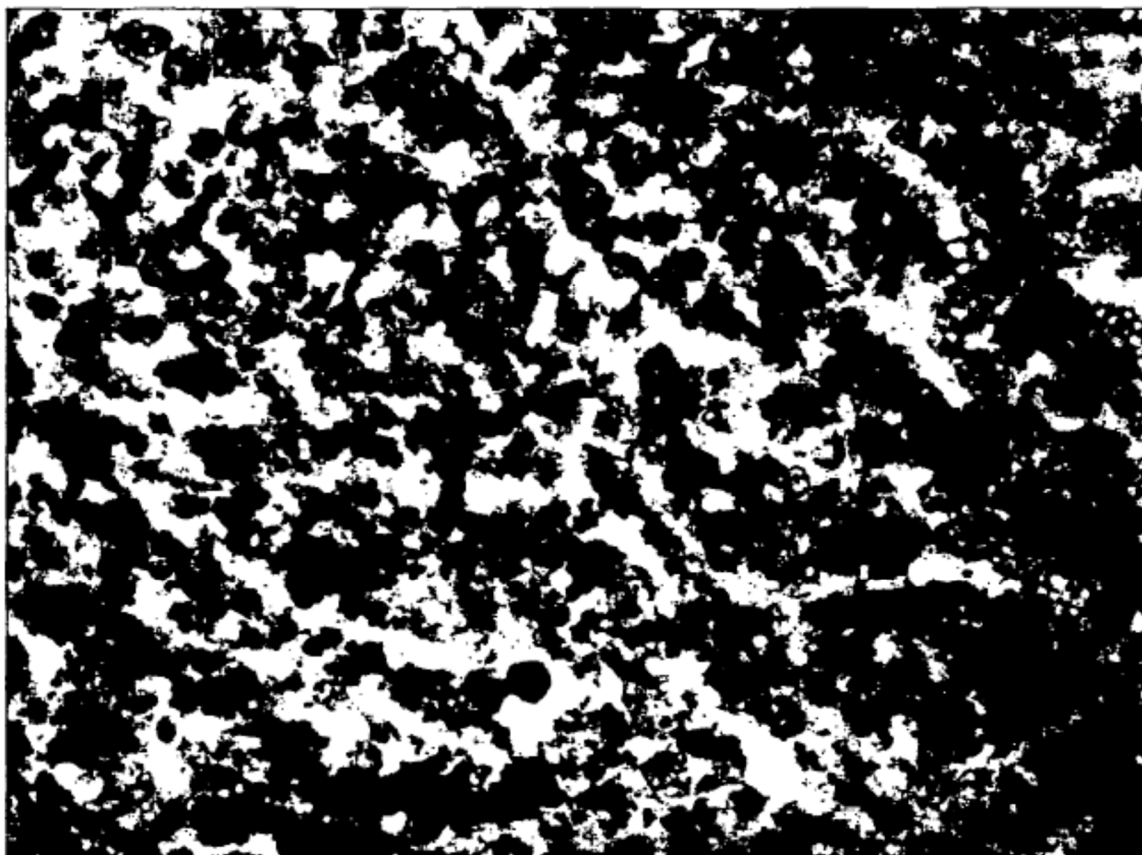


Figura 13b

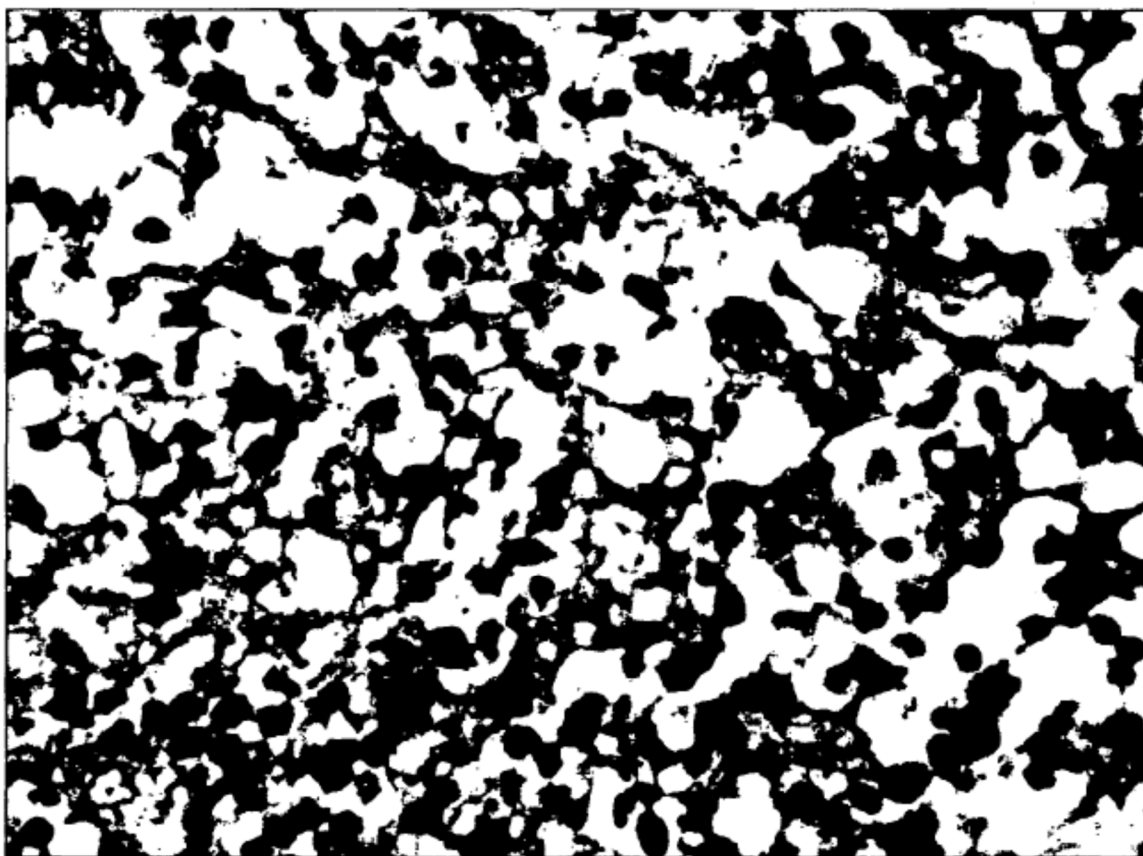


Figura 13c

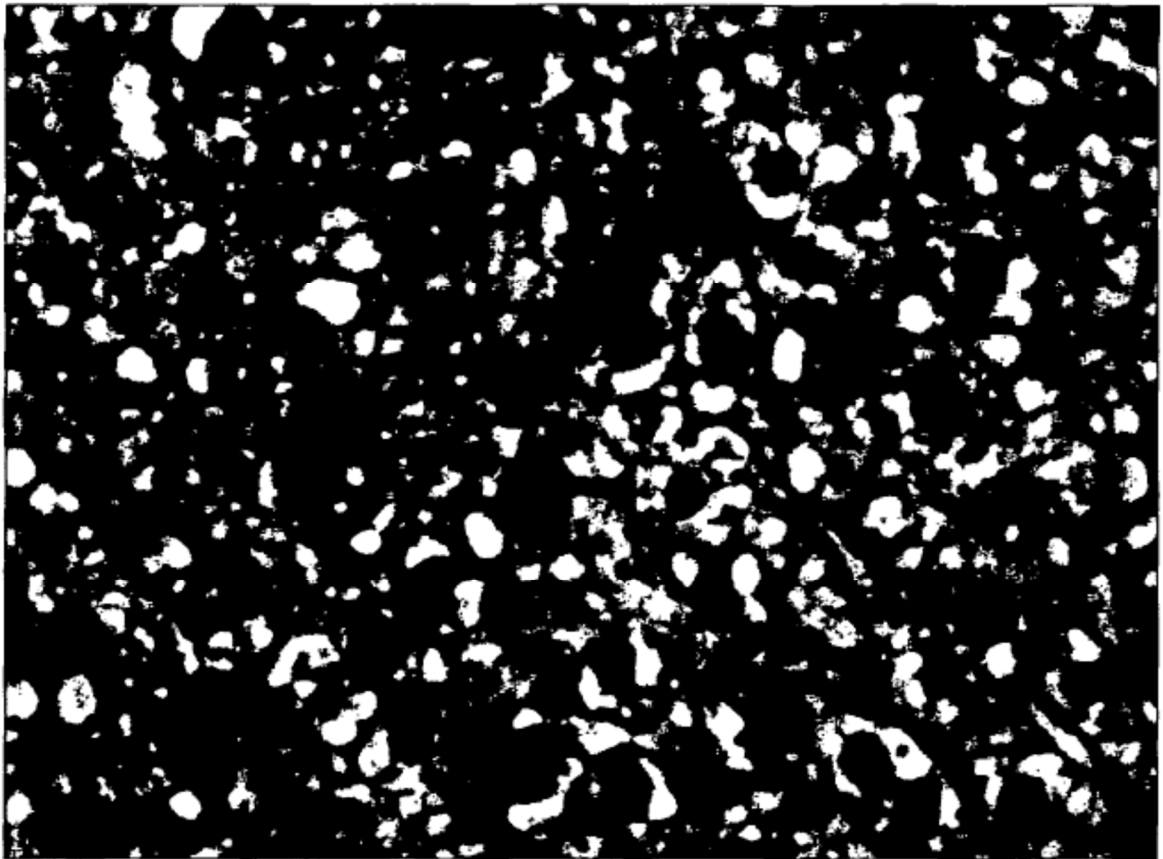


Figura 13d

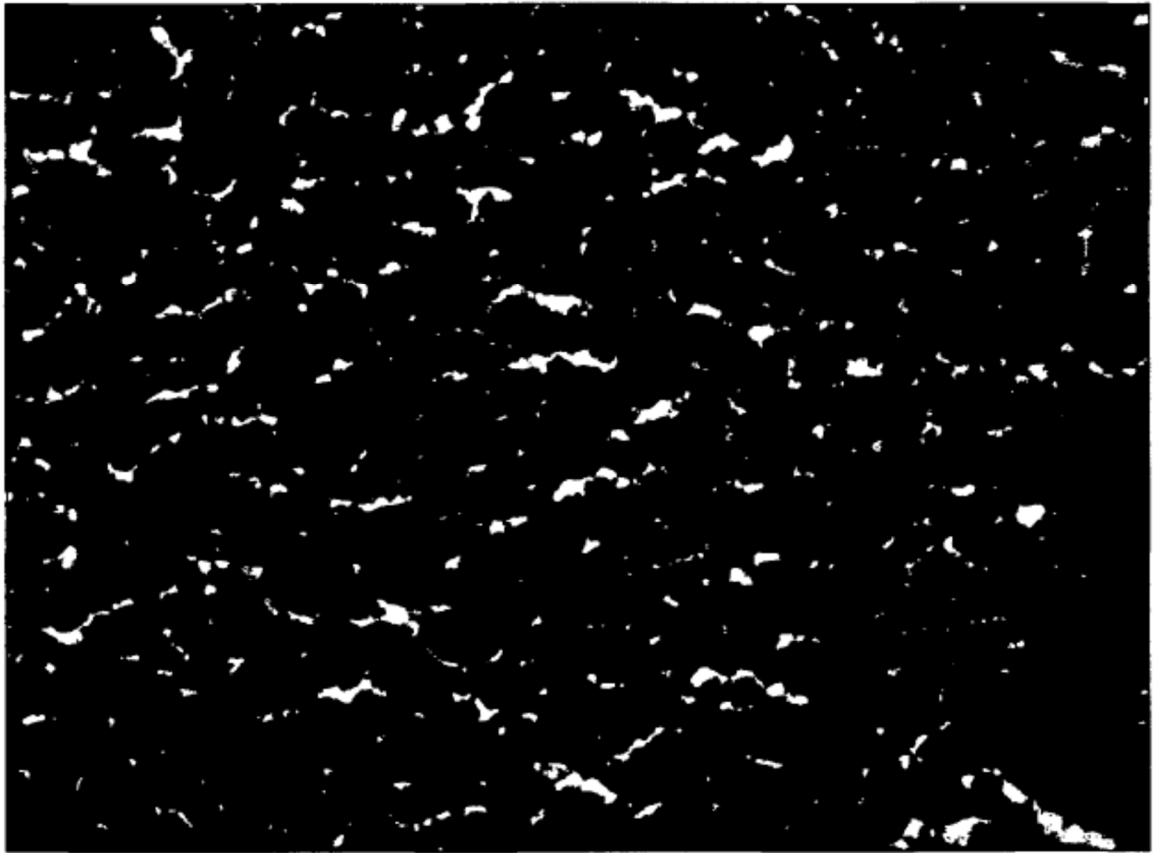


Figura 14a

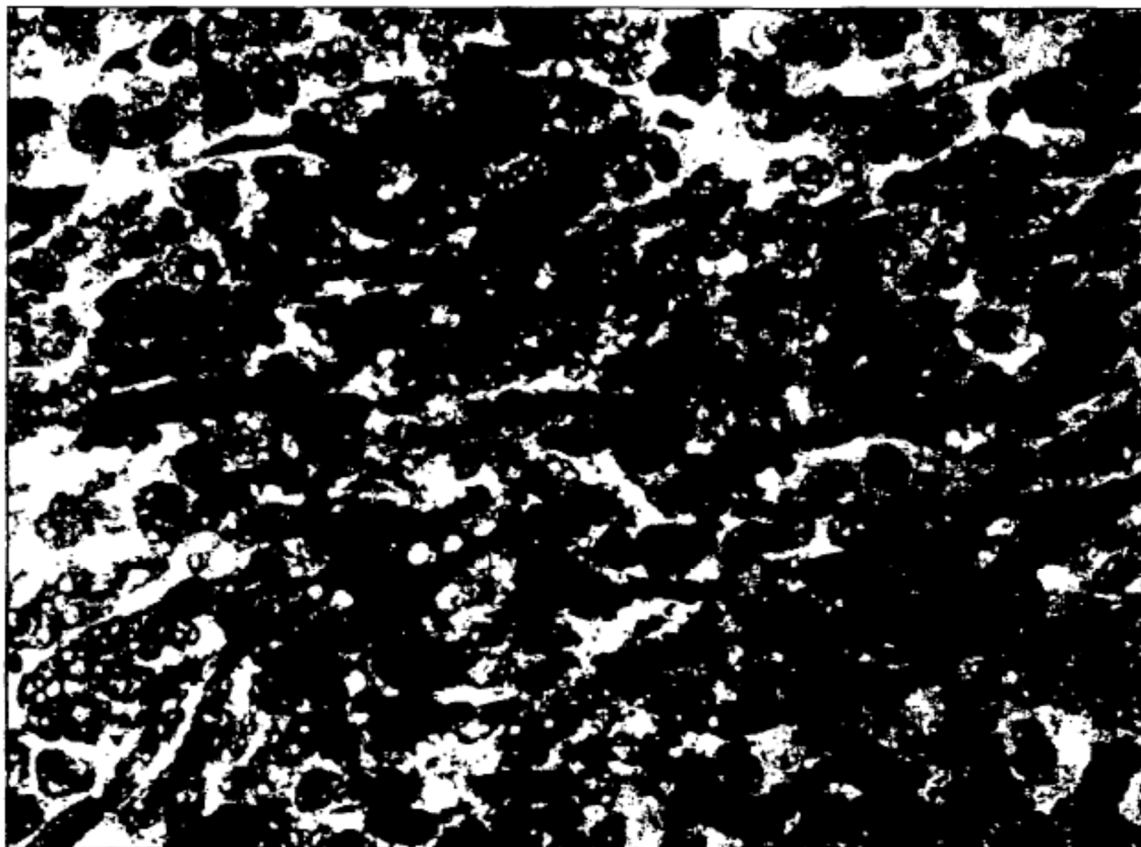


Figura 14b

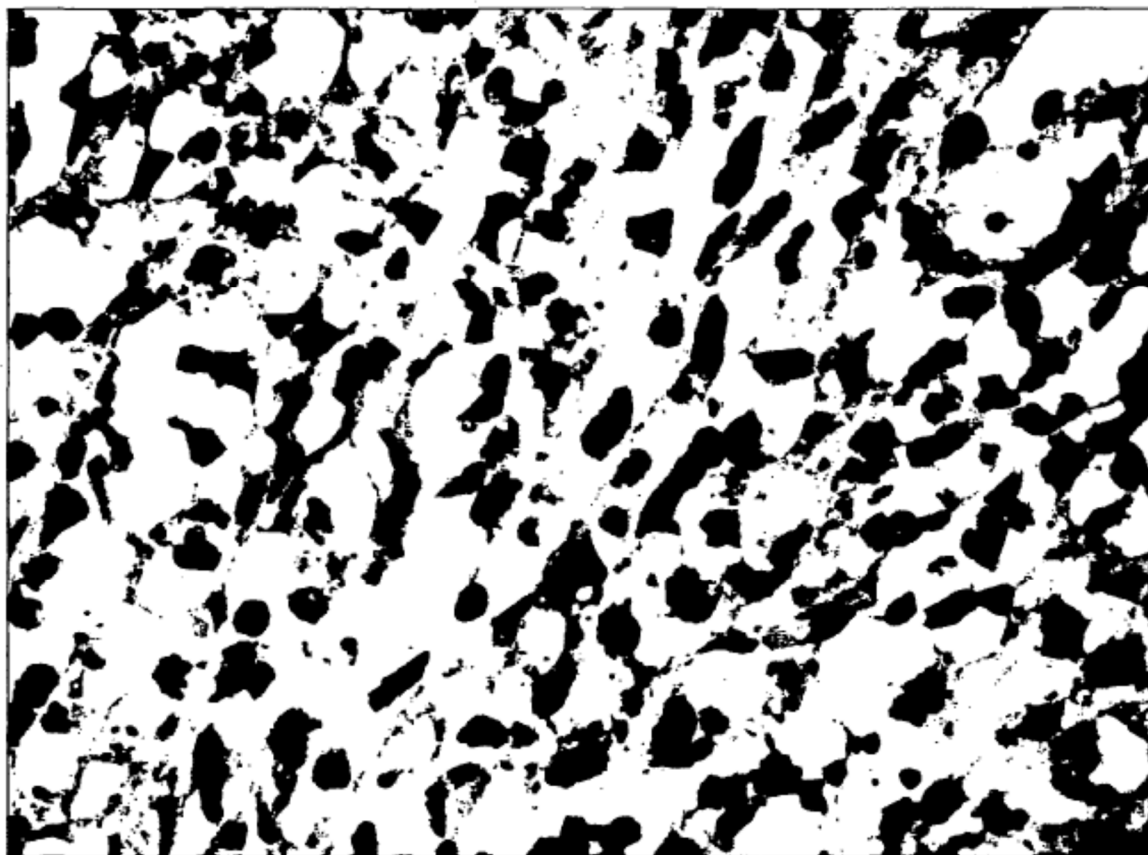


Figura 14c

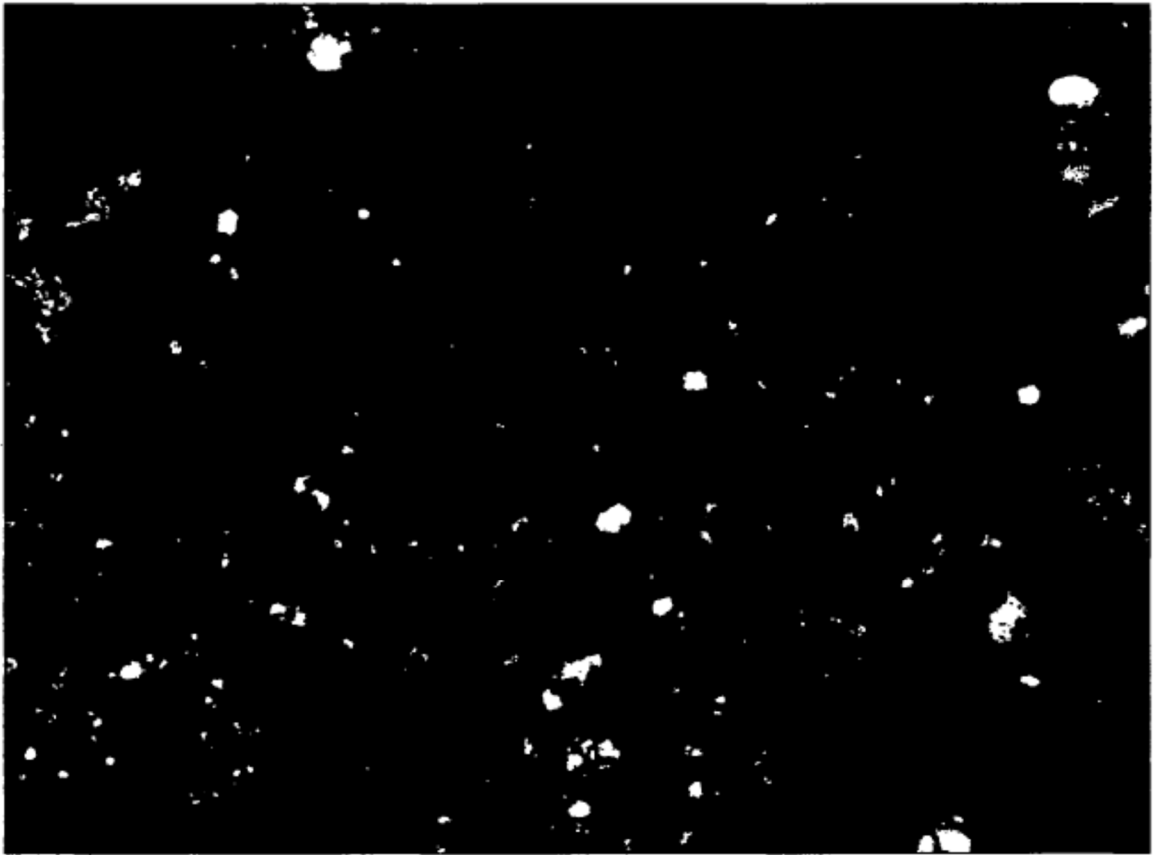


Figura 14d

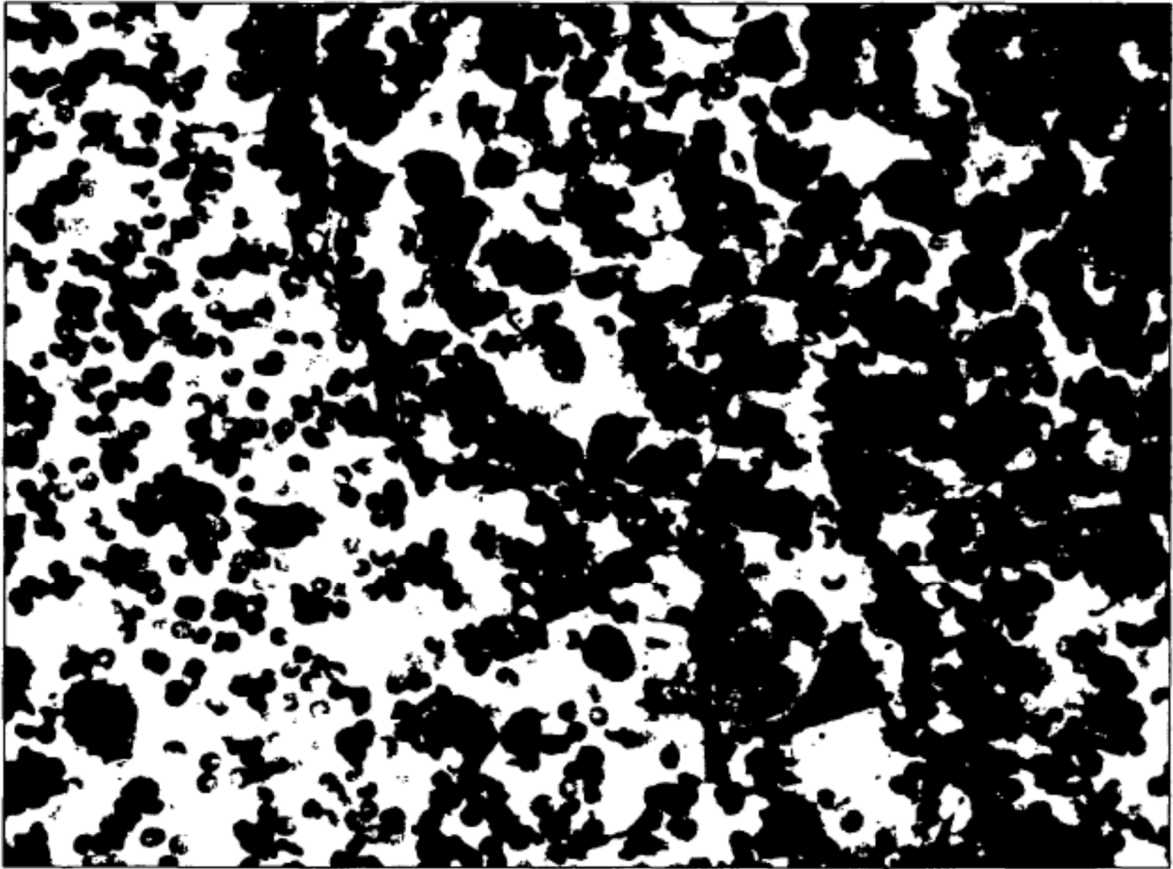


Figura 15

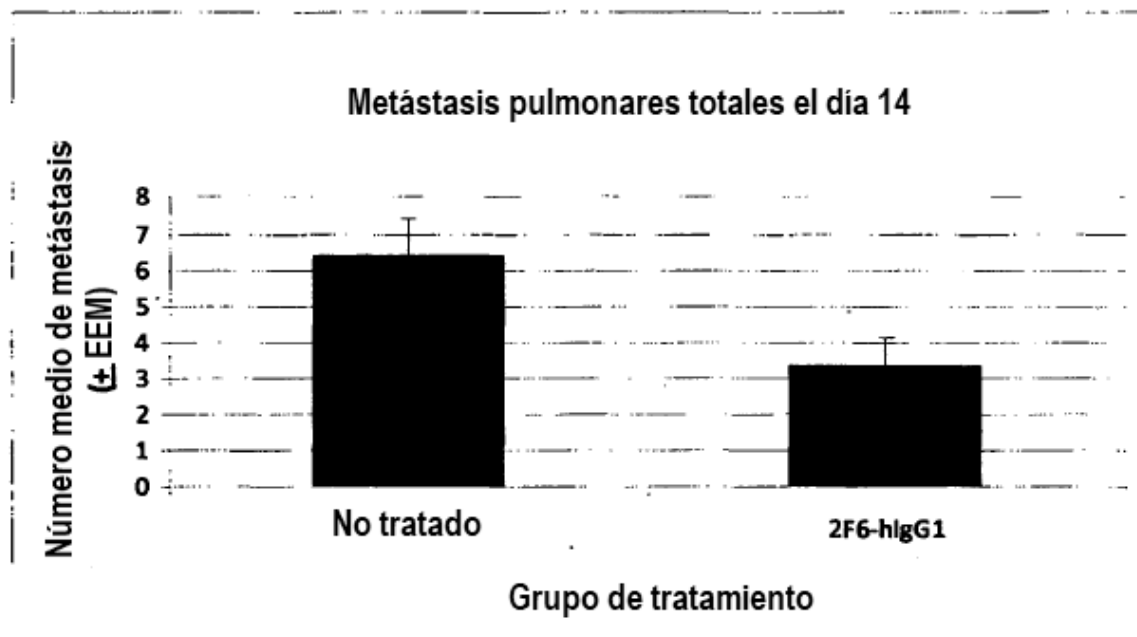


Figura 16

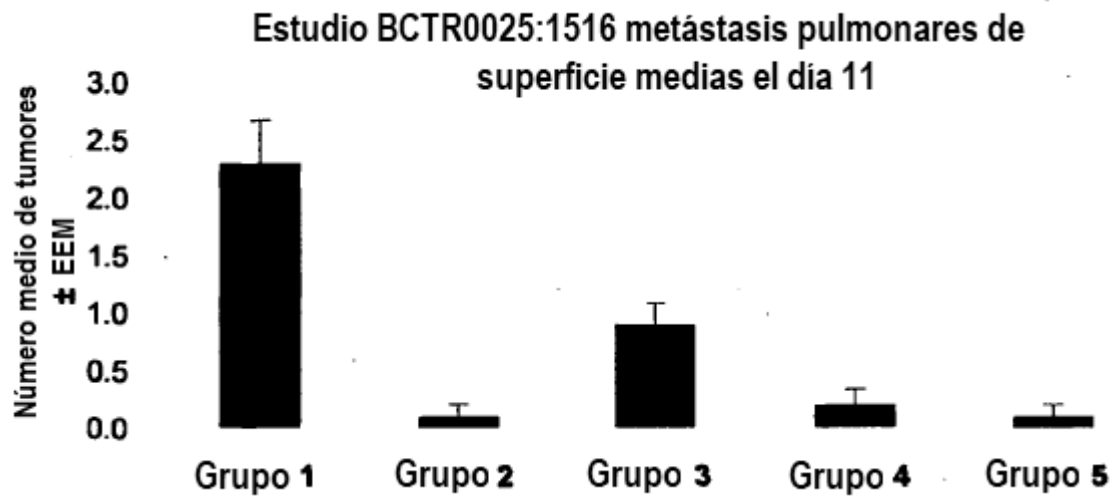
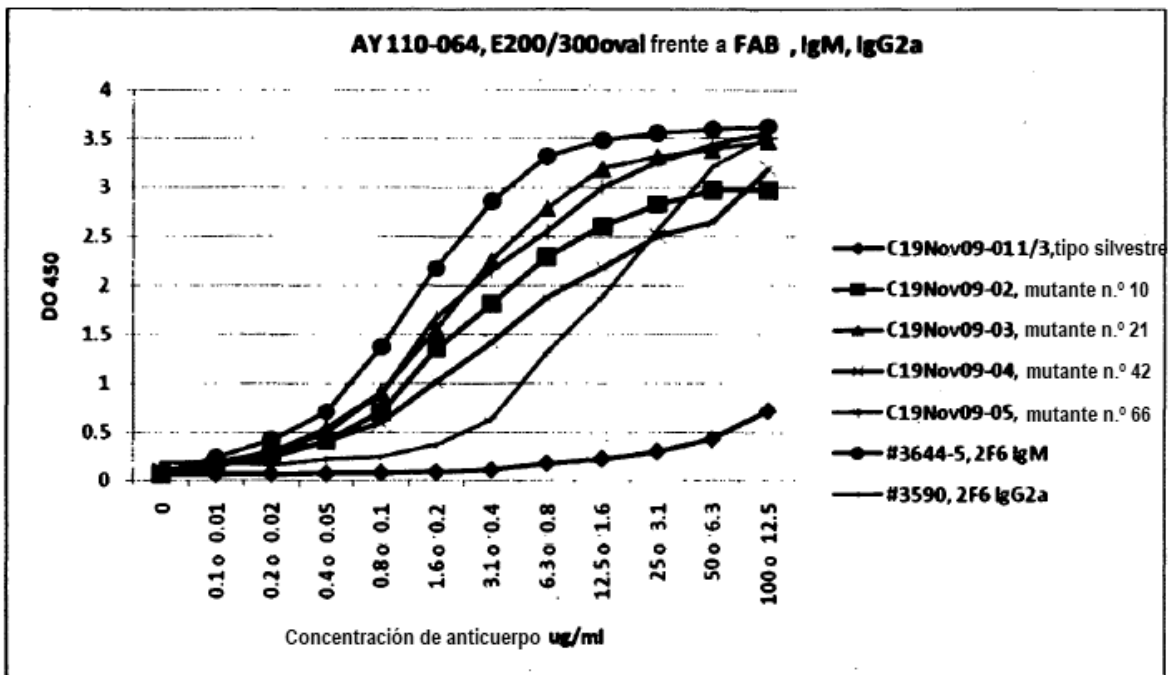


Figura 17

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

Figura 18



| | mutante n.º 10 | mutante n.º 21 | mutante n.º 42 | mutante n.º 66 | Fab WT | 2F6 IgM | 2F6IgG2a |
|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|---------|----------|
| CE50 ($\mu\text{g/ml}$) | 2.2 | 1.9 | 4.4 | 2.1 | ~250 | 0.14 | 1.6 |

Figura 19a

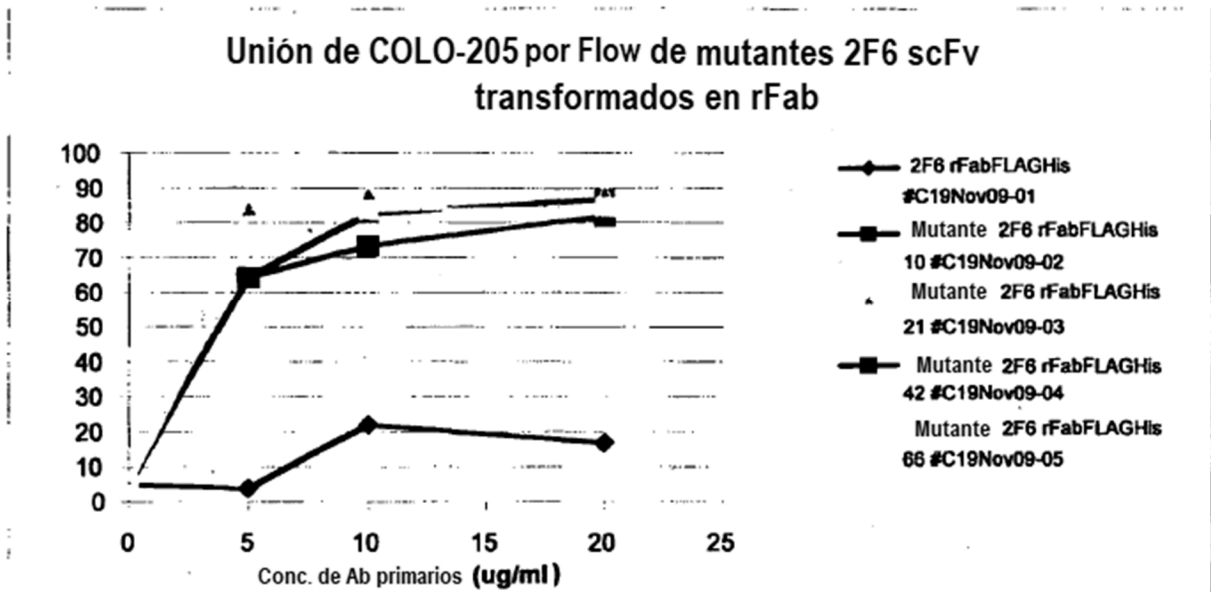


Figura 19b

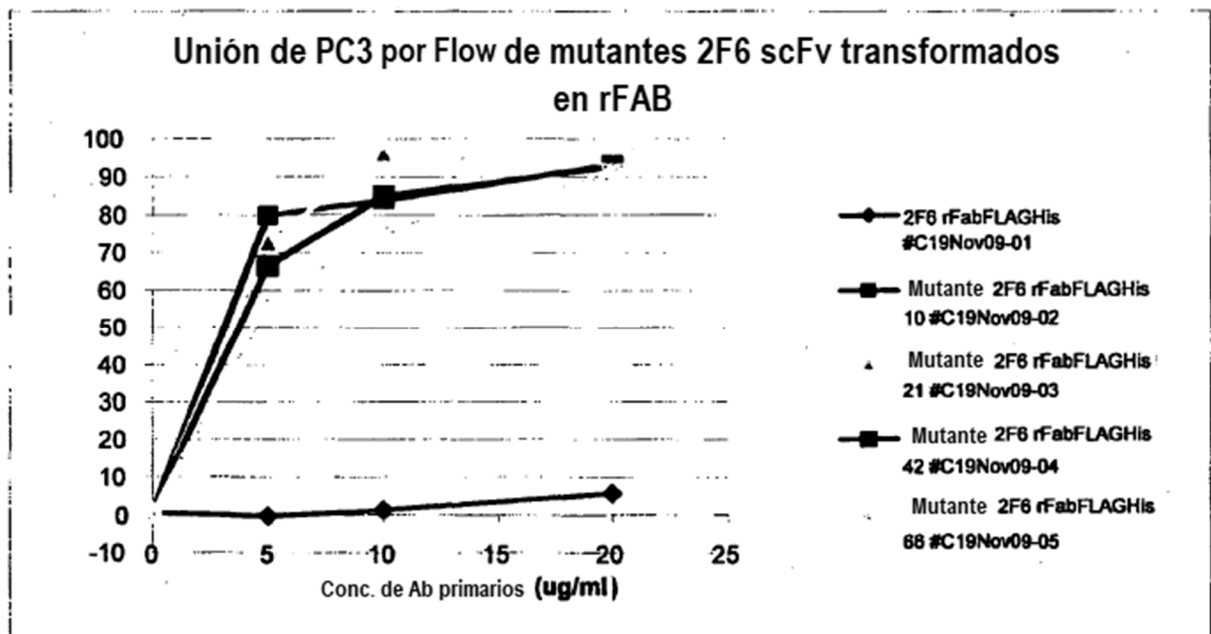


Figura 20

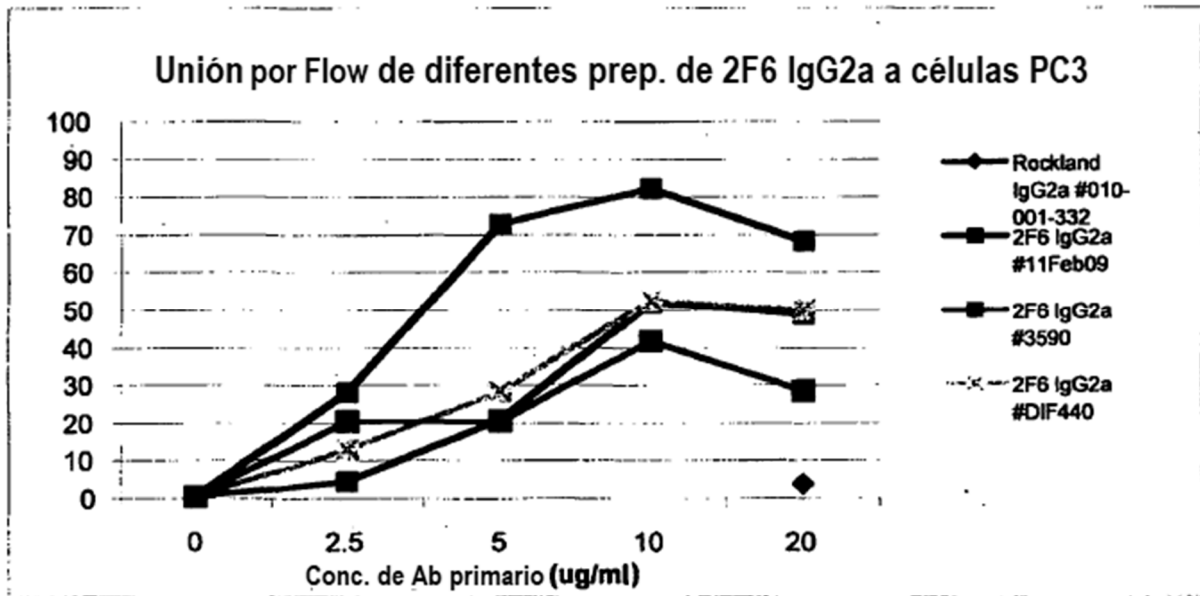


Figura 21

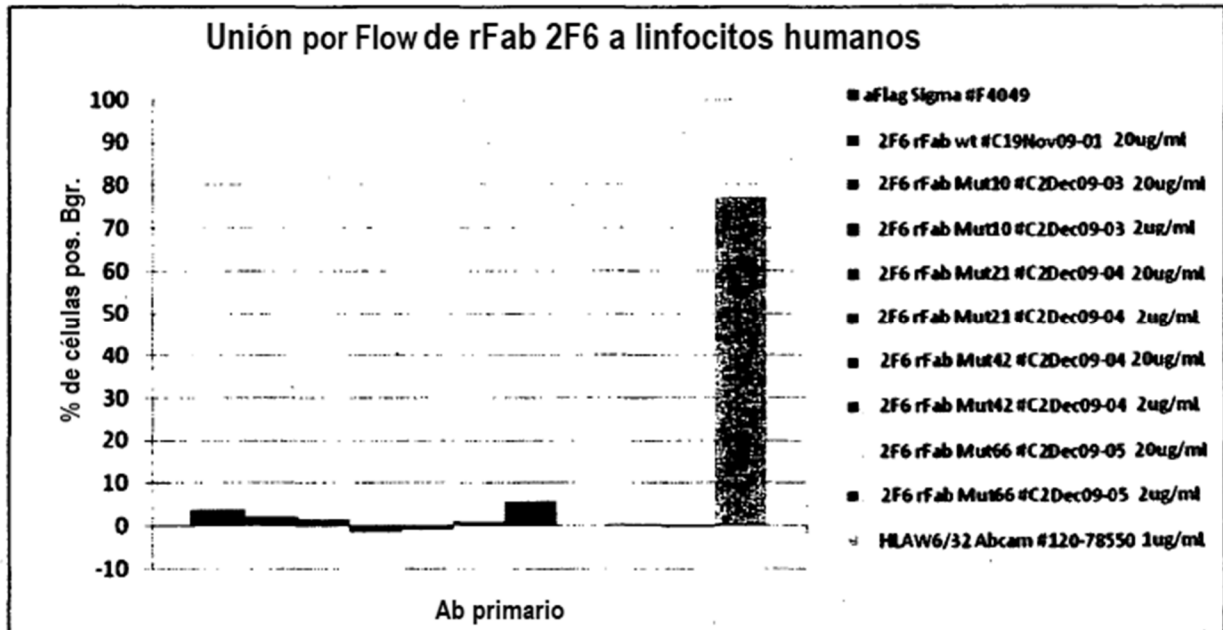


Figura 22

