

(11) Número de Publicação: **PT 1360203 E**

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/705 (2006.01) **C07K 14/435** (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 45/00** (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) **A61P 31/00** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) **A61P 31/06** (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) **A61P 31/18** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2002.01.17**

(30) Prioridade(s): **2001.01.17 AU PR257901**
2001.06.22 AU PR589001
2001.06.22 AU PR589101
2001.09.03 AU PR743001
2001.09.03 AU PR743101

(43) Data de publicação do pedido: **2003.11.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.24**
066/2009

(73) Titular(es):

INTREAT PTY LIMITED
LEVEL 10, 26 O'CONNELL STREET SYDNEY,
NSW 2000 AU

(72) Inventor(es):

ANGUS GIDLEY-BAIRD AU
JULIAN ALEXANDER BARDEN AU

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS DE RECEPTOR P2X7 NÃO FUNCIONAL PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CANCROS E OUTROS ESTADOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"ANTICORPOS DE RECEPTOR P2X₇ NÃO FUNCIONAL PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CANCROS E OUTROS ESTADOS"

A invenção diz respeito a uma vasta gama de doenças e estados, incluindo cancros. A invenção providencia uma sonda para detecção de uma tal doença ou estado. A sonda é capaz de distinguir entre receptores P2X₇ funcionais e receptores P2X₇ não funcionais. A sonda pode fazer isto de várias maneiras, uma das quais é detectar a variação em relação à ligação do trifosfato de adenosina (ATP) aos receptores. A invenção também providencia um método para detectar a doença ou estado, utilizando a sonda. A invenção estende-se ao tratamento da doença ou do estado, utilizando um anticorpo, ou um epítipo capaz de gerar o anticorpo, que pode distinguir entre receptores P2X₇ funcionais e não funcionais e ligar-se aos receptores não funcionais. Estão também incluídos os métodos de tratamento, as composições farmacêuticas e a utilização da sonda e do anticorpo.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS DE RECEPTOR P2X₇ NÃO FUNCIONAL PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CANCROS E OUTROS ESTADOS"

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção diz respeito ao diagnóstico e tratamento de doenças, incluindo cancros. Os tipos de doenças com as quais esta invenção se relaciona incluem cancros derivados a partir de células epiteliais e linfoma maligno. A invenção também diz respeito a outros estados, tais como estados pré-neoplásicos, síndrome do intestino irritável e infecções virais e outras. É possível que a invenção seja também aplicável a outras doenças e estados.

ANTECEDENTES

O trifosfato de adenosina (ATP) pode activar receptores purinérgicos controlados por ligandos conhecidos como receptores P2X. Foram identificados os subtipos de receptor P2X₁ a P2X₇. É conhecido que diferentes subtipos de receptor P2X estão presentes em muitas células, incluindo células epiteliais e leucócitos, incluindo linfócitos, timócitos, macrófagos e células dendríticas (Nihei *et al.* (2000) Blood 96(3) : 996-1005).

Os receptores P2X são permeáveis aos iões cálcio assim como a alguns outros catiões, tais como potássio e sódio (Buell *et al.* (1998) Blood 92(10) : 3521-3528). Um influxo de iões cálcio para uma célula através de um receptor P2X pode estar associado à morte da célula.

Crê-se que o subtipo P2X está envolvido em apoptose, ou morte celular programada, em muitos tipos de células (Nihei

et al. (2000) *Blood* 96(3) : 996-1005 e *Ferrari et al.* (1977) *Neuropharmacology* 36(9) : 1295-1301). Na presença de ATP, o receptor P2X₇ expresso na superfície de uma célula é capaz, num segundo, de abrir canais de cálcio através da membrana celular (*Ferrari et al.* (1977) *Neuropharmacology* 36(9) : 1295-1301). A exposição continuada ao ATP pode conduzir à formação de grandes poros, em poucos segundos até dezenas de segundos, que permite que a célula seja inundada com cálcio em excesso, induzindo a apoptose (*Buell et al.* (1998) *Blood* 92(10) : 3521-3528).

As sequências de aminoácidos dos receptores P2X₇ humano e de rato são conhecidas, por exemplo, a partir da patente US No. 6 133 434 (*Buell et al.*). Referência também à Figura 1 aqui.

A exposição ao ATP geralmente não resulta em apoptose no caso de cancro de célula epitelial, por exemplo. Foi descoberto que tais células expressam receptores P2X₇ que são incapazes de formar poros. Estes são considerados como receptores não funcionais.

Em linhas celulares de cancro humano, tal como da próstata PC3 e da mama MCF7, assim como em linhas celulares animais incluindo hibridomas de roedores, o receptor P2X₇ é encontrado na superfície da célula numa conformação não funcional.

As células B de pacientes com linfoma maligno expressam receptores P2X₇ não funcionais. O linfoma desenvolve-se a partir de clones malignos que escapam à destruição citolítica. Este processo conduz à acumulação progressiva

de linfócitos B malignos e conseqüentemente a linfadenopatia e/ou esplenomegalia.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num primeiro aspecto, esta invenção providencia uma sonda para detecção de uma doença ou estado, sendo a sonda adaptada para distinguir entre receptores P2X₇ funcionais e receptores P2X₇ não funcionais. Preferencialmente, a sonda distingue entre receptores P2X₇ funcionais e não funcionais por detecção da variação em relação à ligação de trifosfato de adenosina (ATP) aos receptores ou por detecção da variação na ligação de uma ou mais proteínas necessárias para a formação de poros em receptores P2X₇. Numa concretização alternativa, a sonda detecta uma ou mais partes do receptor P2X₇ exposto na ausência de ATP ligado. Tal parte do receptor poderá incluir um monómero P2X₇.

A invenção também providencia um método para detectar uma doença ou estado, o método incluindo os passos de utilizar a sonda da invenção para distinguir entre receptores P2X₇ funcionais e receptores P2X₇ não funcionais, providenciando um perfil de expressão do receptor, e comparando o perfil de expressão do receptor com aquele de um perfil normal. A variação poderá ser detectada, por exemplo, como indicado acima em ligação com a própria sonda.

A sonda poderá ser natural ou artificial. Preferencialmente, a sonda é um anticorpo, que poderá ser policlonal, monoclonal, recombinante, um anticorpo humanizado ou um seu fragmento adequado. O anticorpo é preferencialmente dirigido contra um epítipo localizado num domínio extracelular adjacente a um sítio para ligar ATP. No caso de receptores P2X₇ humanos, a sonda é

preferencialmente adaptada, para distinguir entre os receptores funcionais possuindo uma sequência na qual a prolina no aminoácido 210 está na conformação *trans* e os receptores não funcionais possuindo uma sequência em que a prolina no aminoácido 210 está na conformação *cis*.

A sonda poderá ser preparada utilizando qualquer técnica adequada, como será prontamente aparente para um perito na técnica.

Está dentro do objectivo da invenção que a sonda possa distinguir entre receptores funcionais e não funcionais através da detecção de outras variações conformacionais ocorrendo num sítio para ligar ATP. Por exemplo, a variação detectada poderá ser num aminoácido diferente da prolina referida acima. Um exemplo de um tal aminoácido é Pro 199. Como outro exemplo, a variação detectada poderá ser a algum outro respeito.

A sonda poderá também ser adaptada para detectar outras regiões do receptor P2X₇ não variadas por estado funcional. A conformação das subunidades monoméricas sem ATP ligado poderá ser detectável utilizando a sonda, como o epítipo escolhido poderá detectar especificamente a forma de uma região da superfície do receptor acessível apenas quando o ATP não está ligado. A sonda poderá detectar a variação na ligação de uma ou mais proteínas, tais como proteínas acessórias ou outras, necessárias para a formação de poros. Exemplos não limitantes de tais proteínas são laminina, integrina, beta-actina, alfa-actinina e supervilina.

Na presente invenção, pode ser utilizado um anticorpo específico para o subtipo P2X₇ para detectar

especificamente ou se ligar a receptores P2X₇ não funcionais expressos aí ou em células formando parte do tecido pré-neoplásico, tecido neoplásico muito precoce, tecido neoplásico avançado e em qualquer célula neoplásica expressando receptores P2X₇ não funcionais. Assim, o receptor P2X₇ é detectado ou ligado apenas quando na conformação bloqueada ou não funcional, mesmo que possa ser normalmente expresso nas membranas celulares e possa de outro modo ser parcialmente capaz de funcionar como um canal.

Adicionalmente, a conformação das subunidades monoméricas sem ATP ligado é também detectável com o anticorpo, porque o epítipo escolhido especificamente detecta a forma de uma região da superfície acessível apenas quando o ATP não está ligado.

Na presente invenção, os receptores P2X₇ não funcionais podem ser detectados ou ligados através da utilização de um anticorpo dirigido contra um epítipo que sofra uma variação conformacional da estrutura presente nos receptores funcionais. Foi descoberto que a sequência de aminoácidos dos receptores não funcionais pode ser idêntica à sequência de aminoácidos dos receptores funcionais, de modo que a causa da variação conformacional nos receptores se relacione com a interacção dos receptores com o ATP. Como estabelecido acima, as moléculas de ATP actuam como agonistas de receptor, de modo que quando o ATP está ligado aos receptores, são capazes de abrir um canal através da membrana celular para o influxo de iões cálcio. A não funcionalidade é portanto provocada por uma falta de ligação adequada dos agonistas de ATP aos receptores, por razões que poderão incluir um deficit na disponibilidade

local de ATP até um déficit de produção ou aumento na taxa de degradação. Se a ligação do ATP aos receptores for quebrada, a conformação do receptor é alterada. Isto pode ser detectado através da utilização de um anticorpo especialmente designado para se ligar à região da proteína afectada pela ligação do ATP.

No caso de receptores P2X₇ humanos, a sequência específica envolvida na variação conformacional poderá incluir Pro210, que sofre uma variação na conformação da forma *trans* para a forma *cis* na ausência de ATP ligado. Assim, no caso de receptores humanos, uma sequência de epítopo adequada contra a qual um anticorpo tem que ser criado poderá incluir Pro210, e poderá estender qualquer um dos lados deste resíduo, até uma extensão adequada necessária para induzir uma resposta ao anticorpo.

Em termos de um exemplo não limitante, este poderá incluir um segmento estendendo desde Gly200 a Thr215. Adicionalmente, poderá ser utilizado um segmento homólogo de outros mamíferos, tal como rato, quando este interfere com tecido humano. Como um exemplo, poderá ser utilizado o mesmo segmento Gly200 a Thr215 em rato, embora existam duas substituições de aminoácidos na sequência de rato comparada com a sequência humana (referência à patente US No. 6,133,434, por exemplo).

No caso de receptores não humanos, a sequência específica poderá ser verificada por uma experiência adequada.

A detecção de receptores P2X₇ não funcionais de acordo com a invenção poderá exhibir um padrão de distribuição no qual os receptores funcionais (e portanto as células normais)

poderão permanecer essencialmente não marcados. No entanto, poderão ser detectadas conformações não funcionais de receptores P2X₇, inicialmente nos núcleos e citoplasma das células, num estágio muito precoce de pré-neoplasia. Por exemplo, no caso de cancro da célula epitelial, utilizando o método da invenção poderá ser possível detectar a pré-neoplasia vários anos antes do aparecimento patológico normal de cancro como detectado por manchamento com hematoxilina e eosina ("H & E") de lâminas de tecidos sujeitos a biópsia. Assim, os cancros tais como da próstata, pele e mama poderão ser detectados muito antes do que se verifica actualmente, com as vantagens da introdução de terapia precoce.

O âmbito total das doenças e estados que poderão ser detectados pela sonda e método da invenção não foi ainda verificado. No entanto, crê-se que estes incluam cancros da célula epitelial, tais como cancros da próstata, mama, pele, pulmão, colo, útero, estômago, esófago, bexiga, cólon e vaginais, assim como cancros do sangue incluindo linfoma maligno, síndrome do intestino irritável e infecção por vírus tais como HIV ou outros organismos patológicos, tais como *Mycobacterium tuberculosis*. A infecção poderá provocar que os receptores não funcionais sejam expressos quer directamente através da inibição de co-factores requeridos para a funcionalidade, ou através da sobre-expressão de co-factores actuando para inibir a função de P2X₇ nas células epiteliais ou noutras, tornando assim a célula infectada menos receptiva à destruição por apoptose.

A menos que seja indicado algo em contrário, o termo "doença ou estado" como utilizado aqui pretende incluir

todas aquelas doenças e estados específicos mencionados no parágrafo anterior.

No caso específico da síndrome de intestino irritável ("IBS"), foi agora descoberto que, em pacientes com este estado, a mucosa do intestino, que normalmente expressa receptores P2X₇ nos linfócitos vastamente distribuídos presentes no estroma sob o epitélio, torna-se sobre-expressa. Em pacientes afectados, esta expressão aumentada pode ser observada desde o duodeno até à mucosa rectal. A expressão aumentada poderá ser encontrada em regiões isoladas, ou ser geralmente aumentada sobre o comprimento total do tracto intestinal em casos mais extremos.

Nos casos menos afectados, os receptores P2X₇ totais estão sobre-expressos, mas estes são todos funcionais e não penetram no epitélio. Em casos mais graves, a expressão total de receptor P2X₇ é ainda mais elevada, e as áreas mais afectadas do intestino exibem receptores que são não funcionais. Estes poderão estar localizados na mucosa cecal, por exemplo, e poderão penetrar no epitélio. Os casos mais graves são aqueles em que a expressão de receptor P2X₇ está adicionalmente aumentada e a maioria dos receptores são não funcionais com penetração na célula epitelial aumentada.

Como discutido previamente, a não funcionalidade dos receptores P2X₇ é causada por falta de ligação adequada do agonista de ATP aos receptores. As razões para isto poderão incluir um défice na disponibilidade local de ATP até um défice de produção ou aumento na taxa de degradação pela degradação enzimática ecto-ATPase de ATP. Se a ligação do ATP aos receptores for quebrada, a conformação do receptor

é alterada como foi já discutido, e isto pode ser detectado utilizando a sonda da invenção. No entanto, a detecção da distribuição de receptor P2X₇ total é melhor conseguida utilizando um epítipo para outras regiões do domínio extracelular do receptor P2X₇ que não seja afectado pela ligação a ATP.

Está dentro do âmbito desta invenção utilizar um ou dois anticorpos específicos para o subtipo P2X₇ para distinguir especificamente entre a distribuição de P2X₇ total e a proporção de receptores que são não funcionais e expressos na mucosa intestinal. Assim os dois anticorpos utilizados conjuntamente podem detectar o cômputo de receptor total e aqueles canais receptores presentes apenas numa conformação bloqueada ou não funcional. O primeiro anticorpo é adaptado para detectar a expressão de receptor P2X₇ total. A sonda compreendendo ou ligada ao anticorpo da invenção pode providenciar o segundo anticorpo para detecção de IBS, não apenas distinguindo entre receptores P2X₇ funcionais e não funcionais, mas também permitindo a detecção de outras regiões nas quais o receptor não é variado por estado funcional. Os anticorpos poderão ser utilizados separadamente ou em conjunto. Preferencialmente, são utilizados em combinação.

A detecção de todos os receptores P2X₇, separadamente dos receptores P2X₇ não funcionais, determina a gravidade do estado. A expressão de receptores P2X₇ não funcionais na mucosa gastrointestinal ocorre num padrão em que as células normais permanecem essencialmente não marcadas. Consequentemente, a conformação não funcional de P2X₇ é primeiro detectada no estroma sob o epitélio variando desde fragmentos isolados em casos médios da síndrome até

expressão extensiva ao longo do comprimento do tracto gastrointestinal com fragmentos isolados de infiltração de receptores não funcionais no epitélio.

A invenção também providencia um método para diagnosticar a síndrome de intestino irritável, compreendendo detectar o perfil de expressão de P2X₇ de células e/ou tecido e comparar o perfil com um perfil de expressão pré-determinado de normais células e/ou tecido. Preferencialmente, a detecção do perfil de expressão de P2X₇ inclui a utilização de um ou mais anticorpos. Adicionalmente, é preferido que tal anticorpo ou anticorpos sejam diferentes da sonda da invenção em que não detectem a variação em relação à ligação de ATP aos receptores P2X₇. A preparação de tais anticorpos será prontamente aparente para um perito na técnica.

A invenção também inclui a utilização de um ou mais anticorpos para diagnosticar a síndrome de intestino irritável.

O diagnóstico pode ser utilizado em microscopia comum empregando técnicas histoquímicas imunológicas comuns.

O tratamento terapêutico para este estado é discutido adiante, em conexão com o terceiro aspecto desta invenção.

O diagnóstico utilizando a sonda e o método da invenção poderá ser levado a cabo utilizando técnicas de imagiologia *in situ* para detectar a distribuição em tecidos corporais. Em adição, poderá ser utilizada microscopia comum, microscopia confocal e triagem celular activada por fluorescência. Poderão ser utilizadas técnicas

histoquímicas imunológicas normais para testar biópsias linfáticas, da próstata, mama, pele, pulmão, útero, bexiga, colo, estômago, esófago e semelhantes, também aspirados de agulha fina da mama e outro tecido e colheitas celulares tais como aquelas tomadas para a detecção de cancro cervical. Poderão ser utilizadas outras técnicas com a sonda e o método da invenção.

Esta invenção providencia um anticorpo para tratar uma doença ou estado, sendo o anticorpo adaptado para distinguir entre receptores P2X₇ funcionais e receptores P2X₇ não funcionais e sendo adaptado para se ligar apenas a receptores não funcionais. Preferencialmente, o anticorpo distingue entre os receptores funcionais e não funcionais através da detecção da variação em relação à ligação de trifosfato de adenosina (ATP) aos receptores, ou através da detecção da variação na ligação de uma ou mais proteínas necessárias para a formação de poro em receptores P2X₇ e sendo adaptado para se ligar apenas a receptores não funcionais. Noutra concretização, o anticorpo distingue entre os receptores funcionais e não funcionais através da detecção de partes do receptor expostas na ausência de ATP ligado.

O anticorpo para tratar doenças e estados poderá ser o mesmo que o anticorpo que poderá ser utilizado como a sonda para diagnosticar doenças e estados. Um tal anticorpo poderia ser utilizado para tratar topicamente cancros da pele, por exemplo. Para o tratamento sistemático de cancro, o anticorpo ou os seus fragmentos activos deverão ser humanizados de modo a minimizar os efeitos secundários de resposta imunológica indesejáveis.

O anticorpo da invenção poderá ser utilizado para tratar doenças ou estados em mamíferos, incluindo seres humanos. Exemplos das doenças ou estados foram estabelecidos acima em conexão com a sonda da invenção.

A invenção também providencia um epítopo capaz de provocar a geração do anticorpo do segundo aspecto da invenção. O epítopo inclui preferencialmente Pro210 e compreende o segmento Gly200 a Thr215 (na sequência P2X₇ do receptor humano). O epítopo deverá preferencialmente possuir ligado à extremidade C-terminal um resíduo Cys que é reticulado com a toxina difteria através do reticulante químico maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS), de modo que a conformação adoptada pelo péptido epítopo ligado ocupe uma configuração prolina *cis* estável.

Esta conformação de péptido específica pretende ser apresentada a seres humanos ou animais com uma ou mais doenças ou estados, especialmente cancros de célula epitelial, tais como cancros da próstata, mama, pele, pulmão, colo, útero, estômago, esófago, bexiga, cólon e vaginal, assim como linfoma maligno, síndrome do intestino irritável e infecção por vírus tais como o HIV ou outros organismos patológicos, tais como *Mycobacterium tuberculosis*. O paciente irá preferencialmente montar uma resposta imunológica ao epítopo conjugado aplicado e portanto gerar anticorpos que reconhecem os receptores P2X₇ não funcionais presentes na superfície das células afectadas, ligando-se assim a eles e alertando a célula imunológica adequada para destruir as células complexadas. Outras células iniciadas para morte celular poderão também ser afectadas.

Deverá ser entendido que a sequência referida acima não é limitante do âmbito da invenção, que inclui sequências alternadas e veículos e reticulantes que produzem semelhantemente uma resposta específica imune, preferencialmente contra apenas receptores P2X₇ não funcionais, preferencialmente ignorando todos os receptores funcionais expressos nas superfícies celulares, e deste modo evitando efeitos secundários.

A invenção, neste segundo aspecto, também providencia a utilização do anticorpo da invenção como um veículo terapêutico para o tratamento de uma doença ou estado num paciente para regular a morte celular programada através de atingir receptores P2X₇ aberrantes ou não funcionais expressos na superfície de células, enquanto deixa intocáveis todas as células de receptores que se expressam normalmente (funcionais). A invenção também cobre a utilização do epítipo da invenção para provocar a geração do anticorpo, como acima.

A invenção também providencia uma composição farmacêutica para tratamento ou prevenção de uma doença ou estado num paciente, a composição incluindo uma quantidade farmacologicamente efectiva de um anticorpo, ou um epítipo para provocar a geração de uma tal quantidade, capaz de regular a morte celular programada de células possuindo expressas na sua superfície receptores P2X₇ aberrantes ou não funcionais.

A quantidade farmacologicamente efectiva do anticorpo ou epítipo irá variar de acordo com o paciente e a natureza da doença ou estado. Estas variáveis podem ser verificadas por um perito na técnica.

A composição farmacêutica da invenção poderá ser administrada em conjunção com um veículo farmacêuticamente aceitável, que poderá ser qualquer um daqueles conhecidos na técnica ou delineado aqui adiante e adequado para a utilização pretendida. Assim como os veículos, as composições farmacêuticas da invenção poderão incluir outros componentes, incluindo corantes, conservantes, tampões e anti-oxidantes, por exemplo.

A composição farmacêutica da invenção poderá tomar qualquer forma desejada e poderá ser administrada, por exemplo, na forma de um unguento, creme, solução, suspensão, pó, comprimido, cápsula, supositório ou pessário.

A composição farmacêutica da invenção poderá ser administrada por qualquer via adequada, que poderá incluir administração oral, parentérica, intravenosa, intramuscular, subcutânea ou tópica.

A invenção também providencia um método de tratar ou prevenir uma doença ou estado num paciente, o método incluindo administrar ao paciente uma composição farmacêutica de acordo com a invenção.

A invenção também providencia a utilização da composição farmacêutica da invenção, no tratamento ou prevenção de uma doença ou estado, num paciente.

Será aparente para um perito na técnica que o padrão de utilização da composição farmacêutica da invenção poderá necessitar ser alterado para um efeito óptimo. Poderá ser necessário ter em conta a natureza da doença ou do estado assim como a sua gravidade.

O terceiro aspecto da invenção foca na expressão de ATPases (enzimas) que controlam o fornecimento de ATP aos receptores P2X₇, por exemplo nas células B de um paciente possuindo linfoma maligno. Os receptores P2X₇ de abertura de canal em leucócitos são terminados através da rápida hidrólise de agonista de ATP por ecto-ATPases e ecto-ATPdifosfohidrolases (ecto-ATPDases). Estas enzimas regulam numerosos processos fisiológicos que estão dependentes do ATP. A especificidade para o substrato da ATPase e a actividade da ATPDase em linfócitos indica a presença nos linfócitos de mais que um tipo na superfície celular, incluindo CD39. A proliferação de uma ou mais destas ATPases ou ATPDases poderá limitar o fornecimento de ATP necessário para controlar a formação de poro de P2X₇ e a subsequente morte celular programada necessária para regular os números de célula B.

Semelhantemente, crê-se que, no caso de IBS, a proliferação de ATPases poderá contribuir para a ausência de ligação adequada do agonista de ATP aos receptores P2X₇.

Concordantemente, neste terceiro aspecto, a invenção providencia uma preparação para tratamento ou prevenção de uma doença ou estado num paciente, a preparação incluindo uma ou mais substâncias adaptadas para regular a expressão de ATPases que controlam o fornecimento de ATP aos receptores P2X₇ nas células ou tecido do paciente. A invenção também providencia um método de tratar ou prevenir uma doença ou estado num paciente, o método incluindo o passo de administrar ao paciente uma preparação incluindo um ou mais substâncias adaptadas para regular a expressão de ATPases que controlam o fornecimento de ATP aos receptores P2X₇ nas células ou tecido do paciente.

Exemplos de tais ATPases poderão ser CD39 ou CD73.

Uma tal substância poderá tomar a forma de um análogo de ATP, preferencialmente não hidrolisável, e específico for P2X₇, ou de outra substância que inibe a acção de ATPases locais esgotando a disponibilidade de ATP para o sítio de ligação ao P2X₇. A preparação poderá estar na forma de um anticorpo humanizado dirigido especificamente contra receptores P2X₇ não funcionais.

A doença ou estado é preferencialmente o linfoma maligno ou IBS mas a invenção poderá também estender-se a outras doenças ou estados, incluindo outros cancros da célula epitelial ou sangue ou infecções virais e outras patológicas.

No caso de linfoma maligno, as ATPases controlam o fornecimento local de ATP aos receptores P2X₇ de modo a reduzir a concentração de ATP disponível para se ligar aos receptores P2X₇ e assim desactivá-los conduzindo a uma redução significativa na morte de célula B programada. Estas ATPases poderão ser especificamente expressas na superfície das células B e parecem estar sobre-expressas no linfoma maligno. Preferencialmente, a aplicação de um inibidor específico de ATPase poderá ser utilizada para regular a disponibilidade do ATP nos receptores P2X₇, de modo a regular a morte de célula B programada.

Para o tratamento de linfoma maligno, a substância poderá incluir um agonista sintético capaz de bloquear ATPases ou ATPDases, da forma de agonista de P2X₇ não hidrolisável.

Em relação à síndrome do intestino irritável, a administração da preparação da invenção pretende restaurar a função do receptor que poderá ser esgotado através da sobreactividade do músculo subjacente à região afectada da mucosa. A preparação da invenção poderá actuar na mucosa directamente para remover estes receptores não funcionais e portanto restaurar mecanismos segregadores gastrointestinais normais locais. O tratamento terapêutico tem o objectivo de restaurar o fornecimento local de ATP aos receptores não funcionais, de modo que a função receptora normal seja restaurada. As consequências do controlo da função receptora incluem restauração do controlo normal de secreções gastrointestinais e peristalse. Isto poderá ser conseguido por aplicação de fornecimento entérico ou sistémico de agonista específico para P2X₇ sintético, preferencialmente não hidrolisável por ATPases, por aplicação sistémica de um anticorpo dirigido contra receptores P2X₇ não funcionais, preferencialmente um pequeno anticorpo específico humanizado para remover os receptores não funcionais, deixando apenas receptores funcionais.

Se as anormalidades de peristalse no músculo liso subjacente forem responsáveis pela destruição da disponibilidade local de ATP para se ligar aos receptores P2X₇ normais, o tratamento poderá envolver a restauração deste fornecimento natural de agonista por meio de um limite na absorção ou utilização de ATP pelo músculo liso através da aplicação de um tratamento para limitar temporariamente a motilidade do intestino.

A invenção também providencia uma composição farmacêutica para tratamento de uma doença ou estado, a composição

incluindo uma quantidade farmacologicamente efectiva de uma ou mais substâncias adaptadas para regular a expressão de ATPases (enzimas) que controlam o fornecimento de ATP aos receptores P2X₇.

A invenção em todos os seus aspectos estende-se a tais aplicações semelhantes que poderão ser feitas noutros estados médicos nos quais os receptores P2X₇ aberrantes estão envolvidos como um resultado de infecção viral em que o vírus é protegido na célula infectada por sobre-expressão do receptor P2X₇ não funcional ou onde tais receptores estão sobre-expressos a partir do estado de célula normal.

A invenção também providencia um método para tratar a síndrome de intestino irritável, compreendendo administrar a um paciente uma composição farmacêutica como definido acima.

A invenção também providencia a utilização de uma tal composição farmacêutica no tratamento de síndrome de intestino irritável.

O padrão de utilização de um ou mais dos agentes farmacologicamente efectivos acima poderá necessitar ser alterado para um efeito óptimo.

Expressa de outro modo, a invenção providencia um método para tratar a síndrome de intestino irritável, o método incluindo administrar uma composição adaptada para restaurar a função do receptor P2X₇. A função do receptor poderá ter sido destruída através de sobreactividade do músculo subjacente à região afectada da mucosa. A

composição poderá ser a mesma que a mencionada acima para a substância incluída na preparação da invenção.

Num aspecto adicional, a invenção providencia um método para distinguir entre diferentes conformações de proteínas por utilização de um epítipo capaz de provocar a geração de um anticorpo, ou o próprio anticorpo, para efectivar resultados farmacêuticos específicos (imunização activa assim como passiva) a partir da ligação a todos os membros das proteínas com uma conformação seleccionada. Um exemplo disto seria proteínas prião na conformação que conduz ao estado vCJD. A forma anormal da proteína poderia ser atingida por um anticorpo ou epítipo específico provocando a geração do anticorpo, preferencialmente humanizado e reduzido no tamanho para um efeito farmacológico óptimo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra a sequência de aminoácidos do receptor P2X₇ humano (técnica antecedente). As sequências 65 a 81 e 200 a 216 estão sublinhadas e estão referidas adiante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Para criar o anticorpo para o P2X₇ não funcional, o epítipo utilizado foi a sequência 200 a 216 na Figura 1, contendo uma Cys a 216.

Para criar o anticorpo para ambos os P2X₇ funcional e não funcional, o epítipo utilizado foi a sequência 65 a 81 na Figura 1, ao qual foi adicionado uma Cys N-terminal.

Os resíduos Cys nos epítipos foram acoplados através de uma maleimidocaproil-N-hidroxisuccinimida (MCS) reticulante para veículo de toxina difteria (DT) com dez epítipos de

péptido ligados a cada veículo DT, para manter a estabilidade conformacional e providenciar uma estrutura antigénica maior. Estes epítomos conjugados foram utilizados como os antígenos para injeção em várias espécies animais (ovelha, coelho e murganho) para criar anticorpos específicos para os epítomos, da maneira usual.

O procedimento para criar anticorpos está bem documentado na técnica antecedente através da utilização de misturas antígeno/adjuvante injectadas em animais em alturas particulares. Os exemplos específicos para criar os anticorpos são estabelecidos adiante:

Exemplo 1

Anticorpos anti-P2X₇ de ovelha

500 µg de conjugado (aproximadamente 100 µg de epítomo P2X₇) foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para 0,8 ml e foram sujeitos a emulsão com 1,2 ml de adjuvante Completo de Freund. As ovelhas foram injectadas em sítios múltiplos subcutaneamente e intramuscularmente com a emulsão antígeno/adjuvante. Oito semanas mais tarde as ovelhas foram injectadas novamente com a mesma quantidade de conjugado emulsionado com adjuvante Incompleto de Freund em sítios múltiplos. Isto foi repetido 4 semanas mais tarde e os animais foram sangrados a partir da veia jugular. O soro recolhido foi testado relativamente à especificidade de anticorpo. As ovelhas foram em seguida rotineiramente injectadas e sangradas com intervalos de oito semanas para providenciar um depósito de soro contendo os anticorpos específicos.

Outras ovelhas foram injectadas com a mesma dose de antígeno conjugado com calendarização semelhante à acima mas foi utilizado um adjuvante diferente. Nestes animais, 0,7 ml do antígeno diluído foram misturados com 0,1 ml de uma solução Quill A / Dextrano DEAE (2,5 mg Quill A + 25 mg Dextrano DEAE por ml de PBS) e 1,2 ml de ISA50 Montanide. A emulsão foi injectada em sítios múltiplos subcutaneamente e intramuscularmente. Os anticorpos produzidos utilizando este adjuvante produziram as mesmas especificidades que aqueles produzidos utilizando o adjuvante de Freund.

Exemplo 2

Anticorpos anti-P2X₇ de coelho

Os anticorpos foram criados em coelhos utilizando os mesmos dois adjuvantes como com as ovelhas e as mesmas calendarizações de injeção, sendo a única diferença que foram utilizadas quantidades de 300 µg do conjugado para a injeção. Os anticorpos criados tiveram as mesmas especificidades que aqueles produzidos nas ovelhas e poderiam discriminar prontamente entre os epítomos contra os quais foram criados.

Exemplo 3

Anticorpos anti-P2X₇ de murganhos

Os anticorpos foram criados em murganhos contra os epítomos conjugados e também contra o epítomo não conjugado do epítomo P2X₇ não funcional (que é capaz de discriminar os receptores que não podem formar poros e assim falham em ser apoptóticos).

Nestas experiências, o adjuvante utilizado foi o produto QAIGEN Pty Ltd, IMMUNEASY™ que contém o produto estimulador imunológico CpG DNA (marca registada da Coley Pharmaceutical Group Inc.)

5 µg de epítopo ou epítopo conjugado foram diluídos em 70 µl de PBS e 30 µl de adjuvante IMMUNEASY™. Os murganhos foram injectados em sítios múltiplos subcutaneamente e intramuscularmente. Este regime foi repetido duas semanas mais tarde e novamente após duas semanas adicionais. Os murganhos foram sangrados oito dias após a terceira injeção. Os anticorpos criados em murganhos por este método foram novamente capazes de discriminar entre os diferentes epítopos P2X₇ e os anticorpos contra o epítopo não funcional P2X₇ originaram os mesmos resultados que aqueles criados em ovelhas e coelhos. Em adição, os anticorpos criados contra o epítopo não funcional não conjugado foram também capazes de reconhecer este epítopo em tecido tumoral.

Como os Exemplos acima ilustram, os anticorpos para vários epítopos do receptor P2X₇ em diferentes espécies e utilizando diferentes adjuvantes poderão ser criados consistentemente. Em particular, poderão ser criados rotineiramente anticorpos para um epítopo do receptor P2X₇ o qual identifica o receptor no estado não funcional, no qual não pode formar um poro e levar a cabo a sua função apoptótica sob estados fisiológicos normais.

Exemplo 4

O anticorpo que detecta o P2X₇ não funcional foi testado através da ligação do anticorpo a células expressando o P2X₇ (humano) com função conhecida como revelado através da

capacidade do P2X₇ para absorver etídio ou rubídio. Estes canais proteicos P2X₇ poderão ter sido mutados no par base 1513, de modo que os canais não formariam poros apoptóticos. Estes receptores P2X₇ não funcionais e semelhantes expressos em linfócitos B malignos também ligaram o anticorpo em citometria de fluxo e em histoquímica imunológica comum enquanto que as células expressando o P2X₇ funcional normal (capaz de absorver cálcio, etídio e rubídio com grandes fluxos) foram incapazes de ligar o anticorpo, porque o epítipo escolhido para detectar os receptores não funcionais esteve indisponível nos receptores funcionais. O Pro210 adoptou a conformação *cis* nos receptores não funcionais e foi esta conformação especificamente que foi no epítipo conjugado utilizado para criar o anticorpo. O Pro210 esteve na conformação *trans* nos receptores que mostraram ser funcionais. Isto foi um resultado da ligação de ATP (trifosfato de adenosina) ao receptor P2X₇. Quando o ATP esteve ligado, o Pro210 num segmento imediatamente adjacente ao sítio de ligação de ATP adoptou uma configuração *trans*.

Isto foi verificado utilizando mutagenese dirigida para o sítio para a variar o Pro210 para uma Ala que foi fixada na configuração *trans* e esta proteína mutante foi descoberta ser completamente funcional e incapaz para ligar o anticorpo criado para detectar o receptor não funcional.

Exemplo 5

A verificação adicional da especificidade do anticorpo para detectar o receptor não funcional ocorreu em experiências que marcaram macrófagos expressando P2X₇. Os macrófagos ligaram o anticorpo aos receptores P2X₇ utilizando o

anticorpo universal P2X₇ mas não ligaram o anticorpo ao P2X₇ não funcional até terem sido expostos a células neoplásicas tais como as células de hibridoma de murganho. O contacto entre os macrófagos e as células de hibridoma induziram a expressão nos macrófagos de P2X₇ não funcional que foi detectado pelo anticorpo para P2X₇ não funcional assim como pelo anticorpo P2X₇ universal.

Os macrófagos e linfócitos de célula B extraídos a partir de pacientes com linfoma maligno foram testados e todas estas células ligaram o anticorpo ao P2X₇ universal assim como o anticorpo aos receptores P2X₇ não funcionais, verificando que P2X₇ foi não funcional em todas as células neoplásicas detectadas, com o poro apoptótico formado por P2X₇ funcional incapaz de formar e assim induzir apoptose em células neoplásicas.

Todas as tais células neoplásicas de todos os cancros de célula epitelial em seres humanos tais como da próstata, mama, intestino, pele, estômago, colo e outros assim como linfoma maligno, leucemia linfocítica crónica e tumores cerebrais, assim como os mesmos tumores noutros mamíferos que foram testados, incluindo da mama e próstata em cão e da pele em gato assim como todas as células de hibridoma de murganho, todos expressam o mesmo P2X₇ não funcional. A semelhança na sequência entre ser humano, rato, gato, cão e murganho nos epítomos escolhidos é suficiente para a identificação positiva ser feita em todos os casos acima. Isto revela que o mecanismo de cancro nestes mamíferos é idêntico em que todas as células neoplásicas expressam receptores P2X₇ não funcionais incapazes de formar poros apoptóticos que matariam normalmente a célula quando

activados. Deste modo as células neoplásicas tornam-se imortais, sendo a apoptose desligada.

Exemplo 6

Como verificação adicional que as células neoplásicas tais como os linfócitos de célula B afectada are incapazes de induzir apoptose através da função P2X₇, as células B de pacientes com leucemia contendo os receptores P2X₇ não funcionais foram incubadas com ATP 5 mM durante 2 horas em cultura. Os resultados foram que todos os receptores não funcionais foram forçados pelo excesso de ATP a abrir e induzir apoptose que matou as células afectadas.

Exemplo 7

Como verificação adicional que o anticorpo liga selectivamente células neoplásicas, a pele de pacientes com carcinomas celulares basais (BCC) foi tratada com o anticorpo para os receptores P2X₇ não funcionais, suspensos numa base de creme inerte e aplicados à lesão e pele circundante (referência ao Exemplo 10, adiante). Ao fim de 1 semana de aplicação diária do anticorpo tópico, todos os vestígios dos BCCs tinham desaparecido sem efeito na pele circundante uma vez que na pele normal faltavam os receptores.

APLICAÇÕES DE DIAGNÓSTICO

São aqui providenciadas descrições em termos de exemplo, utilizando o anticorpo P2X₇ não funcional específico em animais e demonstrando a aplicação universal da sonda e método da invenção no diagnóstico da maioria dos cancros em seres humanos e outros mamíferos.

No tecido da próstata de seres humanos e mamíferos, tais como gatos e cães, quando o anticorpo da invenção é utilizado para diagnóstico, não é obtida marcação na ausência de lesões cancerosas ou pré-cancerosas. No entanto, o método de diagnóstico da invenção revela os primeiros sinais de variação neoplásica enquanto que não existem ainda variações morfológicas acompanhantes detectáveis por manchamento com H&E.

Neste estágio, é necessário manchar relativamente ao receptor as unidades que primeiro aparecem nos núcleos de células epiteliais. Estas migram para o citoplasma em estágios posteriores da doença, actuando como um efeito de campo ao longo da próstata, de modo que seja necessário menos tecido para a biópsia para se ter a certeza da existência de um tumor. Em estágios superiores da doença, o manchamento torna-se mais confinado ao epitélio apical.

Semelhantemente, outros cancros de célula epitelial, tais como da mama, pulmão, cólon e pele em seres humanos e noutros mamíferos, tais como gatos e cães, podem ser detectados com margens uma vez que já não existe um efeito de campo claro nestes outros tecidos.

O mesmo estágio de desenvolvimento é observado nestes outros tecidos, tais como mama e colo, com manchamento nuclear precedendo o manchamento citoplásmico, enquanto que o tecido normal não é manchado. Os canais e lóbulos afectados no tecido da mama são prontamente detectados devido ao efeito de campo local no sistema de canais afectado individual, na mama mesmo quando a morfologia normal sugere que não é cancro. Os canais não afectados adjacentes aparecem não manchados. Semelhantemente, os

nodos linfáticos afectados, tecido drenante directamente contendo um tumor, exibem sinais do tumor através do efeito de campo dos linfócitos afectados. Assim, podem ser detectados nodos sentinela sem que exista qualquer difusão metastática celular do nodo.

Os cancros da pele, tais como carcinoma da célula basal e carcinoma da célula escamosa assim como melanomas malignos exibem manchamento positivo relativamente a receptores não funcionais e componentes de canal (monómeros) em camadas de queratinócito e melanócito com margens transparentes para além das quais a pele normal não é marcada em ambas a epiderme e no interior profundo da derme.

Todas as linhas celulares de cancro mamífero testadas tais como da próstata (PC3) e mama (MCF7) de seres humanos e hibridomas de roedores são positivas relativamente aos receptores não funcionais na superfície celular de modo que a apoptose é inibida nestas células neoplásicas. A aplicação geral deste diagnóstico é vista como um modo do mesmo marcador em células de hibridoma de murganho exibindo a natureza ubíqua do receptor noutros tipos de animais para além do homem. Os linfócitos de célula B humana normal revelaram que os receptores P2X₇ funcionais são expressos na superfície da célula, de modo a permitir a apoptose quando necessário, enquanto que os linfócitos da célula B humana de pacientes com linfoma maligno mostram que os receptores P2X₇ não funcionais são expressos na superfície da célula, de modo a encurtar a apoptose.

APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Numa abordagem selectiva este confórmero P2X₇ não funcional aparentemente ubíquo expresso na superfície celular de

células neoplásicas na tentativa de sofrer apoptose poderá ser utilizado para a maioria dos cancros em seres humanos e outros mamíferos. Os exemplos são apresentados adiante:

Exemplo 8

As células de hibridoma de murganho foram cultivadas numa base de macrófago na presença e na ausência de anticorpo purificado por afinidade para P2X₇ não funcional. A contagem celular revelou que durante 4 dias enquanto que as células co-incubadas com IgG normal purificado cresceram de 1×10^4 a 7×10^4 , a co-incubação com o anticorpo P2X₇ não funcional manteve a contagem celular apenas em $1,5 \times 10^4$.

Exemplo 9

Este exemplo mostra que os anticorpos criados contra o epítipo não funcional do receptor P2X₇ podem inibir a formação de tumor *in vivo*.

Como mostrado acima, os anticorpos criados em ovelhas contra o epítipo P2X₇ não funcional identificaram este receptor apoptótico P2X₇ não funcional na superfície celular de hibridoma de murganho. A adição deste anticorpo às culturas celulares de hibridoma retardou o crescimento das células. As células de hibridoma de murganho quando injectadas nas estirpes de murganho consanguíneas preparadas irão provocar a formação de tumor.

Nesta experiência, três grupos de 10 murganhos fêmeas Balb-c recebeu cada um os tratamentos seguintes:

Grupo 1: 10 murganhos cada um injectado intraperitonealmente (IP) com 1×10^6 células de hibridoma em 0,5 ml de meio de cultura celular no

Dia 1. Nos Dias 2 e 3, receberam uma injeção intraperitoneal de 0,5 ml de meio de cultura celular.

Grupo 2: 10 murganhos cada um injectado intraperitonealmente (IP) com 1×10^6 células de hibridoma em 0,5 ml de meio de cultura celular contendo 1 mg de IgG de ovelha purificado no Dia 1. Nos Dias 2 e 3, foram injectados com 0,5 ml de meio de cultura celular contendo 1 mg de IgG de ovelha purificado.

Grupo 3: 10 murganhos cada um injectado intraperitonealmente (IP) com 1×10^6 de células de hibridoma em 0,5 ml de meio de cultura celular contendo 1 mg de IgG epítipo anti-P2X₇, não funcional de ovelha purificado no Dia 1. Nos Dias 2 e 3, receberam uma injeção adicional de 0,5 ml de meio de cultura celular contendo 1 mg de IgG anti-P2X₇ de ovelha purificado.

Os murganhos de todos os grupos foram sacrificados no Dia 11 e examinados relativamente à presença de tumor. Os tumores foram extirpados e pesados.

Os resultados foram como se segue:

Grupos	Observações	Peso Médio do Tumor por murganho (\pm SD) (g)
1: Controlo 1	9 de 10 murganhos tinham tumores.	3,98 \pm 1,1
2: Controlo 2	10 de 10 murganhos tinham tumores	2,93 \pm 0,9
3: Experimental	9 de 10 murganhos tinham tumores	1,13 \pm 0,4

Uma análise de variância revelou uma diferença significativa no peso de tumor entre os grupos (probabilidade $< 0,01$). O grupo experimental tratado com os anticorpos anti-P2X₇ não funcional foi significativamente diferente ($p < 0,01$) dos dois grupos de controlo. Isto é, o tratamento com os anticorpos contra o epítopo P2X₇ não funcional reduziu significativamente a quantidade de tumor nos animais experimentais.

Exemplo 10

O anticorpo purificado por afinidade específica (para aumentar grandemente a especificidade) foi aplicado a 3 carcinomas de célula basal humana ("BCC") quer como um líquido mantido no local durante 7 dias ou suspenso numa base de creme dimeticone. Não foram detectáveis vestígios das lesões BCC após o tratamento, enquanto que a pele de controlo ficou inteiramente não afectada devido à ausência do alvo proteico.

Crê-se que a aplicação a pacientes em geral envolveria a produção de um anticorpo monoclonal humanizado (tal como herceptina) de modo que os cancros internos poderiam ser tratados com a mesma eficácia que é revelada com a aplicação tópica. Todo o P2X₇ funcional normal expresso nas superfícies celulares de células tais como linfócitos necessitariam permanecer não afectadas pela presença do anticorpo para evitar efeitos secundários.

O anticorpo deveria portanto ligar-se apenas a proteínas expressas na superfície celular de células tentando mas incapazes de iniciar apoptose. Assim todas as células focalizadas seriam apenas aquelas tentando matar-se a elas próprias através de morte celular programada, incluindo

células neoplásicas. Os receptores P2X₇ nestas células, particularmente células neoplásicas, estariam num estado não funcional ou destruído pelo ATP.

IMUNIZAÇÃO ACTIVA

A imunização activa poderá também ser utilizada para fins terapêuticos. Neste caso os seres humanos ou outros mamíferos necessitam ser imunizados contra um epítopo específico ou epítopos que estão numa conformação que mima a conformação adoptada apenas pelos receptores na sua forma não funcional (destruída pelo ATP) na superfície da célula. A flexibilidade conformacional que inclui a exposição parcial de uma forma de epítopo que está presente em receptores funcionais deverá ser evitada. A configuração *cis* do epítopo Gly200-Thr215 como um exemplo deverá ser fixada antes da utilização através de meios adequados. Como prova adicional que este conceito é ouvido é a observação que numerosos animais incluindo murganhos, coelhos e ovelhas usados para criar os anticorpos não foram comprometidos imunologicamente. Nenhum destes muitos animais desenvolveu alguma vez quaisquer tumores.

APPLICABILIDADE INDUSTRIAL

A invenção possui em todos os seus aspectos aplicação nos campos de medicina e saúde humana e veterinária, com o potencial de permitir um diagnóstico precoce e preciso de doenças e um tratamento efectivo, que em muitos casos é muito menos invasivo ou traumático que aqueles disponíveis na técnica antecedente.

Lisboa, 24 de Março de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo que se liga a um domínio extracelular de um receptor P2X₇ possuindo uma sequência de aminoácidos como ilustrado na SEQ ID NO: 1 na qual a prolina na posição 210 está numa conformação *cis*, e em que o anticorpo não se liga a um domínio extracelular de um receptor P2X₇ possuindo uma sequência de aminoácidos como ilustrado na SEQ ID NO: 1 na qual a prolina na posição 210 está numa conformação *trans*.
2. Um anticorpo de acordo com a Reivindicação 1, em que o anticorpo se liga no epítopo do receptor P2X₇ incluindo Pro210 da SEQ ID NO: 1.
3. Um anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 ou Reivindicação 2, em que o anticorpo se liga a um epítopo compreendendo a sequência de aminoácidos Gly200 a Thr215 da SEQ ID NO: 1.
4. Um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que o anticorpo é seleccionado a partir do grupo constituído por: um anticorpo policlonal; um anticorpo monoclonal; um anticorpo recombinante; um anticorpo humanizado; um anticorpo humano; e um fragmento de anticorpo.
5. Um péptido para gerar um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o péptido compreende um fragmento de aminoácido da SEQ ID NO: 1, caracterizado por o referido péptido incluir prolina 210 numa conformação *cis*.

6. Um péptido de acordo com a Reivindicação 5, em que o referido fragmento de aminoácido compreende Gly200 a Thr215 da SEQ ID NO: 1.

7. Um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4, para utilizar na detecção de uma doença ou estado.

8. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4, para o fabrico de um agente de diagnóstico para detectar pré-neoplasia.

9. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4, para o fabrico de um agente de diagnóstico para detectar um cancro de célula epitelial.

10. Utilização de acordo com a Reivindicação 9, em que o cancro de célula epitelial é seleccionado a partir do grupo constituído por cancros da próstata, mama, pele, pulmão, colo, útero, estômago, esófago, bexiga, cólon, e vaginal.

11. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4, para o fabrico de um agente de diagnóstico para detectar um cancro no sangue.

12. Utilização de acordo com a Reivindicação 11, em que o cancro no sangue é linfoma maligno.

13. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4, para o fabrico de um agente de diagnóstico para detectar a síndrome de intestino irritável.

14. Um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4 ou um péptido de acordo com a

Reivindicação 5 ou 6, para utilizar no tratamento ou prevenção de uma doença ou estado.

15. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4 ou um péptido de acordo com a Reivindicação 5 ou 6, para o fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir pré-neoplasia.

16. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4 ou um péptido de acordo com a Reivindicação 5 ou 6, para o fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir um cancro de célula epitelial.

17. Utilização de acordo com a Reivindicação 16, em que o cancro de célula epitelial é seleccionado a partir do grupo constituído por cancros da próstata, mama, pele, pulmão, colo, útero, estômago, esófago, bexiga, cólon e vaginal.

18. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4 ou um péptido de acordo com a Reivindicação 5 ou 6, para o fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir um cancro no sangue.

19. Utilização de acordo com a Reivindicação 18, em que o cancro no sangue é o linfoma maligno.

20. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-4 ou um péptido de acordo com a Reivindicação 5 ou 6, para o fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir a síndrome de intestino irritável.

Lisboa, 24 de Março de 2009

1 MET-PRO-ALA-CYS-CYS-SER-CYS-SER-ASP-VAL-PHE-GLN-TYR-GLU-THR-ASN-LYS-VAL-THR-ARG
 2 ILE-GLN-SER-MET-ASN-TYR-GLY-THR-ILE-LYS-TRP-PHE-PHE-HIS-VAL-ILE-ILE-PHE-SER-TYR
 4 VAL-CYS-PHE-ALA-LEU-VAL-SER-ASP-LYS-LEU-TYR-GLN-ARG-LYS-GLU-PRO-VAL-ILE-SER-SER
 6 VAL-HIS-THR-LYS-VAL-LYS-GLY-ILE-ALA-GLU-VAL-LYS-GLU-GLU-ILE-VAL-GLU-ASN-GLY-VAL
 8 ILYS-LYS-LEU-VAL-HIS-SER-VAL-PHE-ASP-THR-ALA-ASP-TYR-THR-PHE-PRO-LEU-GLN-GLY-ASN
 10 I SER-PHE-PHE-VAL-MET-THR-ASN-PHE-LEU-LYS-THR-GLU-GLY-GLN-GLU-GLN-ARG-LEU-CYS-PRO
 12 I GLU-TYR-PRO-THR-ARG-ARG-THR-LEU-CYS-SER-SER-ASP-ARG-GLY-CYS-LYS-LYS-GLY-TRP-MET
 14 I ASP-PRO-GLN-SER-LYS-GLY-ILE-GLN-THR-GLY-ARG-CYS-VAL-VAL-HIS-GLU-GLY-ASN-GLN-LYS
 16 I THR-CYS-GLU-VAL-SER-ALA-TRP-CYS-PRO-ILE-GLU-ALA-VAL-GLU-GLU-ALA-PRO-ARG-PRO-ALA
 18 I LEU-LEU-ASN-SER-ALA-GLU-ASN-PHE-THR-VAL-LEU-ILE-LYS-ASN-ASN-ILE-ASP-PHE-PRO-GLY
 20 I HIS-ASN-TYR-THR-THR-ARG-ASN-ILE-LEU-PRO-GLY-LEU-ASN-ILE-THR-CYS-THR-PHE-HIS-LYS
 22 I THR-GLN-ASN-PRO-GLN-CYS-PRO-ILE-PHE-ARG-LEU-GLY-ASP-ILE-PHE-ARG-GLU-THR-GLY-ASP
 24 I ASN-PHE-SER-ASP-VAL-ALA-ILE-GLN-GLY-GLY-ILE-MET-GLY-ILE-GLU-ILE-TYR-TRP-ASP-CYS
 26 I ASN-LEU-ASP-ARG-TRP-PHE-HIS-HIS-CYS-HIS-PRO-LYS-TYR-SER-PHE-ARG-ARG-LEU-ASP-ASP
 28 I LYS-THR-THR-ASN-VAL-SER-LEU-TYR-PRO-GLY-TYR-ASN-PHE-ARG-TYR-ALA-LYS-TYR-TYR-LYS
 30 I GLU-ASN-ASN-VAL-GLU-LYS-ARG-THR-LEU-ILE-LYS-VAL-PHE-GLY-ILE-ARG-PHE-ASP-ILE-LEU
 32 I VAL-PHE-GLY-THR-GLY-GLY-LYS-PHE-ASP-ILE-ILE-GLN-LEU-VAL-VAL-TYR-ILE-GLY-SER-THR
 34 I LEU-SER-TYR-PHE-GLY-LEU-ALA-ALA-VAL-PHE-ILE-ASP-PHE-LEU-ILE-ASP-THR-TYR-SER-SER
 36 I ASN-CYS-CYS-ARG-HIS-HIS-ILE-TYR-PRO-TRP-CYS-LYS-CYS-CYS-GLN-PRO-CYS-VAL-VAL-ASN
 38 I GLU-TYR-TYR-TYR-ARG-LYS-LYS-CYS-GLU-SER-ILE-VAL-GLU-PRO-LYS-PRO-THR-LEU-LYS-TYR
 40 I VAL-SER-PHE-VAL-ASP-GLU-SER-HIS-ILE-ARG-MET-VAL-ASN-GLN-GLN-LEU-LEU-GLY-ARG-SER
 42 I LEU-GLN-ASP-VAL-LYS-GLY-GLN-GLU-VAL-PRO-ARG-PRO-ALA-MET-ASP-PHE-THR-ASP-LEU-SER
 44 I ARG-LEU-PRO-LEU-ALA-LEU-HIS-ASP-THR-PRO-PRO-ILE-PRO-GLY-GLN-PRO-GLU-GLU-ILE-GLN
 46 I LEU-LEU-ARG-LYS-GLU-ALA-THR-PRO-ARG-SER-ARG-ASP-SER-PRO-VAL-TRP-CYS-GLN-CYS-GLY
 48 I SER-CYS-LEU-PRO-SER-GLN-LEU-PRO-GLU-SER-HIS-ARG-CYS-LEU-GLU-GLU-LEU-CYS-CYS-ARG
 50 I LYS-LYS-PRO-GLY-ALA-CYS-ILE-THR-THR-SER-GLU-LEU-PHE-ARG-LYS-LEU-VAL-LEU-SER-ARG
 52 I HIS-VAL-LEU-GLN-PHE-LEU-LEU-LEU-TYR-GLN-GLU-PRO-LEU-LEU-ALA-LEU-ASP-VAL-ASP-SER
 54 I THR-ASN-SER-ARG-LEU-ARG-HIS-CYS-ALA-TYR-ARG-CYS-TYR-ALA-THR-TRP-ARG-PHE-GLY-SER
 56 I GLN-ASP-MET-ALA-ASP-PHE-ALA-ILE-LEU-PRO-SER-CYS-CYS-ARG-TRP-ARG-ILE-ARG-LYS-GLU
 58 I PHE-PRO-LYS-SER-GLU-GLY-GLN-TYR-SER-GLY-PHE-LYS-SER-PRO-TYR

FIGURA 1

Sequência do receptor P2X₇ humano