



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102143978 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 18

(21) 申请号 200980134521. 3	C07K 14/05 (2006. 01)
(22) 申请日 2009. 07. 03	C07K 16/30 (2006. 01)
(30) 优先权数据 2008903451 2008. 07. 04 AU	(56) 对比文件 WO 2008043145 A1, 2008. 04. 17,
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2011. 03. 03	审查员 杨振宇
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/AU2009/000869 2009. 07. 03	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02010/000041 EN 2010. 01. 07	
(73) 专利权人 生物权威国际有限公司 地址 澳大利亚新南威尔士	
(72) 发明人 J·A·巴登 A·基得利-拜尔德	
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227 代理人 顾晋伟 韩宏星	
(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006. 01) A61K 38/17 (2006. 01) A61K 39/395 (2006. 01) A61P 35/00 (2006. 01)	权利要求书1页 说明书28页 序列表5页 附图6页

(54) 发明名称
抗 P2X₇ 肽和表位

(57) 摘要
本发明涉及对癌症中所涉及的非功能性 P2X₇ 受体上新表位的鉴定。该表位包含来自该三亚基受体内两个相邻单体的区域。描述了结合该表位的抗体以及产生所述抗体的肽。所述抗体和肽可用于诊断和治疗癌症。

1. 结合 P2X₇ 受体表位的分离的或基本上经纯化的抗体,所述表位由下列形成:
 - 来自 P2X₇ 受体第一单体的包含 SEQ ID NO:1 之 200 至 211 位氨基酸残基的第一区域;和
 - 来自所述受体第二单体的包含 SEQ ID NO:1 之 296 至 306 位氨基酸残基的第二区域;其中所述第一和第二区域通过所述受体单体 SEQ ID NO:1 第 210 位残基的顺式异构化在该受体中形成;并且
- 其中所述第一和第二区域在该受体中彼此相邻排列,从而允许所述抗体的抗原结合位点与形成所述表位的所述第一和第二区域结合。
2. 根据权利要求 1 的抗体,其中所述抗体是选自以下的形式:Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fd、Fv 片段、双功能抗体、线性抗体、单链抗体分子以及由抗体片段形成的多特异性抗体。
3. 根据权利要求 1 或 2 的抗体,其中所述抗体是二价或双特异性的。
4. 根据权利要求 1 或 2 的抗体,其中所述抗体是二聚体、三聚体或其他更高级多聚体的形式。
5. 结合了 P2X₇ 受体上表位的抗体之形式的免疫复合物,其中所述抗体是根据权利要求 1 至 4 任一项分离的或纯化的抗体。
6. 根据权利要求 5 的免疫复合物,其中所述受体的所有表位均与抗体结合。
7. 根据权利要求 5 或 6 的免疫复合物,其中所述受体中少于三个表位被抗体结合。
8. 根据权利要求 5 或 6 的免疫复合物,其中所述复合物含有比受体更多的抗体分子。
9. 根据权利要求 5 或 6 的免疫复合物,其中所述复合物含有比受体更少的抗体分子。
10. 由式:(A)(Xn)(B) 定义的肽,其中:
 - (A) 是 GHNYTTRNILP 的氨基酸序列或其至少 4 个氨基酸的片段;
 - (Xn) 是长 10 至 30 埃的接头,所述接头由一个或多个氨基酸残基组成;
 - (B) 是 AKYYKENNVEK 的氨基酸序列或其至少 4 个氨基酸的片段,其中所述肽可用于产生结合活细胞上非功能性受体但是不结合活细胞上功能性受体的抗体。
11. 根据权利要求 10 的肽,其中所述肽具有下列序列:GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK。
12. 与权利要求 10 或 11 的肽相结合的抗体。
13. 结合了抗体之肽的形式的免疫复合物,其中所述肽是根据权利要求 10 或 11 的肽。
14. 根据权利要求 10 或 11 的肽用于生产结合非功能性 P2X₇ 受体之抗体的用途。
15. 根据权利要求 1-4 和 12 中任一项的抗体在制备用于确定个体是否患有癌症的药物中的用途。
16. 根据权利要求 1-4 和 12 中任一项的抗体在制备用于治疗患癌症个体的药物中的用途。
17. 一种试剂盒,其包含根据权利要求 1-4 和 12 中任一项的抗体,以及任选地包含:
 - 根据权利要求 10 或 11 的肽;
 - 所述试剂盒包含用于诊断或治疗癌症的书面说明。

抗 P2X₇ 肽和表位

技术领域

[0001] 本发明涉及肽、表位以及由其生产单克隆抗体。

背景技术

[0002] 本说明书中对任何现有技术的引用都不视为也不应当视为承认或以任何形式暗示该现有技术构成澳大利亚或任何其他管辖范围中公知常识的一部分,或者可合理地预期该现有技术可由本领域技术人员确定、理解和认为是相关的。

[0003] 嘌呤能 (P2X) 受体为 ATP 门控阳离子选择性通道。每个受体由三个蛋白质亚基或单体构成。迄今为止,已经鉴定出七个编码 P2X 单体的独立基因:P2X₁、P2X₂、P2X₃、P2X₄、P2X₅、P2X₆、P2X₇。

[0004] P2X₇ 受体受到格外关注,因为据了解这些受体的表达局限于具有进行程序性细胞死亡之潜能的细胞,例如胸腺细胞、树突细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和单核细胞。在正常的内稳态中,例如在红细胞上,存在一些 P2X₇ 受体的表达。

[0005] 令人感兴趣的是,已在据了解不能进行程序性细胞死亡的细胞(例如肿瘤前细胞和肿瘤细胞)上发现了这样的 P2X₇ 受体,所述受体含有一个或多个在 Pro210(根据图 1 中的 SEQ ID No:1)处具有顺式异构化的单体并且不具有 ATP 结合功能。此同工型受体已被称为“非功能性”受体。

[0006] 用包含顺式 Pro210 的肽免疫接种产生的抗体结合非功能性 P2X₇ 受体。但是,它们不与能够结合 ATP 的 P2X₇ 受体结合。因此,这些抗体可用于选择性检测许多形式的癌和造血系统癌症以及治疗这些病症中的某些。

[0007] W002/057306A1 和 W003/020762A1 均讨论了用于区分功能性 P2X₇ 受体和非功能性 P2X₇ 受体的单克隆抗体形式的探针。

[0008] 单克隆抗血清具有某些在多克隆抗血清(polysera)中未发现的血清学特征,这使得单克隆抗血清成为用于研究、诊断和治疗的特别有价值的试剂。其中的关键是,与在多克隆抗血清中发现的大多数特异性物质的亲和力相比,单克隆抗体通常具有更高的抗原亲和力。

[0009] 迄今为止,获得产生有用量的针对活细胞上表达之非功能性 P2X₇ 受体的单克隆抗体(尤其是可用于多种诊断和治疗应用的单克隆抗体)的杂交瘤非常困难。此外,就本发明人所知,还未有针对活细胞上的功能性 P2X₇ 受体而产生的任何单克隆抗体。需要这样的试剂,特别是能够区分活细胞上 ATP 结合和非 ATP 结合的 P2X₇ 受体的新抗体。

[0010] 此外,据本发明人所知,抗 P2X₇ 抗体一般不区分 P2X₇ 单体和由这些单体形成的三聚化 P2X₇ 受体。鉴于所述三聚化受体特别地发现于晚期肿瘤组织上,因此,结合该三聚化受体而不结合 P2X₇ 单体的抗体对于癌症分期是有利的。

发明内容

[0011] 本发明涉及用于产生与活细胞上非功能性 P2X₇ 受体结合但不与功能性 P2X₇ 受体

结合之抗体的肽和表位。所述肽还可用于产生与活细胞上功能性 P2X₇ 受体结合但不与非功能性 P2X₇ 受体结合的抗体。本发明还涉及与这些肽结合的抗体、含有这些肽的组合物、使用所述肽产生抗体的方法以及诊断和治疗与非功能性 P2X₇ 受体表达相关之疾病的方法。

[0012] 在某些实施方案中,提供了 P2X₇ 受体的表位,所述表位由以下形成:P2X₇ 受体第一单体区域形式的第一区域;和该受体第二单体区域形式的第二区域;其中所述第一和第二区域在该受体中由受体单体 (SEQ ID No :1) 的第 210 位残基顺式异构化而形成;并且其中所述第一和第二区域在该受体中彼此相邻排列,从而允许抗 P2X₇ 抗体的抗原结合位点与形成所述表位的所述第一和第二区域结合。

[0013] 在另一些实施方案中,提供了具有上述表位的 P2X₇ 受体。通常,所述受体的一个或多个单体在单体 (SEQ ID No :1) 的第 210 位具有顺式异构化。

[0014] 在另一些实施方案中,提供了与 P2X₇ 受体表位相结合的抗体,所述表位由以下形成:P2X₇ 受体第一单体区域形式的第一区域;和该受体第二单体区域形式的第二区域;其中所述第一和第二区域在该受体中由受体单体 (SEQ ID No :1) 的第 210 位残基顺式异构化形成;并且其中所述第一和第二区域在该受体中彼此相邻排列,从而允许该抗体的抗原结合位点与形成所述表位的所述第一和第二区域结合。

[0015] 在一个实施方案中,提供了一种与抗体结合的采用上述表位形式的免疫复合物。

[0016] 在另一个实施方案中,提供了包含 N 端区域和 C 端区域的肽,所述 N 端和 C 端区域各自通过 N 端和 C 端残基来定义,其中:

[0017] - 所述 N 端区域包含序列 HNYTTRNIL (SEQ ID NO :2) 或其至少 4 个残基的片段;

[0018] - 所述 C 端区域包含脯氨酸、丙氨酸或甘氨酸的 C 端残基;

[0019] 其中所述 N 端区域的 C 端残基与所述 C 端区域的 N 端残基共价相连;

[0020] 其中所述 C 端区域的 C 端残基通过长约 10 至 40 埃的接头与其他肽相连;并且

[0021] 其中所述其他肽由序列

[0022] KTTNVS LYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTLKVFGRFDILVFGTGKFD (SEQ ID NO :6) 或其至少 4 个残基的片段组成。

[0023] 在另一个实施方案中,提供了由式:(A) (X_n) (B) 定义的肽,其中:

[0024] - (A) 是氨基酸序列 GHNYTTRNILP (SEQ ID NO :8) 或其至少 4 个氨基酸的片段;

[0025] - (X_n) 是长 10 至 40 埃的接头,所述接头由一个或多个氨基酸残基组成;

[0026] - (B) 是氨基酸序列 AKYYKENNVEK (SEQ ID NO :9) 或其至少 4 个氨基酸的片段。

[0027] 在另一些实施方案中,提供了具有下列序列的肽:GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK (SEQ ID NO :10)。

[0028] 在另一些实施方案中,提供了一种与抗体结合的上文所述肽形式的免疫复合物。通常,所述抗体结合非功能性 P2X₇ 受体但不结合功能性 P2X₇ 受体。

[0029] 在另一些实施方案中,提供了上述肽用于生产用于与非功能性 P2X₇ 受体结合的抗体的用途。

[0030] 在又一些实施方案中,提供了上述抗体用于确定个体是否患有癌症的用途。

[0031] 在又一些实施方案中,提供了上述抗体用于治疗患有癌症的个体的用途。

[0032] 在又一些实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含上述抗体,以及任选的:

[0033] - 如上所述的肽;

[0034] 所述试剂盒包含用于诊断或治疗癌症的书面说明。

具体实施方式

[0035] 下面将详细描述本发明的某些实施方案。虽然与实施方案一起描述了本发明,但是应当理解并不意味着将本发明局限于这些实施方案。相反,本发明旨在覆盖所有替代方式、修改和等同方案,其可包含在权利要求所限定的本发明范围内。

[0036] 本领域技术人员会认识到,许多类似于或等同于本文所述方法和材料的方法和材料均可用于实施本发明。本发明绝不局限于所述的方法和材料。

[0037] 应当理解,本说明书所公开和定义的本发明扩展到由所述文本或附图提及或可从中显而易见得出的两个或更多个单个特征的所有替代性组合。所有这些不同的组合构成本发明的多个替代方面。

[0038] 除了上下文另有需要,否则,本文中使用的术语“包括”和该术语的变化形式(如“包含”、“含有”和“包含有”)并不旨在排除其他添加物、组分、整数或步骤。

[0039] 本文中引用的所有专利和出版物均全文通过引用并入本文。

[0040] 在做出本发明时,可用的针对活细胞上表达的非功能性 P2X₇ 受体的抗 P2X₇ 抗血清全部都是多克隆的。

[0041] 本发明人已鉴定了专门在非 ATP 结合的 P2X₇ 受体(也称为“非功能性受体”)上表达的表位。已发现该表位和形成它的肽可用于产生与活细胞上所表达的非功能性 P2X₇ 受体相结合的单克隆抗体。

[0042] 活细胞结合是非常重要的,因为非功能性 P2X₇ 受体在细胞(例如上皮细胞)中或上的表达被认为是许多癌症(例如上皮癌症及其他病症)的生物标志物。因此,利用结合活细胞的单克隆抗体可提供抗体本身形式或者抗体-细胞毒剂缀合物形式的针对多种以非功能性 P2X₇ 受体表达为特征之疾病的全身性治疗剂。还可提供以非功能性 P2X₇ 受体表达为特征的疾病的体内成像和诊断或监测。

[0043] 本发明人已从本文另外描述的详细分子建模观察到,该表位仅在 P2X₇ 受体(即由 P2X₇ 单体形成的三聚体)上发现。更特别地,该表位跨越三聚 P2X₇ 受体中的相邻 P2X₇ 单体。因此,没有排列成非功能性三聚化受体的各 P2X₇ 单体不含有该表位。这有利地允许人们对肿瘤进行分级。这对于既结合单体 P2X₇ 又结合三聚化受体的抗体来说更困难。

[0044] 出于解释本说明书的目的,一般性适用下列定义,只要适用,以单数形式使用的术语也包括复数含义,并且反之亦然。如果所述的任何定义与通过引用并入本文的任何文献相矛盾,则采用下文所述的定义。

[0045] “嘌呤能受体”泛指使用嘌呤(例如 ATP)作为配体的受体。

[0046] “P2X₇ 受体”泛指由三个蛋白质亚基或单体形成的嘌呤能受体,所述单体的至少一个具有基本上如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。P2X₇ 由三个单体形成,因此其为“三聚物”或“三聚化”。“P2X₇ 受体”可以是如下所述的功能性或非功能性受体。“P2X₇ 受体”涵盖 P2X₇ 受体的天然变体,例如,其中 P2X₇ 单体是剪接变体、等位变体和同工型,包括形成 P2X₇ 受体的天然截短或分泌形式的单体(例如由细胞外结构域序列组成的形式或其截短形式)、天然变体形式(例如选择性剪接形式)和天然等位变体。在本发明的某些实施方案中,本文公开的天然序列 P2X₇ 单体多肽是成熟的或全长天然序列多肽,其包含 SEQ ID NO:

1 所示的全长氨基酸序列。在某些实施方案中, P2X₇ 受体可以是经修饰的氨基酸序列, 例如 SEQ IDNO :1 中所示序列中的多个氨基酸可以被替换、缺失或可插入残基。

[0047] “功能性 P2X₇ 受体”泛指具有结合 ATP 之结合位点或裂隙的 P2X₇ 受体形式。当结合 ATP 时, 该受体形成孔样结构, 其使得钙离子能够进入胞质溶胶内, 其后果之一可能是程序性细胞死亡。在正常体内稳态中, 功能性 P2X₇ 受体的表达一般局限于进行程序性细胞死亡的细胞, 例如胸腺细胞、树突细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和单核细胞。在红细胞上也可有功能性 P2X₇ 受体的一些表达。

[0048] “非功能性 P2X₇ 受体”泛指其中一个或多个单体在 Pro210 (根据 SEQID NO :1) 处具有顺式异构化的 P2X₇ 受体形式。该异构化可来源于任何分子事件, 其导致单体错误折叠, 包括例如单体一级序列的突变或者异常的翻译后加工。异构化的后果之一是受体不能结合 ATP。在这些情况下, 受体不能形成孔, 这限制了钙离子可进入胞质溶胶的程度。非功能性 P2X₇ 受体在多种上皮癌和造血系统癌症中表达。

[0049] “抗体”或“免疫球蛋白”或“Ig”是 γ 球蛋白, 其存在于血液或脊椎动物的其他体液中, 其在免疫系统中起到结合抗原并由此识别和 / 或中和外来物质的作用。

[0050] 抗体一般是异四聚体糖蛋白, 其由两条相同的轻链 (L) 和两条相同的重链 (H) 构成。每条 L 链通过一个共价二硫键与 H 链相连。取决于 H 链的同种型, 两条 H 链通过一个或多个二硫键彼此相连。每条 H 链和 L 链也具有规则间隔的链内二硫桥。

[0051] H 链和 L 链定义了特定的 Ig 结构域。更特别地, 每条 H 链在 N 端具有可变结构域 (V_H), 其后对于 α 和 γ 链各自是三个恒定结构域 (C_H), 对于 μ 和 ϵ 同种型是四个 C_H 结构域。每条 L 链在 N 端具有可变结构域 (V_L), 其后在其另一端是恒定结构域 (C_L)。V_L 与 V_H 对齐, C_L 与重链的第一个恒定结构域 (C_H1) 对齐。

[0052] 抗体可划分为不同的种类或同种型。免疫球蛋白分五类: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其分别具有命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。 γ 和 α 类又根据 C_H 序列和功能中相对小的差异分为若干亚类, 例如入表达下列亚类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。可根据其恒定结构域的氨基酸序列将来自任何脊椎动物物种的 L 链划归为两种明显不同的类型之一, 称为 κ 和 λ 。

[0053] 恒定结构域包含 Fc 部分, 其包含通过二硫键连接在一起的两条 H 链的羧基端部分。抗体的效应物功能 (例如 ADCC) 由 Fc 区域中的序列所决定, 该区域也是某些类型细胞上所发现的 Fc 受体 (FcR) 所识别的部分。

[0054] V_H 和 V_L 配对一起形成“可变区”或“可变结构域”, 其包含抗体重链或轻链的氨基端结构域。重链的可变结构域可称为“VH”。轻链的可变结构域可称为“VL”。V 结构域含有影响抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原之特异性的“抗原结合位点”, 其。V 区域跨越约 110 个氨基酸残基, 由相对不变的称为框架区 (FR) (通常约 4 个) 的 15-30 个氨基酸的片段组成, 所述框架区被称为“高变区” (一般约 3 个) 的变化极大的较短区域间隔开, 所述“高变区”各自长 9-12 个氨基酸。FR 大多采取 β 片层构型, 所述高变区形成连接 β 片层结构 (有时构成其一部分) 的环。

[0055] “高变区”指抗体可变结构域中在序列上具有高度可变性和 / 或在结构上形成限定环的区域。一般来说, 抗体包含六个高变区; VH 中有 3 个 (H1、H2、H3), VL 中有 3 个 (L1、L2、L3)。

[0056] “框架”或“FR”残基是除了本文定义的高变区残基之外的可变结构域残基。

[0057] “完整”或“整个”抗体是包含抗原结合位点以及 C_L 和至少重链恒定结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域（例如人天然序列恒定结构域）或其氨基酸序列变体。

[0058] “包含可变结构域的完整抗体片段”包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和 Fv 片段；双功能抗体 (diabodies)；线性抗体、单链抗体分子；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0059] “Fab 片段”由整个 L 链和 H 链之可变结构域 (V_H) 以及一条重链的第一个恒定结构域 (C_H1) 组成。每个 Fab 片段对于抗原结合而言是单价的，即其具有单个抗体结合位点。

[0060] “Fab' 片段”与 Fab 片段的不同在于，前者在 C_H1 结构域的羧基端具有另外的几个残基（包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸）。Fab' -SH 在本文中表示恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基的 Fab'。

[0061] “ $F(ab')_2$ 片段”大致相当于两个二硫键连接的 Fab 片段，其具有二价抗原结合活性，并且仍能够交联抗原。

[0062] “Fv”是含有完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此片段由紧密非共价连接的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。

[0063] 在单链 Fv (scFv) 类型中，一个重链可变区结构域和一个轻链可变结构域可通过柔性肽接头共价连接，使得轻链和重链可以类似于两条链 Fv 类型中的“二聚化”结构相结合。这两个结构域的折叠产生六个高度可变的环（来自 H 链和 L 链的各 3 个环），其提供了用于抗原结合的氨基酸残基并将抗原结合特异性赋予抗体。

[0064] “单链 Fv”（还缩写为“sFv”或“scFv”）是包含相连形成单个多肽链之 V_H 和 V_L 抗体结构域的抗体片段。优选地，所述 scFv 多肽还包含 V_H 和 V_L 结构域之间的多肽接头，其使得 scFv 能够形成抗原结合所需的结构。

[0065] “单可变结构域”是 Fv 的一半（仅包含三个抗原特异性的 CDR），其具有识别和结合抗原的能力，尽管比整个结合位点的亲和力低。

[0066] “双功能抗体”指具有两个抗原结合位点的抗体片段，其片段在同一多肽链 ($VH-VL$) 中包含与轻链可变结构域 (VL) 相连的重链可变结构域 (VH)。通过下列方式制备小抗体片段：在 V_H 与 V_L 结构域之间使用短接头（约 5-10 个残基）构建 sFv 片段（见前段），使得形成 V 结构域的链间而非链内配对，得到二价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。

[0067] 双功能抗体可以是二价的或双特异性的。双特异性双功能抗体是两个“交换”sFv 片段的异二聚体，其中两个抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同的多肽链上。三功能抗体 (triabodies) 和四功能抗体 (tetraabodies) 也是本领域中一般已知的。

[0068] “分离的抗体”是已经鉴定并已与其之前存在的环境中组分分离和 / 或从其中回收的抗体。杂质组分是会干扰抗体治疗用途的物质，可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。

[0069] “人抗体”指具有对应于人所产生抗体之氨基酸序列的氨基酸序列的抗体。人抗体可使用本领域中已知的多种技术产生，包括噬菌体展示文库。人抗体可以通过向已经修饰从而在应答于抗原激发时产生此种抗体而其自身的内源基因座已失活的转基因动物施用这些抗原来制备。

[0070] 非人（例如啮齿动物）抗体的“人源化”形式是含有来源于非人抗体之尽可能少

的序列的嵌合抗体。在很大程度上,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体),其中来自接纳抗体高变区的残基被具有所需抗体特异性、亲和性和能力的来自非人物种(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)(供者抗体)之高变区的残基所替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基所替代。此外,人源化抗体还可包含未在受者抗体或供者抗体中发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。一般说来,人源化抗体会包含至少一个以及通常两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的高可变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且所有或基本上所有的FR都是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选地还会包含免疫球蛋白(通常为人免疫球蛋白)恒定区(Fc)的至少一部分。

[0071] “单克隆抗体”是指由基本上同一抗体群体获得的抗体,即,除可能少量存在的天然突变外,包含所述群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,其针对抗原上的单个抗原位点或决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体的优势还在于它们可以合成而不被其他抗体污染。单克隆抗体可以通过杂交瘤方法来制备。“单克隆抗体”也可利用所述技术从噬菌体抗体文库分离出来。

[0072] 术语“抗 P2X₇ 受体抗体”或“结合 P2X₇ 受体的抗体”是指能够结合 P2X₇ 受体的抗体,其亲和力足够使得所述抗体可作为靶向 P2X₇ 受体(通常为非功能性 P2X₇ 受体)的诊断剂和/或治疗剂。优选地,P2X₇ 受体抗体结合不相关的 P2X₇ 受体蛋白的程度小于该抗体与 P2X₇ 受体结合程度的约 10%,例如通过放射性免疫测定(RIA)所测得的。在某些实施方案中,结合 P2X₇ 受体的抗体具有< 1 μM、< 100nM、< 10nM、< 1nM 或< 0.1nM 的解离常数(Kd)。抗非功能性 P2X₇ 受体的抗体通常是具有这些血清学特征中的一些或全部特征并且结合非功能性 P2X₇ 受体但不结合功能性 P2X₇ 受体的抗体。

[0073] “亲和力成熟”抗体是在其一个或多个高变区中具有一个或多个改变并导致抗体对抗原之亲和力提高(与不具有这些改变的亲本抗体相比)的抗体。优选的亲和力成熟抗体将具有针对靶抗原的纳摩尔每升或甚至皮摩尔每升的亲和力。亲和力成熟抗体由本领域已知的方法产生。

[0074] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低其所结合之抗原的生物活性的抗体。优选的阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。

[0075] 本文使用的“激动剂抗体”是模拟目的多肽至少一种功能活性的抗体。

[0076] “结合亲和力”泛指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和强度。除非另外指明,否则本文使用的“结合亲和力”表示内在结合亲和力,其反映结合配对成员(例如抗体和抗原)之间的 1:1 相互作用。分子 X 与其配偶体 Y 的亲和力一般可由解离常数(Kd)表示。亲和力可通过本领域已知的普通方法来测定,包括本文中所述的那些。低亲和力抗体一般缓慢结合抗原,并且倾向于容易地解离,而高亲和力抗体则通常更快地结合抗原并且倾向于保持结合更长时间。测量结合亲和力的多种方法是本领域中已知的,其中的任何方法都可用于本发明目的。

[0077] “表位”泛指抗体之抗原结合位点所结合的抗原部分。表位可以是“线性的”,其意为形成抗原结合位点的抗体 CDR 的高变环结合一级蛋白质结构的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述表位是“构象表位”,即其中 CDR 的高变环结合三级或四级蛋白质结构中存在的残基。

[0078] 在一个实施方案中,提供了 P2X₇ 受体的表位,

[0079] 该表位由以下形成:

[0080] -P2X₇ 受体第一单体区域形式的第一区域;和

[0081] -所述受体第二单体区域形式的第二区域;其中所述第一和第二区域通过所述受体单体 (SEQ ID NO:1) 的第 210 位处残基的顺式异构化在该受体中形成;并且

[0082] 其中所述第一和第二区域在该受体中彼此相邻排列,从而允许抗 P2X₇ 抗体的抗原结合位点与形成所述表位的所述第一和第二区域结合。

[0083] 通常,所述表位是构象表位。在这些实施方案中,所述第一和第二区域各自定义了分子空间,其各自包含 SEQ ID NO:1 中的一个或多个残基。通常,所述第一区域定义了包含 SEQ ID NO:1 中一个或多个残基的分子空间,其暴露用于结合抗体的抗原结合位点,其是具有 SEQ ID NO:1 所示序列之单体的 Pro210 顺式异构化的结果。这些残基包括 Gly200、His201、Asn202、Tyr203、Thr204、Thr205、Arg206、Asn207、Ile208、Leu209 和 Pro210。在一个实施方案中,所述第一区域包含这些残基中的至少一个。通常,所述第一区域包含这些残基中的至少 4 个,但是其可以更少,例如 2 个或 3 个,这取决于所述第二区域中存在多少残基。在一个实施方案中,所述第一区域包含下表 1 中所示的至少 1 对残基:

[0084] 表 1

[0085]

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

[0086] 在某些实施方案中,所述第一区域包含表 2 中所示的 2 对或更多对残基。

[0087] 第一区域还可含有一个或多个外围残基,其与两个细胞外结构域折叠中较大的那

个之上的 ATP 结合位点的形成密切相关。它们是 Lys193、Phe275 和 Arg294。Arg125 位于两个细胞外结构域折叠中较小的那个之中。因此,在某些实施方案中,第一区域还包含 SEQ ID NO:1 中的一个或多个下列残基:Arg125、Lys193、Phe275 和 Arg294。应当理解,所述第一区域不仅仅由这些残基组成。也就是说,如上所述,所述第一区域定义了包含 SEQ ID NO:1 中一个或多个残基的分子空间,其暴露用于结合抗体的抗原结合位点,其为具有 SEQ ID NO:1 所示序列之单体的 Pro210 的顺式异构化的结果。在本文中,仅以补充的(而非替代性的)方式向以下残基中的一个或多个提供了 Arg125、Lys193、Phe275 和 Arg294:例如 Gly200、His201、Asn202、Tyr203、Thr204、Thr205、Arg206、Asn207、Ile208、Leu209。

[0088] 通常,所述第二区域定义了包含 SEQ ID NO:1 中一个或多个残基的分子空间:其暴露用于结合抗体的抗原结合位点,其是具有 SEQ ID NO:1 所示序列之单体的 Pro210 的顺式异构化的结果。这些残基包括 Lys297、Tyr298、Tyr299、Lys300、Glu301、Asn302、Asn303、Val304、Glu305 和 Lys306。在一个实施方案中,第二区域包含这些残基中的至少一个。通常,所述第二区域包含这些残基中的至少 4 个,但是其可以更少,例如 2 个或 3 个,这取决于第一区域中存在多少残基。在一个实施方案中,第二区域包含下表 2 中所示的至少 1 对残基:

[0089] 表 2

[0090]

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 299Asn 303	Tyr 299	Tyr 299	Tyr 299
		Glu 301	Glu 301	Asn 302		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

[0091] 在某些实施方案中,所述第二区域包含表 2 中所示的 2 对或更多对残基。

[0092] 所述第二区域还可含有一个或多个外周残基,其与 ATP 结合位点的形成密切相关。它们是 Arg307 和 Lys311。因此,在某些实施方案中,第二区域还包含 Arg307 和 / 或 Lys311。应当理解,所述第二区域不仅仅由这些残基组成。也就是说,如上所述,所述第二区域定义了包含 SEQ IDNO:1 中一个或多个残基的分子空间:其暴露用于结合抗体的抗原

结合位点,其是具有 SEQ ID NO:1 所示序列之单体的 Pro210 的顺式异构化的结果。在此上下文中,仅以补充的方式向以下残基中的一个或多个提供 Arg307 和 Lys311:例如 Lys297、Tyr298、Tyr299、Lys300、Glu301、Asn302、Asn303、Val304、Glu305 和 Lys306。

[0093] 在某些实施方案中,所述表位是线性表位或者包含线性表位。实例包括其中第一区域包含表 3 中 SEQ ID NO:1 的下列序列之一的:

[0094] 表 3

[0095]

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

[0096] 在这些实施方案中,所述表位的第二区域可包含表 4 中 SEQ ID NO:1 的下列序列之一:

[0097] 表 4

[0098]

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

[0099] 在某些实施方案中,所述第一区域含有比所述第二区域更多的残基。在另一些实施方案中,所述第二区域含有比所述第一区域更多的残基。

[0100] 所述第一区域和第二区域可各自含有约 4 至约 10 个残基,例如 5、6、7、8 或 9 个残基。当所述第二区域中有更多的残基时,所述第一区域中可有较少的残基,即小于 4 个,例如 2 个或 3 个。反之亦然。

[0101] 如本文所述,所述第一和第二区域在受体中彼此相邻排列,从而允许抗 P2X₇ 抗体的抗原结合位点与形成表位的所述第一和第二区域结合。更详细地,本发明人发现,尽管位于分开的单体上,但所述第一和第二区域组合形成抗体之单个抗原结合位点可结合的表位。通常,所述表位的所述第一和第二区域间隔不超过约 40 埃。如果所述间隔大于这一距离,则抗体结合亲和力倾向于降低,这是因为抗原结合位点需要在受体中的单体之间跨越较大的距离,这种情况下所结合的残基较少。通常,所述第一和第二区域间隔约 10 埃,但是小于 40 埃的较大距离也是可能的,例如 15、20、25、30、35 埃。

[0102] 本文所述的表位可以基本上纯化或分离的形式提供,例如作为天然 P2X₇ 受体的片段或作为合成的 P2X₇ 受体。

[0103] 在另一些实施方案中,提供了包含如上所述表位的 P2X₇ 受体。通常,所述受体的至少一个单体具有基本上如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。所述受体可以是 P2X₇ 受体的天然变体,例如,其中 P2X₇ 单体是剪接变体、等位变体和同工型,其包括形成 P2X₇ 受体的天然截短或分泌形式的单体(例如由细胞外结构域序列组成的形式或其截短形式)、天然

变体形式（例如选择性剪接形式）和天然等位变体。在本发明的某些实施方案中，天然序列 P2X₇ 单体多肽是成熟或全长天然序列多肽，其包含 SEQ ID NO:1 所示的全长氨基酸序列。在某些实施方案中，所述 P2X₇ 受体可具有经修饰的氨基酸序列，例如 SEQ ID NO:1 中所示序列中多个氨基酸可被替代、缺失或可插入残基。

[0104] 通常，所述受体是包含如上所述表位的非功能性 P2X₇ 受体。顺式异构化可由导致单体错误折叠的任何分子事件所导致，包括例如单体一级序列的突变或者异常的翻译后加工。在某些实施方案中，不是该受体的所有单体都具有单体 210 位残基的顺式异构化，例如受体的 1 个或 2 个单体可具有 SEQ ID NO:1 的第 210 位残基的顺式异构化。

[0105] 所述受体可以基本上纯化或分离的形式提供，即，其可分离自细胞，其可以是受体的均质样品形式（不论是否以固相或其它形式提供）。

[0106] 如下文详细描述地，本发明人已产生了具有用于结合上述表位之抗原结合位点的抗体。因此，在某些实施方案中，提供了用于结合如上所述表位的抗体。

[0107] 通常抗原结合位点（或可变结构域）的至少一个互补决定区（（CDR）（或高变区））结合所述表位的第一区域，并且该抗原结合位点的至少另一个 CDR 结合所述表位的第二区域。在一些实施方案中，CDR 中的 2 个结合第一区域，另一 CDR 结合第二区域。在另一些实施方案中，CDR 中的 2 个结合第二区域，另一 CDR 结合第一区域。在一些实施方案中，一个 CDR 结合第一区域，另一个 CDR 结合第二区域，还有一个 CDR 未结合所述表位的第一或第二区域。

[0108] 在某些实施方案中，提供了抗非功能性 P2X₇ 受体的抗体，其中该抗体的抗原结合位点结合上文表 1 中的至少一对残基以及上文表 2 中的至少一对残基。

[0109] 在另一些实施方案中，提供了抗非功能性 P2X₇ 受体的抗体，其中该抗体的抗原结合位点结合上文表 3 中的至少一个序列以及上文表 4 中的至少一个序列。

[0110] 在另一些实施方案中，提供了结合抗体的上述表位形式的免疫复合物。通常，所述表位在 P2X₇ 受体上提供。该受体的全部表位或仅有一些表位可结合抗体，例如，所述受体的少于三个表位与抗体结合。所述复合物可含有比受体更多或更少的抗体分子。

[0111] 如本文所述，利用非功能性 P2X₇ 受体的三维模型，本发明人确定了可用于与本发明表位结合之抗体的肽的范围。因此，在某些实施方案中，提供了包含 N 端区域和 C 端区域的肽，所述 N 端和 C 端区域各自由 N 端和 C 端残基定义，其中：

[0112] - 所述 N 端区域包含下列之一的序列：

[0113] • HNYTTRNIL (SEQ ID NO:2)；

[0114] • GHNYTTRNIL (SEQ ID NO:3)；

[0115] • DFPGHNYTTRNIL (SEQ ID NO:4)；

[0116] • 至少 4 个残基的 SEQ ID NO:2 至 4 的片段；

[0117] • SEQ ID NO:2-4 中任一个的序列，其中 D 残基可保守性替换为 E、N 或 Q 残基；F 残基可保守性替换为 Y 或 W 残基；G 残基可保守性替换为 A、V、L 或 I 残基；H 残基可保守性替换为 K 或 R 残基；N 残基可保守性替换为 D、E 或 Q 残基；Y 残基可保守性替换为 F 或 W 残基；T 残基可保守性替换为 C、S 或 M 残基；R 残基可保守性替换为 H 或 K 残基；I 残基可保守性替换为 G、A、V 或 L 残基；以及 L 残基可保守性替换为 G、A、V 或 I 残基；

[0118] MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSYYVCFALVSDKL

[0119] YQRKEPVISSVHTKVKGIAEVKEEIVENGVKKLVHSVFDTADYTFPLQGN

[0120] SFFVMTNFLKTEGQEQRCLCPEYPTRRITLCSSDRGCKKGWMDPQSKGIQTG

[0121] RCWHEGNQKTCEVSAWCPIEAVEEAPRPALLNSAENFTVLIKNNIDFPG

[0122] HNYTTRNIL (SEQ ID NO :5) ;或

[0123] ●

[0124] • 序列 SEQ ID NO :5 中的序列,其在 C 端包含 HNYTTRNIL,

[0125] - 所述 C 端区域包含脯氨酸、丙氨酸或甘氨酸的 C 端残基,

[0126] 其中所述 N 端区域的 C 端残基与所述 C 端区域的 N 端残基共价连接。

[0127] 所述 C 端区域可由顺式构象的脯氨酸形式的单个氨基酸残基组成。或者,其可包括位于脯氨酸 N 端的其他残基。

[0128] 通常,所述 C 端区域的 C 端残基通过长约 10 至 40 埃的接头与其他肽相连。在一个实施方案中,所述其他肽由 SEQ ID NO :6 的序列或者其 4 个或更多个残基的片段组成。在一个实施方案中,所述 C 端区域包含顺式构象脯氨酸的 C 端残基。

[0129] 在一个实施方案中,所述其他肽来自于 P2X₇ 受体序列,并且具有不超过 SEQ ID NO :1 P2X₇ 受体的 594 个残基。特别地,所述其他肽可由 SEQ ID NO :6 的序列或 SEQ ID NO :6 序列中的序列组成。SEQ ID NO :6 中这些肽的实例包括具有表 5 中所述序列的那些 (根据图 1 编号) :

[0130] 表 5

[0131]

K281 至 K297	Y298 至 G314
T282 至 Y298	Y299 至 I315
T283 至 Y299	K300 至 R316
N284 至 K300	E301 至 F317
V285 至 E301	N302 至 D318
S286 至 N302	N303 至 I319
L287 至 N303	V304 至 L320
Y288 至 V304	E305 至 V321
P289 至 E305	K306 至 F322
G290 至 K306	R307 至 G323
Y291 至 R307	T308 至 T324
N292 至 T308	L309 至 G325
F293 至 L309	I310 至 G326

R294 至 I310	K311 至 K327
Y295 至 K311	V312 至 F328
A296 至 V312	F313 至 D329
K297 至 F313	

[0132] 表 5 中所示肽可的长度为 6 至 17 个残基。在一个实施方案中,所述肽片段是 K297 至 F313,其由 KYYKENNVEKRTLIVF (SEQ ID NO :7) 序列组成。

[0133] C 端区域可以通过任何合适的缀合反应与其他肽连接或相连,所述反应可使用任何合适的接头。所述接头可以是特定长度的,以有助于免疫原性并使得空间干扰最小化。例如,所述接头的长度可为 **10Å 至 40Å**。优选地,所述接头的长度为 10 或 **20Å**。

[0134] 所述接头可以是一个或多个氨基酸残基的氨基酸接头。但是,术语“氨基酸接头”并不意在暗示这样的接头仅仅由氨基酸残基组成。所述氨基酸接头可以是基本上不干扰本发明肽的任何氨基酸序列。

[0135] 所述氨基酸接头的氨基酸残基优选是天然氨基酸或非天然氨基酸,以及全 -L 或全 -D 氨基酸或其混合物。例如,所述氨基酸可选自甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、丝氨酸、缬氨酸和苏氨酸。优选地,所述接头由选自甘氨酸和丙氨酸的一个或两个氨基酸组成。

[0136] 在某些实施方案中,提供了由式:(A) (Xn) (B) 定义的肽,其中:

[0137] -(A) 是 GHNYTTRNILP (SEQ ID NO :8) 的氨基酸序列或其至少 4 个氨基酸的片段;

[0138] -(Xn) 是长 10 至 40 埃的接头,所述接头由一个或多个氨基酸残基组成;

[0139] -(B) 是 AKYYKENNVEK (SEQ ID NO :9) 的氨基酸序列或其至少 4 个氨基酸的片段。

[0140] 在另一些实施方案中,提供了具有下列序列的肽: GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK (SEQ ID NO :10)。

[0141] 本发明的肽可通过本领域中已知的多种技术来制备,包括固相合成和 DNA 重组技

术。

[0142] 本领域中已知,载体是与形成表位的肽缀合以提高免疫原性的物质。一些载体通过结合多个载体实现此目的,从而向待产生免疫应答的宿主提供分子量增加的抗原。

[0143] 优选的递体包括细菌毒素或类毒素。其他合适的载体包括脑膜炎奈瑟菌 (*N. meningitides*) 外膜蛋白、白蛋白 (例如牛血清白蛋白)、合成肽、热休克蛋白、百日咳蛋白质、来自流感嗜血杆菌 (*H. influenza*) 的蛋白 D 和来自艰难梭菌 (*C. difficile*) 的毒素 A、B 或 C。

[0144] 当所述载体是细菌毒素或类毒素时,优选白喉或破伤风类毒素。

[0145] 优选所述载体含有可与本发明肽反应或者可被修饰成能够与所述肽反应的官能团。

[0146] 如上所述,本发明的肽可用于产生结合活细胞上非功能性 P2X₇ 受体但不结合活细胞上功能性 P2X₇ 受体的单克隆抗体。另外一个优点是,这些肽还可用于产生结合活细胞上功能性 P2X₇ 受体但不结合活细胞上非功能性 P2X₇ 受体的单克隆抗体。

[0147] 后一种抗体是特别重要的,因为它们可用于选择可应用全身性抗体治疗的个体。更详细地,大多数群体含有控制组织 (例如淋巴组织) 上功能性 P2X₇ 受体表达的等位基因。这些组织区室中的受体表达应理解为完全正常的生理机能。相反地,少数群体具有控制这些组织区室中非功能性 P2X₇ 受体表达的一个或多个等位基因。如果向另一群体提供结合活细胞上表达的非功能性受体的抗体用于治疗癌症,则具有以下风险:此治疗可能影响免疫系统,因为其将除去表达非功能性受体的淋巴样细胞。

[0148] 因此,本文所述的结合活细胞上功能性受体但不结合非功能性受体的本发明抗体特别可用于帮助选择不应该提供抗体治疗或应以适当修改的形式提供抗体治疗的个体。此类测定可与使用针对非功能性受体之抗体的相同筛选联合使用。使用此方法,可将淋巴组织上具有功能性受体的患者以及淋巴组织上具有非功能性受体的患者与具有低表达水平的功能性或非功能性受体的患者区分开。联合使用各抗体使得能够分辨由于其免疫细胞耗尽而至少需要密切监测的患者,所述免疫细胞耗尽是伴随着使用针对非功能性受体之治疗性抗体对其病症进行治疗一起发生的。

[0149] 在某些实施方案中,提供了结合活细胞上表达的功能性 P2X₇ 受体但不结合非功能性 P2X₇ 受体的抗体。在另一些实施方案中,提供了结合活细胞上表达的非功能性 P2X₇ 受体但不结合功能性 P2X₇ 受体的抗体。通常,这些抗体是针对本发明的肽而产生的。

[0150] 在某些实施方案中,本发明的抗体作为完整抗体分子可具有 10⁻⁷M 至 10⁻¹³M 的亲合力,但是如果使用杂交瘤途径则倾向于需要 10⁻⁷M,优选作为 IgM,从而避免产生的抗体对杂交瘤生长的抑制。可使用本领域技术人员已知的标准技术 (包括抗体亲和力成熟) 来增加或降低这些亲和力。

[0151] 所述抗体可以是从小鼠单克隆或多克隆抗血清获得的抗体。所述抗体可由杂交瘤或噬菌体展示文库产生。可根据标准技术通过用本发明肽与佐剂一起免疫接种宿主来获得单克隆和多克隆抗血清。可使用多种血清学技术中的任意技术来筛选所得血清,其中血清暴露于活细胞上表达的受体。

[0152] 利用本发明,可使用重组表达来提供抗体。例如,对使用本发明肽免疫接种产生之抗体的 CDR 进行测序,确定编码核苷酸序列,然后亚克隆进用于重组合成抗体的表达载体

中。这从而提供了开发下列抗体的机会,所述抗体为:嵌合抗体(即含有人可变结构域和非人恒定结构域的抗体);以及人源化抗体(即通过将非人 CDR 嫁接于抗体框架和完全人抗体上而形成的抗体)。

[0153] 可针对效应物功能修饰本发明抗体,从而提高例如抗体在治疗癌症中的有效性。例如,抗体重链的恒定区可改变为小鼠 IgG2a、小鼠 IgG2b 或人 IgG1 同种型。由此产生的抗体可具有增强的细胞毒性(ADCC)或补体介导细胞毒性(CMC)。在另一种修饰中,可从 Fc 区域缺失岩藻糖,或者可将唾液酸残基引入 Fc 区域。由此产生的抗体也可具有增强的 ADCC 或增强的 CMC 活性。在另一个修饰中,可将半胱氨酸残基引入 Fc 区域,由此允许在该区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚化抗体可具有增强的内化能力和/或增强的补体介导细胞杀伤和 ADCC。还可使用异双功能交联分子制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚化抗体。或者,可改造抗体,使其具有修饰的或混合的 Fc 区域,由此可具有增强的补体裂解和 ADCC 能力。

[0154] 所述抗体可以是任何同种型的完整抗体。当所述抗体是抗体片段时,该抗体片段选自 dAb、Fab、Fd、Fv、F(ab')₂、scFv 和 CDR。

[0155] 所述抗体或片段可以提供于固相(例如珠、表面或组织培养管)容器上。

[0156] 可提供具有标记的所述抗体或其片段,所述标记用以检测抗体或其片段与活细胞上表达的受体的结合。

[0157] 可标记所述抗体和片段用于医学成像。这些方法包括化学方式连接标记或成像剂,向对象施用可接受载体中的经标记抗体或片段,以及在靶标部位体内成像所述经标记抗体或片段,其中所述标记或成像剂例如放射性同位素,其包括 ⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²Bi。放射性标记的抗体或其片段可特别用于本文所述癌症的体内成像。

[0158] 可通过本领域技术人员已知的方法纯化抗体。纯化方法包括:选择性沉淀、液相色谱、HPLC、电泳、色谱聚焦和多种亲和方法,等等。

[0159] 在一些实施方案中,本文公开的抗体还可包括多聚形式的抗体。例如,本发明的抗体可采用单体免疫球蛋白分子的抗体二聚体、三聚体或更高级多聚体的形式。

[0160] 抗体的交联可以通过本领域已知的多种方法进行。例如,抗体的交联可以通过抗体的天然聚集、通过化学或重组连接方法或者本领域中已知的其它方法实现。例如,纯化的抗体制剂可自发形成含有抗体同二聚体以及其它更高级抗体多聚体的蛋白质聚集体。在一个具体的实施方案中,可使用抗体交联来形成同二聚体,所述交联使用第二抗体结合目的抗体。所述交联抗体(crosslinker antibody)可来源于与目的抗体不同的动物。例如,可向小鼠单克隆抗体中添加山羊抗小鼠抗体(Fab 特异性)以形成同二聚体。此二价交联抗体识别形成同二聚体的两个目的抗体的 Fab 或 Fc 区域。

[0161] 或者,可通过本领域已知的化学连接技术形成抗体同二聚体。化学交联剂可以是同或异双功能性的,并且会共价结合形成同二聚体的两个抗体。在一些实施方案中,化学交联剂不与抗体的抗原结合区域相互作用是理想的,这是因为这可能影响抗体的功能。如本领域技术人员所了解的,抗体可以在 Fab 区域交联。

[0162] 在本发明的另一个方面,提供了由如上所述抗体或其片段与活细胞上表达的 P2X₇ 受体结合而形成的免疫复合物。所述受体可以是功能性或非功能性的。

[0163] 在另一个实施方案中,提供了由抗体或其片段与如上所述肽结合而形成的免疫复合物。

[0164] 当体外或体内检测指示疾病或病症(包括前肿瘤形成和肿瘤形成)的存在或倾向时,本发明的免疫复合物(包括含有本发明表位或肽的那些)是特别重要的。

[0165] 另外,如上所述,对由如上所述的抗体或其片段与活细胞上功能性 P2X₇ 受体结合而形成之免疫复合物的检测是对象对以非功能性 P2X₇ 受体表达为特征之疾病或病症治疗的适合性的重要指示。小百分比的群体通常在其造血细胞(例如胸腺细胞、树突细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和单核细胞)上表达非功能性状态的 P2X₇ 受体。因此,能够鉴定对象中非功能性受体的此纯合表型非常重要,所述对象已鉴定为具有患癌症的风险或患有癌症(例如由于在其他非造血细胞上存在非功能性 P2X₇ 所导致)。

[0166] 还认为,具有杂合非功能性 P2X₇ 受体表型的对象将受益于本发明的免疫复合物的鉴定。可改造并逐步调整(titrate)靶向非功能性 P2X₇ 受体的治疗以将其表型纳入考虑中。

[0167] 这些检测方法在下文有更详细的描述。

[0168] 所述免疫复合物中包含的抗体或抗体片段可与固相(例如珠或板)附着,从而所述免疫复合物在形成时与固相附着。或者,所述免疫复合物中包含的 P2X₇ 受体、其单体或片段可与固相附着。

[0169] 可以标记抗体用于检测免疫复合物的形成。

[0170] 所述免疫复合物还可包含抗体或其片段,例如用于捕获免疫复合物的捕获抗体。另一些抗体或其片段可结合抗 P2X₇ 受体抗体。另外,其他抗体或其片段可结合所述受体或其片段。

[0171] 所述另一些抗体或其片段可结合至固相(例如如上所述的相)。

[0172] 可以标记所述另一些抗体用于检测免疫复合物的形成。标记的实例包括荧光团、染料、同位素等。

[0173] 在另一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含本发明的肽或表位以及佐剂或用于增强针对肽之免疫应答的其他分子。可对所述佐剂进行选择以增强体液免疫应答或细胞免疫应答,或者二者兼有。在某些实施方案中,这些组合物可用于针对非功能性 P2X₇ 受体相关疾病的免疫接种。

[0174] 在另一些实施方案中,提供了包含本发明抗体以及可药用载体、赋形剂或稀释剂的组合物。这些组合物可用于全身施用抗体用于癌症或其他非功能性 P2X₇ 受体相关疾病的治疗。在一些优选的实施方案中,所述抗体是单结构域抗体。

[0175] 在另一些实施方案中,提供了治疗、诊断或监测疾病或病症的方法,所述疾病或病症的特征在于上皮细胞、间充质细胞、生殖细胞、神经细胞、胸膜细胞或血细胞上表达非功能性 P2X₇ 受体,所述方法包括向需要所述治疗、诊断或监测的个体施用抗体,所述抗体是结合活细胞上非功能性 P2X₇ 受体但不结合活细胞上功能性 P2X₇ 受体的抗体。在一个实施方案中,所述方法包括使用结合活细胞上功能性 P2X₇ 受体但不结合非功能性 P2X₇ 受体之抗体的第一步。

[0176] 在某些实施方案中,提供了本文所述抗体用于治疗患癌症个体的用途。在另一些实施方案中,提供了本文所述抗体用于制备用于治疗患癌症个体之药物的用途。在另一些

实施方案中,提供了治疗患癌症个体的方法,包括将包含癌症的个体组织与结合本发明的表位或肽的抗体相接触的步骤。所述方法可在体内或体外进行。

[0177] 通常,所述癌症是上皮(乳腺、前列腺、肠、肺、皮肤、子宫颈、子宫、阴道)、间充质、生殖系统、神经、胸膜或血液来源的。

[0178] 所述抗体可以是抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双功能抗体、三功能抗体、融合蛋白、缀合物或如上所述的药物组合物。

[0179] 施用剂量、施用频率、施用途径等在下文有详细描述。

[0180] 在另一个实施方案中,提供了包含下列项的药物组合物:结合本发明表位或肽的抗原结合位点或者包含所述抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双功能抗体、三功能抗体、融合蛋白或缀合物,以及可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0181] 制备和向有此需要的对象施用抗体的方法是本领域技术人员公知的,或者可由本领域技术人员容易地确定。所述施用途径可以是例如口服、胃肠外(例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道)、通过吸入或局部。施用的一种形式是注射溶液,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注的,其包含缓冲剂(例如醋酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(例如聚山梨酸酯)、任选的稳定剂(例如人白蛋白)。在其他方法中,可将抗体直接递送到疾病部位,从而增加患病细胞或组织对抗体的暴露。

[0182] 用于胃肠外施用的制剂包括无菌水性(水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或混悬液,包括盐水和缓冲介质)或非水性(非水性溶剂是丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油,以及可注射有机酯例如油酸乙酯)溶液、混悬液和乳液。可药用载体包括0.01-0.1M、优选0.05M的磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。其他常用的胃肠外载体(vehicle)包括磷酸钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化林格液或不挥发油。静脉内载体包括流体和营养物补充剂、电解质补充剂如基于林格氏右旋糖的那些,等等。还可以存在防腐剂及其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0183] 更特别地,适于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(当呈水溶性时)或分散体系,以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体系的无菌粉末,在此情况下,所述组合物必须是无菌的,并且应该为易于注射程度的流体。其在制备和储存条件下应该是稳定的,优选抗微生物(例如细菌和真菌)污染作用进行保存。所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其适当的混合物。可以例如通过使用包合(例如卵磷脂)、在分散体系的情况下通过保持所需粒径以及通过使用表面活性剂来保持合适的流动性。用于本文公开之治疗方法的合适制剂描述于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16版,(1980)中。

[0184] 可通过多种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现防止微生物的作用。在许多情况下,优选在所述组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或者氯化钠。所述可注射组合物的延长吸收可通过在所述组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)实现。

[0185] 在任何情况下,可通过将所需量的活性化合物(例如抗原结合位点)按照需要与本发明中的一种成分或成分组合纳入合适的溶剂中,并随后过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,通过将所述活性化合物纳入无菌载体中来制备分散体系,所述载体含有基本的分散介质和上述所需的其它成分。对于用来制备无菌注射溶液的无菌粉末来说,优选的制备

方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生来自之前的其无菌过滤溶液的活性成分加上任何其它所需成分的粉末。将注射制剂加工,填充入容器(例如安瓿、袋、瓶、注射器或小瓶(vial))中,并根据本领域中已知方法在无菌条件下密封。另外,可将制剂包装并以试剂盒的形式出售。这些产品优选具有标签或包装插入页,其显示相关组合物可用于治疗患有或倾向于患有病症的对象。

[0186] 用于治疗本文所述病症的本发明组合物的有效剂量根据多种不同因素而改变,包括施用方式、靶部位、患者生理状态、患者是人还是动物、所施用的其他药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,所述患者是人,但是也可治疗非人哺乳动物(包括转基因哺乳动物)。治疗剂量可使用本领域技术人员已知的常规方法来逐步确定,以优化安全性和效力。

[0187] 对于用抗体治疗某些疾病而言,剂量范围可以是例如约 0.0001 至 100mg/kg 宿主体重,更常用 0.01 至 5mg/kg(例如 0.02mg/kg, 0.25mg/kg, 0.5mg/kg, 0.75mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg 等)宿主体重。例如,剂量可以是 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或者在 1-10mg/kg 的范围内,优选至少 1mg/kg。上述范围中的剂量中间值也旨在本发明的范围内。可每天、隔天、每周或者根据由经验分析确定的任何其他时间表向对象施用这些剂量。示例性的治疗涉及在长时间段内(例如至少六个月)施用多个剂量。另外的示例性治疗方案涉及每两周一次或每月一次或每 3 至 6 个月一次施用。示例性的给药时间表包括连续每日施用 1-10mg/kg 或 15mg/kg,隔日施用 30mg/kg 或每周施用 60mg/kg。在一些方法中,同时施用具有不同结合特异性的两种或更多抗原结合位点,在这种情况下,所施用的每种抗原结合位点的剂量落入所示范围内。

[0188] 可以多次施用本发明的用于结合表位或肽的抗体。单剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不固定的,如通过测量患者中靶标多肽或靶标分子的血液水平来指示。在一些方法中,调节剂量以实现 1-1000ug/ml 的血浆多肽浓度,在一些方法中是 25-300 μ g/ml。或者,所述抗体可以作为持续释放制剂施用,在这种情况下需要较少次施用。剂量和频率根据患者中抗体的半衰期而不同。抗体的半衰期也可通过与稳定的多肽或部分(例如白蛋白或 PEG)融合来延长。一般说来,人源化抗体显示最长的半衰期,其次是嵌合抗体和非人抗体。在一个实施方案中,可施用非缀合形式的抗体。在另一个实施方案中,可多次施用缀合形式的抗

[0189] 施用的剂量和频率可根据治疗是预防性的还是治疗性的而不同。在预防性应用中,包含抗体或其混合物的组合物施用给尚未处于疾病状态或者处于疾病前状态的患者,以增强患者的抵抗性。此量定义为“预防有效剂量”。在该用途中,精确的量还取决于患者的健康状况和一般免疫性状况,但通常为 0.1 至 25mg/剂,尤其是 0.5 至 2.5mg/剂。以相对不频繁的间隔在长时间段内施用相对低的剂量。一些患者在其有生之年继续接受治疗。

[0190] 在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔施用相对高剂量(例如每剂量约 1 至 400mg/kg 的结合分子(例如抗体),5 至 25mg 的剂量更常用于放射性免疫缀合物,对于细胞毒素-药物缀合分子所用剂量更高),直至疾病的发展减慢或终止,优选地直至患者表现出疾病症状的部分或完全改善。

[0191] 可通过胃肠外、局部、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、腹膜内、鼻内或肌内方式施用治疗剂,用于预防性和/或治疗性治疗,在一些方法中,直接将药剂注射进已累积有非

功能性 P2X₇ 受体细胞的特定组织中,例如使用颅内注射。对于抗体施用而言,优选肌内注射或静脉内输注。

[0192] 可任选地将抗体与可有效治疗需要治疗(例如预防性或治疗性的)之病症或状态的其他试剂组合施用。

[0193] 在另一个实施方案中,提供了包含下列项的试剂盒或产品:如上所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双功能抗体、三功能抗体、融合蛋白、缀合物或药物组合物。

[0194] 在另一些实施方案中,提供了用于上述治疗性应用的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0195] - 容纳下述一种或多种形式之治疗性组合物的容器:抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双功能抗体、三功能抗体、融合蛋白、缀合物或药物组合物;

[0196] - 带有使用说明的标签或包装插页。

[0197] 在某些实施方案中,所述试剂盒可含有一种或多种其他活性物质或成分,用于治疗癌症或预防如上所述的癌症相关并发症。

[0198] 试剂盒或“产品”可包含容器以及容器上或与之相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡罩包装等。容器可以由多种材料(例如玻璃或塑料)形成。容器容纳治疗性组合物,其可有效治疗所述病症并且可具有无菌进入孔(例如,所述容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针穿透的塞子的小瓶)。所述标签或包装插页表明所述治疗性组合物用于治疗所选病症。在一个实施方案中,所述标签或包装插页包括使用说明,并且表明所述治疗性组合物可用于治疗癌症或预防源于癌症的并发症。

[0199] 所述试剂盒可包含(a)治疗性组合物;和(b)第二容器,其中含有第二活性物质或成分。本发明该实施方案中的试剂盒还可包含包装插页,其表明所述及其他有效物质可用于治疗病症或预防来源于癌症的并发症。作为替代或者另外地,所述试剂盒还可包含第二(或第三)容器,其包含可药用缓冲剂,例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。其还可包含基于商业和用户立场所期望的其他材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0200] 在某些实施方案中,提供了本文所述抗体用于确定个体是否患有癌症的用途。在另一些实施方案中,提供了本文所述抗体用于制备确定个体是否患有癌症之装置的用途。在另一些实施方案中,提供了一种确定个体是否患有癌症的方法,包括在形成本发明免疫复合物的条件下使待确定癌症之个体的组织与本发明抗体相接触以及确定是否已形成所述免疫复合物的步骤,由此免疫复合物的形成表明个体患有癌症。所述方法可在体内或体外进行。

[0201] 在一个实施方案中,所述抗体采用下列形式:如上所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双功能抗体、三功能抗体、融合蛋白、缀合物或诊断组合物,并检测所述试剂与所述组织或细胞的结合。

[0202] 对于原位诊断,可通过本领域已知的方法将抗原结合位点或其任何活性和功能性部分施用给待诊断的生物体,所述方法例如静脉内、鼻内、腹膜内、脑内、动脉内注射,使得本发明抗原结合位点与非功能性 P2X₇ 受体上表位区域之间可发生特异性结合。抗体/抗原复合物可通过与抗原结合位点或其功能性片段相连的标记或者本领域已知的任何其他

检测方法而方便地进行检测。

[0203] 根据本发明以及如本文所述的用于诊断应用的免疫测定通常依赖带标记的抗原、抗体或用于检测的第二试剂。可用本领域技术人员通常已知的化合物来标记这些蛋白质或试剂,所述化合物包括酶、放射性同位素以及荧光、发光和生色物质,其包括但不限于有色颗粒(例如胶体金和乳胶珠)。在这些形式中,放射性标记可用于几乎所有类型的测定并且可具有最多的变化形式。在必须避免放射性时或者需要快速得出结果时,酶缀合的标记是特别有用的。尽管其使用需要昂贵的设备,但是荧光染料提供了非常灵敏的检测方法。可用于这些测定的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体以及亲和纯化的多克隆抗体。

[0204] 或者,可通过与对免疫球蛋白具有亲和力的带标记物质(例如蛋白质 A 或 G 或第二抗体)反应来间接标记所述抗体。所述抗体可以与第二物质缀合,并用带标记的第三物质检测,所述第三物质具有针对与抗原结合位点缀合之第二物质的亲和力。例如,所述抗体可以与生物素缀合,使用带标记的亲合素或链霉亲和素检测抗原结合位点-生物素缀合物。类似地,所述抗体可以与半抗原缀合,使用带标记的抗半抗原抗体检测所述抗体-半抗原缀合物。

[0205] 目前的免疫测定利用双抗体(double antibody)法检测分析物的存在,其中通过与已用可检测标记进行标记过的第二抗体的反应性来间接标记所述抗体。所述第二抗体优选是与抗体所来源动物之抗体结合的抗体。换句话说,如果所述抗体是小鼠抗体,则带标记的第二抗体是抗小鼠抗体。对于本文所述免疫测定中使用的抗体而言,此标记优选是抗体包被的珠,特别是磁珠。对于本文所述免疫测定中使用的抗原结合位点而言,所述标记优选是可检测的分子,例如放射性、荧光或电化学发光物质。

[0206] 在本发明的范围内也可使用替代性双功能抗体系统,其常常称为快速形式系统,因为它们适于快速确定分析物的存在。该系统需要抗原结合位点与分析物之间的高亲和力。根据本发明的一个实施方案,使用各自对 P2X₇ 受体蛋白具有特异性的抗原结合位点对来确定非功能性 P2X₇ 受体的存在。所述抗原结合位点对中的一个在本文中称为“检测用抗原结合位点”,所述抗原结合位点对中的另一个在本文中称为“捕获用抗原结合位点”。本发明的抗原结合位点可用作捕获用抗原结合位点或检测用抗原结合位点。在单个测定中,本发明的抗原结合位点也可同时用作捕获用抗原结合位点和检测用抗原结合位点。因此,在本发明的一个实施方案中,使用双抗原结合位点夹心法检测生物流体样品中的非功能性 P2X₇ 受体。在该方法中,分析物(非功能性 P2X₇ 受体蛋白)夹在检测用抗原结合位点和捕获用抗原结合位点之间,所述捕获用抗原结合位点不可逆地固定于固相载体上。所述检测用抗原结合位点含有可检测标记,从而鉴定抗原结合位点-分析物夹心物的存在,并从而检测分析物的存在。

[0207] 示例性的固相物质包括但不限于放射免疫测定和酶免疫测定领域中 所公知的微量滴定板、聚苯乙烯试管、磁珠、塑料珠或玻璃珠以及载玻片。将抗原结合位点与固相偶联的方法也是本领域技术人员公知的。最近,许多多孔性材料(例如尼龙、硝酸纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维及其他多孔性聚合物)已用作固相支持物。

[0208] 在另一个实施方案中,提供了包含下列项的诊断组合物:如上所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双功能抗体、三功能抗体、融合蛋白或缀合物,稀释剂以及任选的标记。

[0209] 优选地,诊断组合物中使用的抗体是带可检测标记的。有多种方法可用于标记生物分子,其是本领域技术人员公知的,并且认为其在本发明的范围内。有本领域技术人员已知的多种不同的标记和进行标记的方法。可用于本发明的标记类型的实例包括酶、放射性同位素、胶体金属、荧光化合物、化学发光化合物和生物发光化合物。

[0210] 常用的标记包括荧光染料(如荧光素、罗丹明、得克萨斯红等)、酶(如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶)、放射性同位素(如 ^{32}P 或 ^{125}I)、生物素、地高辛、胶体金属、化学或生物发光化合物(如二噁烷、鲁米诺或吖啶鎓),等等。标记方法(如酶法或生物素基团的共价偶联、碘化、磷酸化、生物素化等)是本领域公知的。

[0211] 检测方法包括但不限于放射自显影、荧光显微术、直接和间接酶促反应等。常用的检测测定包括放射性同位素或非放射性同位素方法。这些包括 Western 印迹、叠加测定、RIA(放射免疫测定)和 IRMA(免疫放射性免疫测定)、EIA(酶免疫测定)、ELISA(酶联免疫吸附测定)、FIA(荧光免疫测定)和 CLIA(化学发光免疫测定)。

[0212] 在另一个实施方案中,提供了包含下列项的试剂盒或产品:如上所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、Fab、dab、scFv、双功能抗体、三功能抗体、融合蛋白、缀合物或诊断组合物。

[0213] 在另一些实施方案中,提供了用于上述诊断性应用的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0214] - 根据本发明的抗体,以及任选地:

[0215] - 根据本发明的肽;

[0216] - 带有使用说明的标签或包装插页。

[0217] 试剂盒或“产品”可包括容器以及容器上或与之相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡罩包装等。所述容器可以由多种材料(例如玻璃或塑料)形成。所述容器容纳诊断性组合物,其可有效检测癌症并且可具有无菌进入孔(例如,所述容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针穿透的塞子的小瓶)。所述标签或包装插页表明所述诊断组合物可用于检测所选病症。在一个实施方案中,所述标记或包装插页包括使用说明,并表明所述诊断组合物可用于检测癌症。

[0218] 所述试剂盒可包括(a)诊断性组合物;和(b)第二容器,其中含有第二诊断药剂或第二标记。其还可包含基于商业和用户立场所期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器等。

[0219] 实施例 1:确定非功能性 P2X₇ 受体的三维模型以鉴定抗体结合的假定表位。

[0220] P2X₇ 单体结构基于 Hansen 等人 1998(Hansen, M. A., Barden, J. A., Balcar, V. J., Keay, K. A., Bennett, M. R. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 236, 670-675. Structural motif and characteristics of the extracellular domain of P2X receptors) 进行的模型构建,其中确定了 P2X 亚类之间的结构同源性。将其应用于上文 Hansen 所鉴定的两个细胞外结构域中较大的一个时,在 PDB 数据库中获得了与 Ser 转移酶结构的进一步的结构同源性。

[0221] 此模型成为鉴定对于结合 ATP 来说关键残基的基础。使用定点诱变将这些鉴定的残基改变为 Ala,并在 HEK 细胞中表达突变受体用于测定 P2X₇ 通道/孔的功能。

[0222] 然后,将所发现的由于 ATP 不能与所表达受体结合而导致功能丧失的各个关键残基定位于大细胞外结构域模型的不同侧。例如,SEQ ID NO:1 中的 Arg307 和 Lys311 在 ECD

的一侧,而 SEQ ID NO:1 中的 Lys193、Arg294、His201 和 Phe275 在 ECD 的另一侧,其距离为约 30 埃。

[0223] 该发现表明,单体的组装需要不同的关键氨基酸簇之间的紧密三维结合。对残基在构象空间中接近的三聚体的建模得到了提示相邻单体上表位靶标的模型。我们观察到,SEQ ID NO:1 的 200 至 216 位区域(本文中为 E200)暴露于非功能性 P2X₇,因为只有那些非功能性受体可结合针对 E200 产生的抗体。我们还观察到,SEQ ID NO:1 的 297 至 313 位区域(本文中为 E300)暴露于非功能性 P2X₇,因为只有那些非功能性受体可结合针对 E300 产生的抗体。根据我们的建模,这些表位在组装的三聚体模型中在构象空间中相邻。

[0224] 为了测试组装受体模型的准确性,尽管 NMR 分析的 X 射线衍射是未知的,设计出了具有下述界面的模型,所述界面由暴露的能够与对非功能性形式受体具有特异性之抗体相结合的残基组成。选择存在于相邻单体面上的 E200 和 E300 区域的组成部分并根据该模型留出间隔,该间隔理想地为 10 埃。非功能性受体中可接近的提议界面的取向和间隔是构建如下所述的复合肽靶标的基础。

[0225] E200 区域的出现仅在 Pro210 残基(SEQ ID NO:1)为顺式时发生。将该残基锁定为反式导致抗体不能结合受体,因为 E200 区域未暴露出来。将 Pro210 锁定为反式是与功能性受体的结构相一致的。功能性受体具有独特的(单一)构象。如果为了下列应用要产生结合非功能性受体的特异性抗体,那么暴露于功能性残基表面上的所有残基都能够对期望避免的表位有贡献,所述应用包括不与功能性受体交叉反应的治疗性靶向非功能性受体。当 Pro210 为反式时,E200 区域中的残基通过 ATP 结合位点(由 P2X₇ 单体的正确包装形成)的正确形成而相对于结合抗体隐藏起来。这些残基只有在顺式时暴露于能够区分功能性和非功能性三聚体的选择性抗体。针对非功能性三聚体产生的靶向单体界面并结合两个相对面上残基的抗体可描述为“三聚体特异性结合物”,因为与单体结合会降低约 50 倍。

[0226] 实施例 2:肽设计

[0227] 特异性选择形成非功能性 P2X₇ 受体之单体间可接近界面的复合肽包括减少 E200 和 E300 区域各自的长度,从而选择能够桥连单体的抗体(区别与所选出的与一个或另一单体界面(即 E200 或 E300)结合的抗体)。出于这个原因,E200 区域的长度从 SEQ ID NO:1 的 200-216 减少到 200-211,该区域仍能够同时结合两个抗体,另外 E300 区域从 SEQ ID NO:1 的 297-313 减少到 296-306,以帮助抗体桥连 E200 和 E300,而不是仅仅结合 E200 或 E300。设计存在 SEQ ID NO:1 的残基 211 和 296 以补充残基 AG,其加入还用于形成适当分隔构象空间中区域所需的间隔。如 10 年工作得到的指导模型所推导出的,E200 和 E300 区域各自长度的减少连同适当的间隔防止了如下抗体的形成,所述抗体有可能跨越受体上间隔很宽的残基,导致扭曲和亲和力的相当的损失。

[0228] 根据标准技术,通过固相合成并使用马来酰亚胺己酰基-N-羟基琥珀酰亚胺(MCS)接头缀合制备了 GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK 序列形式的复合肽。

[0229] 实施例 3:单克隆抗体的产生

[0230] 3.1 方法

[0231] 用与白喉毒素缀合的 200/300 肽形式的上述多种复合肽接种小鼠。一种肽具有序列:GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK。在最终加强之前,根据活性来筛选动物,对状态最好的动物进行了加强,然后将其处死并取出脾脏。分离脾细胞,将其与 Sp2/0 融合伴侣细胞系融

合,其比例根据所用形式不小于 1 : 2 且不大于 1 : 5。将剩余脾细胞在培养基中培养 3 天,上清留作测定体系中的阳性对照。

[0232] 融合 1- 复合 E200/E300,使用 96 孔板,1 个板使用巨噬细胞饲养层,其他 4 个仅使用条件培养基。

[0233] 巨噬细胞平板编号为 5 和 10。

[0234] 杂交步骤

[0235] 1. 向融合管 1 加 EBSS 至 50ml,以 600rpm 离心 8 分钟。

[0236] 2. 从管 1 中移出上清,加 10ml EBSS,混合,加 15ml EBSS。

[0237] 融合管 2,步骤 1。

[0238] 以 600rpm 将管 1 和 2 离心 8 分钟。

[0239] 3. 融合管 2 按照步骤 2 进行,融合管 3 按照步骤 1。

[0240] 将管 2 和 3 以 600rpm 离心 8 分钟。

[0241] 4. 融合管 1,除去上清,轻敲管使得沉淀松动。

[0242] 将计时器设置为 8 分钟。

[0243] 用 1ml 移液器在 1 分钟内逐滴加入 0.8ml PEG 混合物,轻轻混合。

[0244] 将管转移至水浴放置 1 分钟。

[0245] 用 1ml 移液器在 1 分钟内逐滴添加 1ml 的 I no hepes,轻轻混合。

[0246] 用 10ml 移液器在 5 分钟内逐滴添加 20ml 的 I no hepes,轻轻混合。

[0247] 5. 管 3 按照步骤 2 进行,然后将管 1 和 3 一起离心。

[0248] 6. 管 2 按照步骤 4 进行。

[0249] 7. 管 1 除去上清,添加 10ml 的 I sc(+20% FBSI)+/-HAT,重悬,再添加 30ml。

[0250] 8. 将管 1 和 2 一起离心。

[0251] 9. 管 3 按照步骤 4 进行。

[0252] 10. 管 1,除去上清,对于 24 孔形式而言,重悬于 10ml I sc(+20% FBSI)+HAT 中,每孔加样 0.05ml,或者对于 96 孔形式而言,重悬于 40ml 中,每孔加样 0.1ml。前 8 盘(24 孔),每孔加样 0.05ml,前 4 盘(96 孔),每孔加样 0.1ml。

[0253] 11. 管 2 按照步骤 7 进行,管 3 按照步骤 4 进行,继续该过程直至所有管都加样到盘中。

[0254] ELISAS

[0255] 将表位包被至 PVC(聚氯乙烯)板上,用于捕获来自细胞上清的抗体。将未知样品与已知的阳性和阴性对照进行比较。

[0256] 使用连接有 BSA 载体蛋白的 EP200/300 包被 ELISA 板用于检测。

[0257] 上清检测

[0258] • 当孔汇合时,除去将 0.05ml 培养基移至样品管或板以外去除所有培养基。

[0259] • 检测抗体产生,扩增阳性,弃去阴性。

[0260] • 将扩增的阳性置于含有 2ml 培养基的 25cm 培养瓶中,使之竖直。

[0261] • 扩增至 4ml、2x4ml、2x75cm 培养瓶(12ml)。将体积扩大至 30ml/瓶。

[0262] 当细胞汇合时冷冻母液。

[0263] • 对冷冻上清再次检测。

[0264] 所有 ELISA 测定中通用的标准方案。

[0265] • 以 $1\ \mu\text{g/ml}$ 浓度包被表位, 用 $50\ \mu\text{l}$ / 孔的 PBS 稀释, 在室温下振摇过夜。

[0266] • 用 PBS (无 Ca/Mg) 冲洗孔

[0267] • 用含 0.1% 卵清蛋白的 PBS ($200\ \mu\text{l}$ / 孔) 将孔封闭 1 小时

[0268] • 用 PBS 冲洗

[0269] • 筛选上清 (一式两份), $50\ \mu\text{l}$ / 孔 - 在室温下振摇 2 小时

[0270] • 用 PBS 冲洗三遍

[0271] • 兔抗小鼠 HRP, 1/1000 (在封闭液中), $50\ \mu\text{l}$ / 孔 - 在室温下振摇 1.5 小时

[0272] • 用 PBS 洗四遍

[0273] • 0.05M 柠檬酸中的 1.1mg/ml 底物 Sigma ABTS (2,2' - 联氨 - 双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸二铵盐) + $2\ \mu\text{l}$ 过氧化氢 / 10ml (进行活化), 其是新鲜制备的。

[0274] • 向孔中添加 ABTS, 保持 30 分钟, $100\ \mu\text{l}$ / 孔, 用 $25\ \mu\text{l}$ / 孔的 5% 草酸终止反应

[0275] • 在测试波长 405/ 参比波长 490nm 下读数

[0276] 3.2 结果

[0277] 除了含有巨噬细胞的之外, 所有板中的产率都非常低。三轮 ELISA 筛选鉴定出 37 个克隆, 其分泌对复合肽特异性的物质。这些克隆中的许多死去或者停止分泌。扩增存活的那些, 冷冻至 5 个安瓿。在下列实施例中确定血清学特征, 包括与 E200 和 E300 的交叉反应性。

[0278] 实施例 4: 抗体的血清学特征

[0279] 对具有 E200 或 E300 区域序列的肽, 筛选针对复合肽产生的抗体。尽管这些抗体均能够结合这些靶标, 但要鉴定出与所述复合肽具有更佳结合的抗体。

[0280] 4.1 测试交叉反应性

[0281] 使用如上所述的 ELISA 筛选了实施例 3 产生的针对复合肽 (COMP)、U140 (具有功能性和非功能性受体上均存在之表位的序列的肽)、200 (具有 E200 区域之序列的肽)、300 (具有 E300 区域之序列的肽) 和 U80 (具有功能性和非功能性受体上均存在之表位的序列的肽) 的抗体。结果显示于下表和图 9 中。

[0282] U80 的交叉反应性很可能是由于 DT 标签所致, 因为用 DT 标签免疫动物, ELISA 中所用的 U80 具有 DT 标签。

[0283]

20分钟	T/C supn	BSA	COMP	U140	200	300	U80						
	2A11	0.125	0.137	3.625	3.602	0.17	0.508	0.138	0.194	0.144	0.186	0.181	0.154
	2F6	0.236	0.26	1.332	1.323	1.615	1.612	1.371	1.402	1.405	1.411	1.133	0.922
	3D6	0.326	0.335	1.293	1.219	1.563	1.427	1.014	1.037	1.123	1.109	0.99	1.079
	4F5	0.122	0.121	3.265	3.503	0.141	0.139	0.127	0.124	0.155	0.139	0.132	0.143
Comp	5C5	0.12	0.122	0.163	0.166	0.155	0.162	0.14	0.145	0.143	0.146	0.158	0.182
	5C8	0.155	0.157	0.256	0.27	0.315	0.304	0.234	0.214	0.241	0.244	0.378	0.404
	5D5	0.122	0.121	0.814	0.801	0.136	0.132	0.133	0.137	0.132	0.126	0.133	0.137
	5F3	0.125	0.123	3.531	3.57	0.165	0.157	0.139	0.175	0.149	0.146	0.152	0.223
	5F5	0.292	0.283	1.013	1.04	1.155	1.215	0.93	0.832	0.978	0.903	1.034	1.049
	lsc	0.126	0.122	0.144	0.114	0.142	0.164	0.129	0.128	0.128	0.179	0.15	0.49
Comp +ve		0.163	0.165	3.607	3.613	3.62	3.59	2.678	2.501	2.707	2.916	3.597	3.565
平均值		BSA	Comp	U140	200	300	U80						
	2A11	0.131	1.881	3.614	1.886	0.339	0.323						
	2F6	0.248	0.796	1.328	1.469	1.614	1.492						

[0284]

	3D6	0.331	0.814	1.256	1.391	1.495	1.221
	4F5	0.122	1.693	3.384	1.822	0.140	0.133
		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Comp	5C5	0.121	0.143	0.165	0.161	0.159	0.151
	5C8	0.156	0.207	0.263	0.293	0.310	0.269
	5D5	0.122	0.468	0.808	0.469	0.134	0.133
	5F3	0.124	1.827	3.551	1.868	0.161	0.148
	5F5	0.288	0.648	1.027	1.098	1.185	1.073
	IsC	0.124	0.133	0.129	0.128	0.153	0.147
	Comp +ve	0.164	1.886	3.610	3.617	3.605	3.134

[0285] 实施例 5 : 单克隆抗体 2F6 与活肿瘤细胞上非功能性 P2X₇ 的结合

[0286] 通过荧光活化细胞分选 (FACS) 分析对本发明的经纯化抗体与表达非功能性 P2X₇ 的人肿瘤细胞系以及与表达功能性 P2X₇ 的人造血细胞之间的结合进行分析。表 6 归纳了一种单克隆抗体 (MAb) 2F6 与这些细胞的结合。FACS 分析证实了 MAb 2F6 与前列腺肿瘤细胞系 PC3 的结合, 其平均荧光强度 (MFI) 为 334.62, 相比之下阴性对照抗体的 MFI 为 27.87。还观察到了 MAb 2F6 与乳腺肿瘤细胞系 MCF-7 的结合, 但是较弱 (2F6 和 3D6 对照的 MFI 分别为 160.3 和 50.4)。但是, 基本上未检测到与所测人淋巴细胞的结合 (表 6)。图 8 显示随后的 FACS 分析实验的结果, 类似地证实了 MAb 2F6 与 PC3 前列腺肿瘤细胞系以及 MCF-7 乳腺肿瘤细胞系的结合, 但是不与人淋巴细胞样品结合。

[0287] 表 6 : MAb 2F6 与肿瘤细胞系和人淋巴细胞结合的 FACS 分析

[0288]

	PC3 前列腺肿瘤细胞		MCF-7 乳腺肿瘤细胞系		人淋巴细胞	
MAb	平均荧光强度 (MFI)	阳性细胞 百分数	平均荧光强度 (MFI)	阳性细胞 百分数	平均荧光强度 (MFI)	阳性细胞 百分数
IgM 阴性对照 (3D6)	27.87	1	50.40	0	17.68	0
HLA (W6/32) 阳性对照	NT*	NT	1667.92	87	3897.33	100
2F6	334.62	47	160.30	5	22.34	1

[0289] *未测试

[0290] 应当理解,本说明书所公开和定义的本发明扩展至正文或附图中所提及或显而易见的单个特征中的两个或更多个的所有可选组合。所有这些不同的组合构成了本发明的多个可替代方面。

[0001]

序列表

<110> 生物权威国际有限公司

<120> 抗P2X7肽和表位

<130> 81588191 TPG

<150> AU 2008903451

<151> 2008-07-04

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 595

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0002]

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

[0003]

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> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu
1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile Leu

[0004]

1 5

<210> 5
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu

<210> 6
 <211> 49

[0005]

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala
 1 5 10 15

Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val
 20 25 30

Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe
 35 40 45

Asp

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val
 1 5 10 15

Phe

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

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

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys
 1 5 10

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

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

Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys
 20 25

1 MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFS Y VCFALVSDKL YQRKEPVISS

61 VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKL VHSVFD T ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLRCP

5 121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA

181 LLNSAENFTV LIKNNIDFP G HNYTTRN ILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD

241 NFSDVAIQGG IMGIEIYWD C NLDRWFHHC R PKYSFRRLLD KTTNVS LYPG YNFRYAKYYK

301 ENNVEKRTLI KVFGIRFDIL VFGTGGKFDI IQLVVYIGST LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS

361 NCCRSHIYPW CKCCQPCVWN EYYYRKKCES IVEPKPTLKY VSFVDESHIR MVNQQLLGRS

10 421 LQDVKGQEV P RPAMDFTDLS RLPLALHDT P PIPGQPEEQ LLRKEATPRS RDSPVWCQCG

481 SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPGACITTS ELFRKLVLSR HVLQFLLLYQ EPLLALDVDS

541 TNSRLRHCA Y RCYATWRFGS QDMADFAILP SCCRWIRKE FPKSEGQYSG FKSPY

(SEQ ID NO: 1)

图 1

15 HNYTTRN IL (SEQ ID NO: 2)

GHNYTTRN IL (SEQ ID NO: 3)

图 2

图 3

DFPGHNYTTRN IL (SEQ ID NO:4)

图 4

1 MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFS Y VCFALVSDKL YQRKEPVISS

5 61 VHTKVKGIAE VKEEIVENG V KKL VHSVFD T ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLRCP

121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA

181 LLNSAENFTV LIKNNIDFP G HNYTTRN IL

(SEQ ID NO:5)

图 5

10 KTTNVSLYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTLKVFGRFDILVFGTGGKFD

(SEQ ID NO: 6)

图 6

KYYKENNVEKRTLKVF

GHNYTTRNILP

AKYYKENNVEK

(SEQ ID NO: 7)

(SEQ ID NO: 8)

(SEQ ID NO: 9)

15

图 7a

5

图 7

图 7b

GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK

(SEQ ID NO: 10).

图 7c

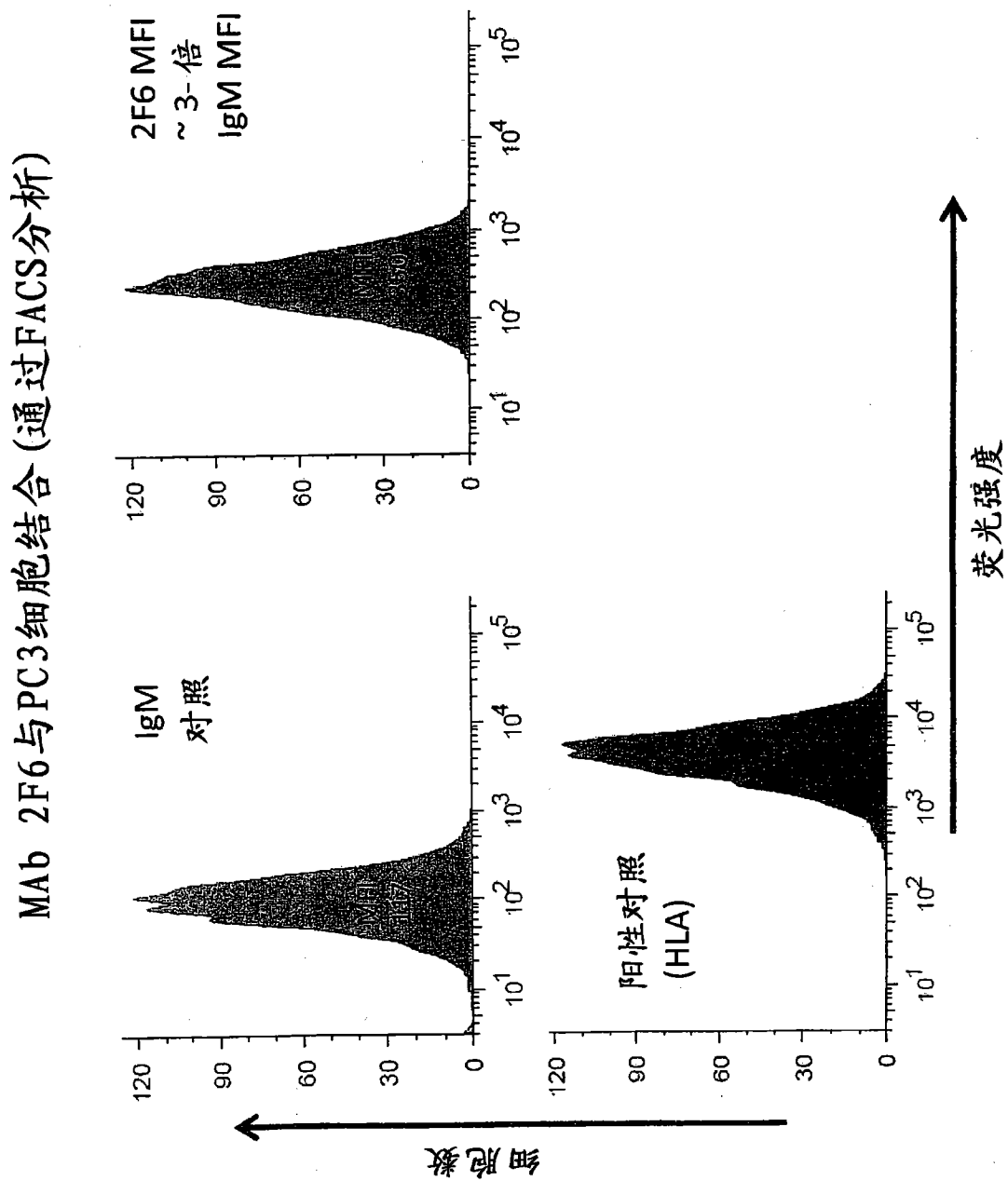


图 8a

MAb 2F6与MCF7细胞结合(通过FACS分析)

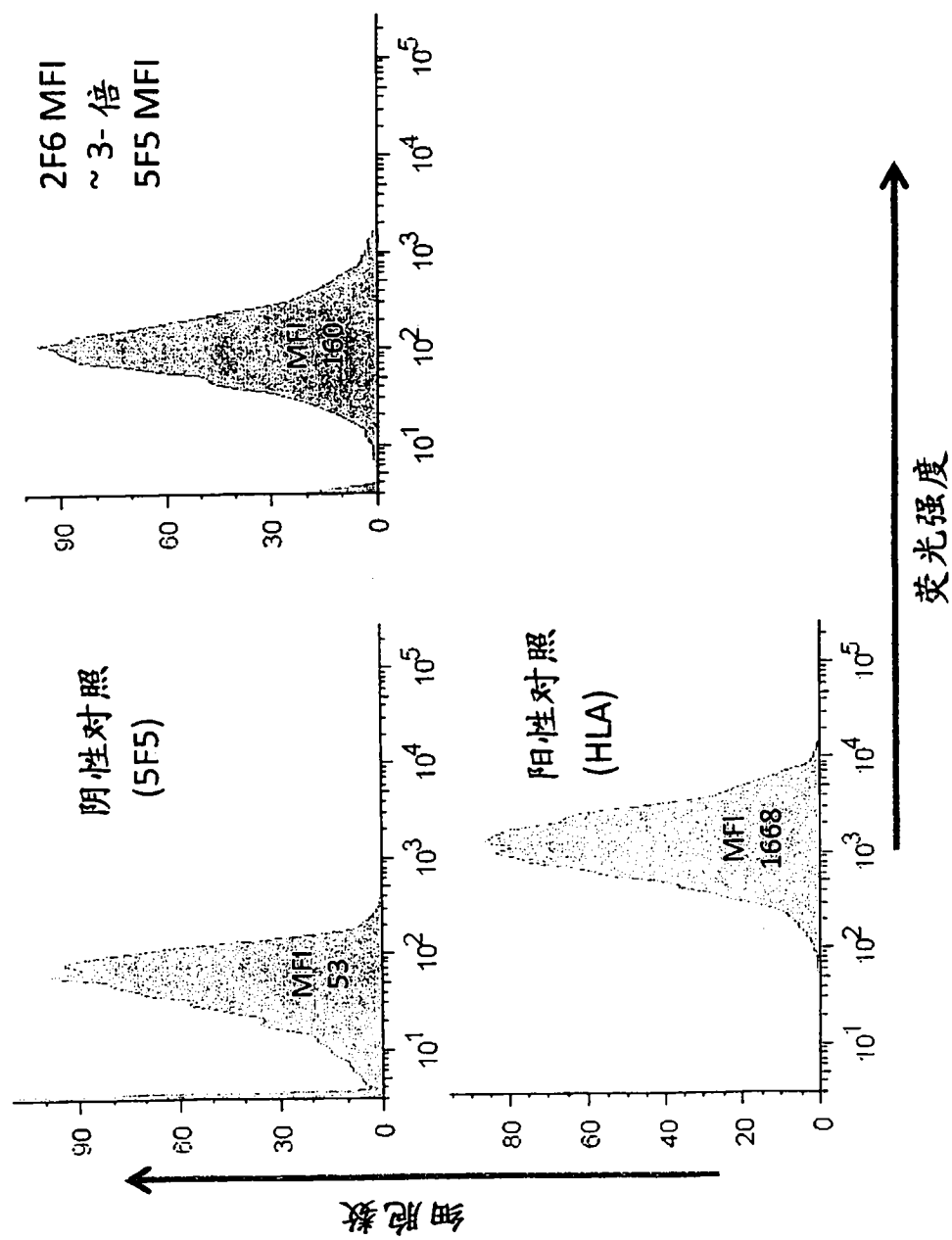
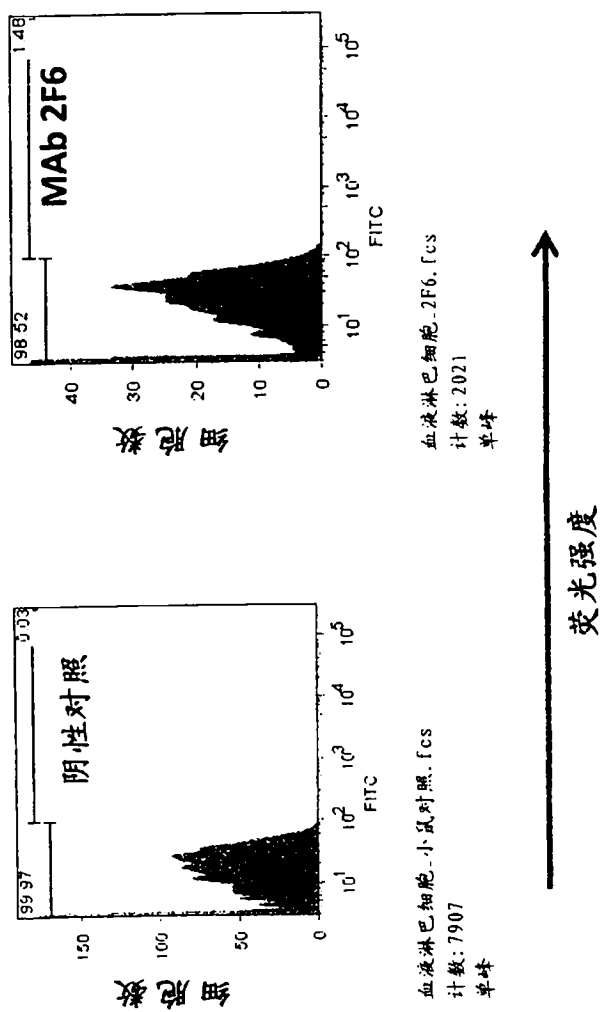


图 8b

Mab 2F6未与人淋巴细胞上的功能性P2X7结合(通过FACS分析)



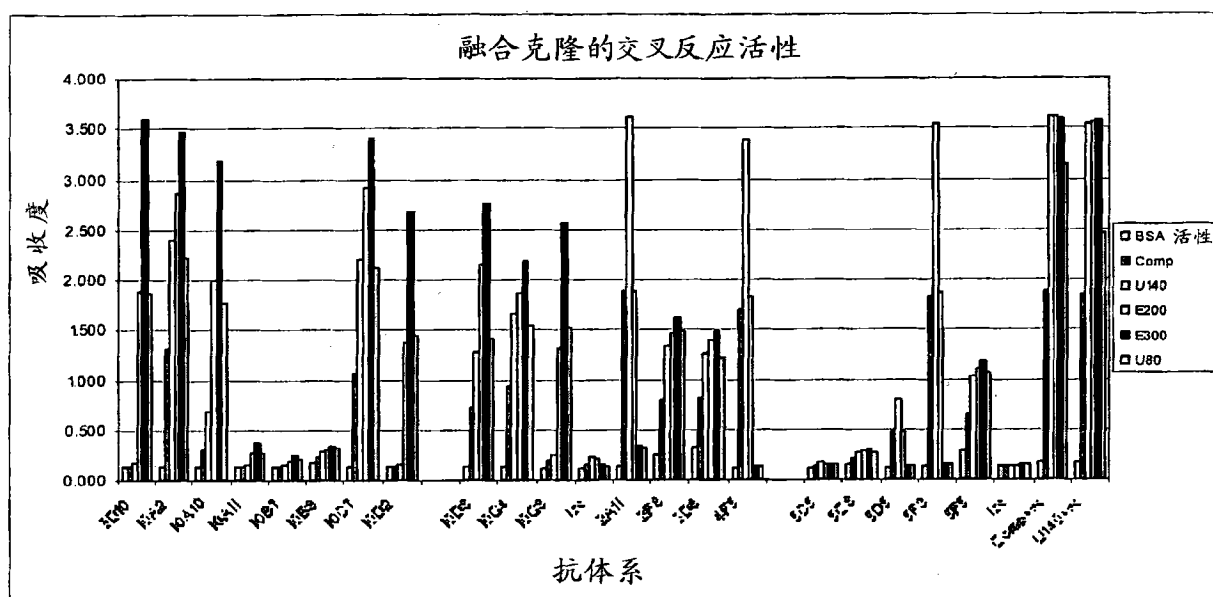


图 9