

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-515473

(P2017-515473A)

(43) 公表日 平成29年6月15日(2017.6.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-565470 (P2016-565470)	(71) 出願人	506042265
(86) (22) 出願日	平成27年5月2日 (2015.5.2)		メディミュン リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年10月31日 (2016.10.31)		イギリス国 シービー21 6ジーエイチ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/059633		ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グ
(87) 国際公開番号	W02015/166105		ランタ パーク, ミルステイン ビルディ
(87) 国際公開日	平成27年11月5日 (2015.11.5)		ング
(31) 優先権主張番号	61/987, 929	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成26年5月2日 (2014.5.2)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 イオンチャネルモジュレーターおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は、P 2 X 4 ポリペプチドに特異的に結合しかつ P 2 X 4 チャネル活性を調節する抗体、組換え P 2 X 4 ポリペプチド、およびかかるポリペプチドを作成するための方法、ならびに抗 P 2 X 4 抗体を作成するための組成物および方法、ならびに神経障害性疼痛および他の徴候の治療のために P 2 X 4 抗体を用いる方法を提供する。

【選択図】

図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト P 2 X 4 ポリペプチドに特異的に結合し、かつチャネル活性を調節する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

P 2 X 4 増強物質である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

P 2 X 4 拮抗剤である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

P 2 X 4 生物学的活性を少なくとも約 10 %、約 25 %、約 50 %、約 75 %、約 85 %、約 90 % または約 95 % 低下させる P 2 X 4 拮抗剤である、請求項 3 に記載の抗体。 10

【請求項 5】

ヒト P 2 X 4 アミノ酸 110 ~ 166 を含むエピトープに結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

アミノ酸 118、122 ~ 139、145、159、180、183、184、231、および 244 からなる群から選択される 1 つ以上のヒト P 2 X 4 アミノ酸を含むエピトープに結合する、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

P 2 X 4 の位置 131 でのアミノ酸置換により、ヒト P 2 X 4 ポリペプチドへの抗体結合が低下するかまたは失われる、請求項 5 に記載の抗体。 20

【請求項 8】

ヒト P 2 X 4 の位置 131 のセリンがアスパラギンによって置換される、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体またはその断片が、

a . 配列 : $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5$ を含む重鎖可変領域 C D R 1 (ここで、

X_1 は G、N、S、D、または R であり ;

X_2 は Y、A、H、F、または S であり ;

X_3 は A、W、Y、S、G、F、W、E、D、または P であり ; 30

X_4 は M、I、W、L、I、F、または V であり ;

X_5 は S、G、T、H、または N である) ; かつ / または

b . 配列 : $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15}$, X_{16} を含む重鎖可変領域 C D R 2 (ここで、

X_1 は A、R、I、T、E、S、A、V、W、N、G、E、R、または Y であり ;

X_2 は I または M であり ;

X_3 は S、K、Y、D、N、W、または I であり ;

X_4 は S、D、G、H、N、R、Y、または V であり ;

X_5 は G、D、S、F、N、R、F、D、または T であり ;

X_6 は G、S、N、または T であり ; 40

X_7 は S、T、D、Y、N、A、E、M、F、または D であり ;

X_8 は T、I、K、または A であり ;

X_9 は Y、D、R、N、G、Q、E、H、または K であり ;

X_{10} は Y、Q、S、または V であり ;

X_{11} は A、S、N、または V であり ;

X_{12} は D、A、P、R、または Q であり ;

X_{13} は S、P、K、または N であり ;

X_{14} は V、F、L、または A であり ;

X_{15} は K、Q、または E であり ;

X_{16} は G、S、A、または D である) ; かつ / または 50

c. 配列: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ を含む重鎖可変領域CDR3(ここで、
 X_1 はE、N、D、R、K、G、S、A、Y、V、P、またはHであり；
 X_2 はE、L、R、Q、T、G、F、P、Y、K、A、S、V、またはFであり；
 X_3 はR、A、T、G、V、S、M、W、Y、D、H、N、E、L、またはIであり

；

X_4 はG、L、R、D、T、G、Y、S、E、F、Q、C、I、M、V、N、K、またはPであり；

X_5 はS、G、Y、D、W、T、S、N、I、D、V、E、またはCであり；

X_6 はY、A、S、W、T、L、G、E、F、K、V、I、またはDであり；

X_7 はD、E、またはGであり；かつ

X_8 はY、S、V、L、M、Q、I、S、I、H、F、またはDである)

を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項10】

前記重鎖可変領域CDR2が、任意選択的に、アミノ酸 $X_3 \sim X_4$ の間に1～3個のアミノ酸 $X_aX_bX_c$ の挿入を含み、ここで、

X_a はG、S、P、W、Y、E、A、R、またはNであり；かつ

X_bX_c は各々、KTである、

請求項9に記載の抗体。

【請求項11】

前記重鎖可変領域CDR3が、任意選択的に、1～14個のアミノ酸 $X_a \sim X_n$ の挿入を含み、ここで、

X_a はF、R、S、Y、L、D、G、V、I、T、またはAであり；

X_b はG、R、Y、F、T、D、S、G、V、M、D、またはRであり；

X_c はF、W、A、G、T、I、S、F、Y、C、L、V、R、またはNであり；

X_d はS、F、M、G、Y、L、S、A、D、L、R、V、C、またはSであり；

X_e はG、Y、S、T、P、F、Y、R、A、E、G、Q、N、またはLであり；

X_f はY、N、G、T、R、F、A、M、W、P、またはVであり；

X_g はY、M、S、V、F、A、P、S、D、R、H、P、E、またはRであり

X_h はY、G、M、F、G、P、V、F、H、T、またはGであり、

X_i はT、IG、R、またはFであり；

X_j はY、G、H、またはEであり；

X_k はY、G、F、またはNであり；

X_l はF、またはNであり；

X_m はYであり；かつ

X_n はFである、

請求項9に記載の抗体。

【請求項12】

前記重鎖可変領域CDR1が配列SYX₁MX₂を含み、ここで、 X_1 はA、W、Y、S、G、F、E、D、またはPであり、かつ X_2 はS、G、T、H、またはNである、請求項9に記載の抗体。

【請求項13】

前記重鎖可変領域CDR1が、配列：

XYAMS(式中、XはS、D、G、NまたはRである)

SXAMS(式中、XはY、A、H、F、またはSである)

SYXMS(式中、XはA、W、Y、S、G、F、E、D、またはPである)

SYAXS(式中、XはM、I、W、L、F、またはVである)

SYAMX(式中、XはS、G、T、H、またはNである)

を含む、請求項9に記載の抗体。

【請求項14】

前記重鎖可変領域CDR1が、アミノ酸SYAMSを含む、請求項9に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記重鎖可変領域 C D R 2 が、配列

A I S G S G G S T Y Y A D S V K G ; または

A I S G S G G S T Y Y A D S V E G

を含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 16】

前記重鎖可変領域 C D R 3 が、配列 D W Y F D L または N W Y L D L を含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 17】

前記抗体またはその断片が、

a . 配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$ を含む軽鎖可変領域 C D R 1 (ここで

X_1 は T、G、R、S、または Q であり ;

X_2 は G、A、または L であり ;

X_3 は S、T、D、または H であり ;

X_4 は S、N、K、A、Q、T、または V であり ;

X_5 は G、I、L、S、または D であり ;

X_6 は A、G、R、P、I、D、S、E、または T であり ;

X_7 は G、N、M、D、K、S、R、Y、または T であり ;

X_8 は Y、K、F、Q、S、N、Y、D、H、または R であり ;

X_9 は D、N、Y、W、F、M、G、または S であり ;

X_{10} は V、A、L、I、G、または P であり ;

X_{11} は H、T、S、Y、A、Q、Y、N、または F である) ;

b . 配列 : $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$ を含む軽鎖可変領域 C D R 2 (ここで、

X_1 は G、Y、Q、K、N、D、R、A、または E であり ;

X_2 は N、D、K、A、V、G、または T であり ;

X_3 は N、S、T、I、K、Y、または D であり ;

X_4 は N、D、Y、K、E、T、N、S、または Q であり ;

X_5 は R、または L であり ;

X_6 は P、E、A、S、または Q であり ;

X_7 は S、P、または T である) ;

c . 配列 : $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ を含む軽鎖可変領域 C D R 3 (ここで、

X_1 は Q、N、A、G、D、S、または L であり ;

X_2 は S、V、A、Q、T、L、または H であり ;

X_3 は Y、W、R、A、S、Q、T、または G であり ;

X_4 は D、Y、I、N、M、または H であり ;

X_5 は T、M、S、N、D、R、G、または K であり ;

X_6 は N、T、S、G、F、L、または D であり ;

X_7 は L、T、G、P、A、I、または N であり ;

X_8 は K、W、V、I、P、G、L、R、または Y であり ; かつ

X_9 は V、L、または T である)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 18】

前記軽鎖可変領域 C D R 1 が、任意選択的に、 $X_4 \sim X_5$ の間に 1 ~ 3 個のアミノ酸 X_a ~ X_c の挿入を含み、ここで、

X_a は S または G であり ;

X_b は N、D または S であり ; かつ

X_c は I または V である、

請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記軽鎖可変領域 C D R 3 が、任意選択的に、X 7 ~ X 8 の間に 1 ~ 3 個のアミノ酸 X_a ~ X_c の挿入を含み、ここで、

X_a は D、N、A、T、S、I または H であり；

X_b は H、Y、G、A、R、L、S、または P であり；かつ

X_c は S である、

請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 20】

前記軽鎖可変領域 C D R 1 が、以下の配列：

S G D K L；

S G S S S N I G；

S G D A L；

R A S Q G I S S W L A；または

R A S Q G I S R W L A

のうちの 1 つを含む、請求項 17 に記載の抗体。

10

【請求項 21】

前記軽鎖可変領域 C D R 2 が、以下の配列：

G X X Y R P S（式中、X は T、S、K である）

K D S E R P S

K A S T L E S

Q D X K R P S（式中、X は D または T である）；または

Q D I E R P S

のうちの 1 つを含む、請求項 17 に記載の抗体。

20

【請求項 22】

前記軽鎖可変領域 C D R 3 が、以下の配列：

Q Q S Y S T P W T または S S G T Y V V

のうちの 1 つを含む、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 23】

前記抗体またはその断片が、

a．配列：S X₁ A M S（式中、X₁ は Y または F である）を含む重鎖可変領域 C D R 1；

30

b．配列：A I S G S G X₁ S T Y Y A D S V K G（式中、X₁ は S または G である）を含む重鎖可変領域 C D R 2；

c．配列：X₁ X₂ D X₃ W S X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ T A F D L（式中、X₁ は H、D または Q であり；X₂ は W、M、F、H、または R であり；X₃ は W、Y または F であり；X₄ は T、N、G、または P であり；X₅ は R、A、S、G、または Y であり；X₆ は S、P、N または T であり；X₇ は G、S、R、または K であり；X₈ は P、M、A または L である）を含む重鎖可変領域 C D R 3

を含む V_Hを、

任意選択的に、

a．配列 S G D A L P R Q Y A Y を含む軽鎖可変領域 C D R 1

40

b．配列 K D S X₁ R P S（式中、X₁ は E または F である）を含む軽鎖可変領域 C D R 2

c．配列 Q S A D S S G T Y X₁ V（式中、X₁ は V または A である）を含む軽鎖可変領域 C D R 3

を含む V_Lと組み合わせて含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 24】

前記抗体またはその断片が、

a．配列：S F A M S を含む重鎖可変領域 C D R 1；

b．配列：A I S G S G G S T Y Y A D S V K G を含む重鎖可変領域 C D R 2；

c．配列：Q F D Y W S T Y S G P T A F D L を含む重鎖可変領域 C D R 3；

50

を含む V_H を、

- a . 配列 S G D A L P R Q Y A Y を含む軽鎖可変領域 C D R 1
- b . 配列 K D S E R P S を含む軽鎖可変領域 C D R 2
- c . 配列 Q S A D S S G T Y V V を含む軽鎖可変領域 C D R 3

を含む V_L と組み合わせて含む、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 5】

重鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 6】

軽鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか
10 一項に記載の抗体。

【請求項 2 7】

重鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3、ならびに軽鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 8】

抗体番号 1 ~ 3 4 または抗体番号 2 8 7 ~ 3 1 5 のうちの 1 つからなる群から選択されるファージディスプレイ抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 2 9】

抗体番号 5、8、1 1、1 8、2 9、3 3、または抗体番号 2 8 7 ~ 3 1 5 のうちの 1
20 つである、請求項 2 5 に記載の抗体。

【請求項 3 0】

前記抗体またはその断片が、

- a . 配列： $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5$ を含む重鎖可変領域 C D R 1（ここで、

X_1 は S、N、D、T、または R であり；

X_2 は G、Y、または F であり；

X_3 は Y、H、S、G、D、または F であり；

X_4 は D、V、または I であり；

X_5 は N、H、C、R、S または不在である）

- b . 配列： $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15}$ 、 X_{16} を含む重鎖
可変領域 C D R 2（ここで、

X_1 は M、V、L、I、A、G、または T であり；

X_2 は G または I であり；

X_3 は Y、W、N、または C であり；

X_4 は Y、G、D、または W であり；

X_5 は S、D、または E であり；

X_6 は G または D であり；

X_7 は S、Y、N、または I であり；

X_8 は T、P、または K であり；

X_9 は N、A、G、D、または V であり；

X_{10} は Y または F であり；

X_{11} は N であり；

X_{12} は P、S、または E であり；

X_{13} は S、A、または N であり；

X_{14} は L または F であり；

X_{15} は K であり；

X_{16} は S、G、または N である）

- c . 配列： $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ を含む重鎖可変領域 C D R 3（ここで、

X_1 は G、S、A、または R であり；

X_2 は M、G、Y、S、L、R、または V であり；

X_3 は M、D、I、V、H、M、または S であり；

10

20

30

40

50

X_4 はV、Y、M、W、またはSであり；
 X_5 はL、Y、Sまたは不在であり；
 X_6 はI、D、V、T、G、S、Y、または不在であり；
 X_7 はP、G、D、S、またはAであり；かつ
 X_8 はN、Y、またはTである）

を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項31】

前記重鎖可変領域CDR1が、任意選択的にアミノ酸 X_6 および X_7 （各々、VおよびSである）を含む、請求項30に記載の抗体。

【請求項32】

前記重鎖可変領域CDR2が、任意選択的に $X_3 \sim X_4$ の間にアミノ酸 X_a および X_b の挿入を含み、ここで、 X_a はIまたはPでありかつ X_b はSである、請求項30に記載の抗体。

【請求項33】

前記重鎖可変領域CDR3が、任意選択的に、 $X_6 \sim X_7$ の間に1～6個のアミノ酸 $X_a \sim X_f$ の挿入を含み、ここで、

X_a はG、T、D、またはYであり；
 X_b はS、A、G、またはFであり；
 X_c はY、V、P、またはFであり；
 X_d はYまたはFであり；
 X_e はYであり；かつ
 X_f はE、F、またはGである、

請求項30に記載の抗体。

【請求項34】

前記重鎖可変領域CDR1が、配列SGYD；SGSD；またはSGFDを含む、請求項30に記載の抗体。

【請求項35】

前記重鎖可変領域CDR2が、配列：

MGYISYS；
 VIWGDGSTA；
 STAYNS；または
 STNYP

を含む、請求項30に記載の抗体。

【請求項36】

前記重鎖可変領域CDR3が、配列

GMMVLI；
 GVSLS；または
 GSYYYXを含み、ここで、XはE、G、またはFである、

請求項30に記載の抗体。

【請求項37】

前記抗体またはその断片が、

a．配列： $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$ を含む軽鎖可変領域CDR1（ここで、

X_1 はK、Q、またはRであり；
 X_2 はAまたはTであり；
 X_3 はS、R、またはNであり；
 X_4 はKまたはQであり；
 X_5 はS、D、R、N、L、またはIであり；
 X_6 はIまたはSであり；
 X_7 はT、G、V、またはNであり；

10

20

30

40

50

X_8 は N、S、H、または K であり；

X_9 は Y または W であり；

X_{10} は L、M、または I であり；

X_{11} は A、S、または Y であり；

b．配列： $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$ を含む軽鎖可変領域 C D R 2（ここで、

X_1 は S、D、E、または Y であり；

X_2 は G、A、または T であり；

X_3 は S または T であり；

X_4 は T、S、K、または A であり；

X_5 は L であり；

X_6 は Q、A、または V であり；

X_7 は S または D である）

10

c．配列： $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ を含む軽鎖可変領域 C D R 3（ここで、

X_1 は Q、L、または H であり

X_2 は Q または K であり；

X_3 は Y、A、W、または T であり；

X_4 は Y、H、S、または D であり；

X_5 は E、S、R、T、または N であり；

X_6 は K、N、T、L、または H であり；

X_7 は P であり；

X_8 は Y、W、L、N、P、または R であり；かつ P であり

X_9 は T である）

20

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 38】

前記軽鎖可変領域 C D R 1 が、配列

K A S K X I T（式中、X は S、L、または I である）；または

Q A S Q D I G N W L

を含む、請求項 37 に記載の抗体。

【請求項 39】

前記軽鎖可変領域 C D R 2 が、配列

S G S T L Q S；

D A T S L A D；または

D A T T L A D

を含む、請求項 37 に記載の抗体。

30

【請求項 40】

前記軽鎖可変領域 C D R 3 が、配列

Q Q Y Y E K P X T または Q Q Y Y E N P X T（式中、X は Y または L である）

を含む、請求項 37 に記載の抗体。

【請求項 41】

重鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、請求項 30～40 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 42】

軽鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、請求項 30～40 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 43】

重鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3、ならびに軽鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、請求項 30～40 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 44】

抗体番号 35～48、208、および 316～321 からなる群から選択されるハイブリドーマ由来抗体である、請求項 30～40 のいずれか一項に記載の抗体。

50

【請求項 45】

抗体番号 1 ~ 48、208、および 287 ~ 321 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 46】

前記その抗原結合断片が、一本鎖抗体、一本鎖可変断片 (s c F v)、F a b 断片、または F (a b ') 2 断片である、請求項 1 ~ 45 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 47】

請求項 1 ~ 45 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 48】

請求項 47 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 49】

請求項 48 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 50】

神経障害性疼痛を治療するための方法であって、それを必要とする患者に、請求項 1 ~ 46 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を有効量で投与するステップを含む、方法。

【請求項 51】

前記抗体またはその抗原結合断片が髄腔内送達により投与される、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

組換え P 2 X 4 ポリペプチドの大規模生成のための方法であって、ヒト P 2 X 4 タンパク質を S F 9 細胞内、27 で 72 時間発現させるステップと；

前記 P 2 X 4 タンパク質を、n - ドデシル - - D - マルトシド、n - ドデシルチオ - マルトシド、CHAPS、およびコレステリルヘミスクシネートを含む緩衝液に可溶化することによって抽出するステップと；

次に前記可溶化されたタンパク質を単離するステップと、を含む、方法。

【請求項 53】

前記 S F 9 細胞が、 2×10^6 個の細胞 / m l の細胞密度で 2 の感染多重度でバキュロウイルス粒子の感染を受けた、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記タンパク質が、親和性およびサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 55】

前記精製されたタンパク質が、50 mM トリス - HCl pH 8.0、600 mM NaCl、10% グリセロール、0.025% n - ドデシル - - D - マルトシド、0.0125% n - ドデシルチオ - マルトシド、0.0075% CHAPS、および 0.0015% コレステリルヘミスクシネートを含む緩衝液中で維持される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 56】

ミリグラム量の精製された P 2 X 4 ヒトポリペプチドを作成する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 57】

前記 P 2 X 4 タンパク質の大部分が三量体型である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 58】

請求項 52 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法によって生成される組換えヒト P 2 X 4 ポリペプチド。

【請求項 59】

前記ポリペプチドの少なくとも約 50% ~ 75% が三量体型である、請求項 58 に記載

10

20

30

40

50

の組換えヒト P 2 X 4 ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

慢性疼痛は、有益な目的を何も果たすものではなく、侵害受容神経回路網における病理学的変化から生じる。神経障害性疼痛は、外傷、感染、または病態によって引き起こされる神経損傷に後発する慢性疼痛の一形態である。神経障害性疼痛は、起因事象が治癒してから長期間持続する。ニューロンは、神経障害性疼痛に関与するが、この状態を媒介する唯一の細胞型である可能性は低い。神経障害性疼痛を確立し、維持する上でのグリア-ニューロン相互作用の役割を支持する証拠が増加しつつある。特に、ミクログリアは、神経障害性疼痛における主要なプレーヤーとして出現している。ミクログリア P 2 X 4 受容体は、神経障害性疼痛の発生および維持において重要であるように思われる。

10

【0002】

イオンチャネル P 2 X 4 は、プリン作動性のカチオン透過性チャネルのファミリーの 7 つのメンバーの一つである。各 P 2 X 4 サブユニットは、大規模な約 280 アミノ酸の細胞外ドメインによって分離された 2 つの膜貫通ドメインを有する。機能的チャネルは、中心孔を有するサブユニットの三量体配置から形成される。P 2 X 4 チャネルは、アデノシン 5' - 三リン酸 (ATP) リガンドのその細胞外ドメイン内に含まれる残基への結合によって活性化される。これら受容体の活性化は、カチオン、例えば Ca^{2+} および Na^{+} のカチオン選択性チャネルを介した細胞への侵入を可能にする一連の立体構造変化を引き起こす。P 2 X 4 の活性化および上方制御は、神経障害性疼痛の主要な駆動源であると考えられる。P 2 X 4 活性化の下流で、ミクログリアは脳由来神経栄養因子 (BDNF) を放出し、それは神経細胞のクロライドトランスポーター KCC2 の発現を低下させるように脊髄のラミナ I ニューロンで作用し、それにより、クロライドに対する電気化学的勾配を変更し、また主な阻害的神経伝達物質 GABA の一つを興奮性にする。したがって、脊髄における P 2 X 4 媒介性 BDNF 放出は、神経障害性疼痛の主要な駆動源であると考えられる。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

神経障害性疼痛は、現在利用可能な鎮痛薬に応答せず、また最も衰弱性の慢性疼痛状態のうちの 1 つであると考えられる。したがって、神経障害性疼痛、特に P 2 X 4 によって媒介される疼痛を治療するための改善された方法が緊急に必要とされている。

30

【課題を解決するための手段】

【0004】

下記のように、本発明は、P 2 X 4 ポリペプチドに特異的に結合しかつ P 2 X 4 チャネル活性を調節する抗体、組換え P 2 X 4 ポリペプチド、およびかかるポリペプチドを作成するための方法、ならびに抗 P 2 X 4 抗体を作成するための組成物および方法、ならびに神経障害性疼痛および他の徴候の治療のために P 2 X 4 抗体を用いる方法を提供する。

40

【0005】

第 1 の態様では、本発明は、ヒト P 2 X 4 ポリペプチドに特異的に結合しかつチャネル活性を調節する抗体またはその抗原結合断片を提供する。一実施形態では、抗体は P 2 X 4 増強物質である。別の実施形態では、抗体は P 2 X 4 拮抗剤である。別の実施形態では、抗体は P 2 X 4 調節因子である。別の実施形態では、抗体は、P 2 X 4 生物学的活性を少なくとも約 10%、25%、50%、75%、85%、90% または 95% 低下させる P 2 X 4 拮抗剤である。別の実施形態では、抗体は、ヒト P 2 X 4 アミノ酸 110 ~ 166 を有するエピトープに結合する。別の実施形態では、抗体は、アミノ酸 118、122 ~ 139、145、159、180、183、184、231、および 244 のうちのいずれか 1 つ以上から選択される 1 つ以上のヒト P 2 X 4 アミノ酸を有するエピトープに結合する。別の実施形態では、P 2 X 4 の位置 131 でのアミノ酸置換により、抗体のヒト

50

P 2 X 4 ポリペプチドへの結合が低下するかまたは失われる。別の実施形態では、ヒト P 2 X 4 の位置 1 3 1 でのセリンがアスパラギンによって置換される。

【 0 0 0 6 】

先の態様の一実施形態では、抗体またはその断片は、

a . 配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5$ を含む重鎖可変領域 C D R 1 (ここで、 X_1 は G、N、S、D、または R であり； X_2 は Y、A、H、F、または S であり； X_3 は A、W、Y、S、G、F、W、E、D、または P であり； X_4 は M、I、W、L、I、F、または V であり； X_5 は S、G、T、H、または N である)；かつ / または

b . 配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15}$ 、 X_{16} を含む重鎖可変領域 C D R 2 (ここで、 X_1 は A、R、I、T、E、S、A、V、W、N、G、E、R、または Y であり； X_2 は I または M であり； X_3 は S、K、Y、D、N、W、または I であり； X_4 は S、D、G、H、N、R、Y、または V であり； X_5 は G、D、S、F、N、R、F、D、または T であり； X_6 は G、S、N、または T であり； X_7 は S、T、D、Y、N、A、E、M、F、または D であり； X_8 は T、I、K、または A であり； X_9 は Y、D、R、N、G、Q、E、H、または K であり； X_{10} は Y、Q、S、または V であり； X_{11} は A、S、N、または V であり； X_{12} は D、A、P、R、または Q であり； X_{13} は S、P、K、または N であり； X_{14} は V、F、L、または A であり； X_{15} は K、Q、または E であり； X_{16} は G、S、A、または D である)；かつ / または

c . 配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ を含む重鎖可変領域 C D R 3 (ここで、 X_1 は E、N、D、R、K、G、S、A、Y、V、P、または H であり； X_2 は E、L、R、Q、T、G、F、P、Y、K、A、S、V、または F であり； X_3 は R、A、T、G、V、S、M、W、Y、D、H、N、E、L、または I であり； X_4 は G、L、R、D、T、G、Y、S、E、F、Q、C、I、M、V、N、K、または P であり； X_5 は S、G、Y、D、W、T、S、N、I、D、V、E、または C であり； X_6 は Y、A、S、W、T、L、G、E、F、K、V、I、または D であり； X_7 は D、E、または G であり；かつ、 X_8 は Y、S、V、L、M、Q、I、S、I、H、F、または D である)

を有する。一実施形態では、重鎖可変領域 C D R 2 は、任意選択的に、アミノ酸 $X_3 \sim X_4$ の間に 1 ~ 3 個のアミノ酸 $X_a X_b X_c$ の挿入を含み、ここで、 X_a は G、S、P、W、Y、E、A、R、または N であり；かつ $X_b X_c$ は各々 K T である。別の実施形態では、重鎖可変領域 C D R 3 は、任意選択的に、1 ~ 14 個のアミノ酸 $X_a \sim X_n$ の挿入を含み、ここで、 X_a は F、R、S、Y、L、D、G、V、I、T、または A であり； X_b は G、R、Y、F、T、D、S、G、V、M、D、または R であり； X_c は F、W、A、G、T、I、S、F、Y、C、L、V、R、または N であり； X_d は S、F、M、G、Y、L、S、A、D、L、R、V、C、または S であり、 X_e は G、Y、S、T、P、F、Y、R、A、E、G、Q、N、または L であり； X_f は Y、N、G、T、R、F、A、M、W、P、または V であり； X_g は Y、M、S、V、F、A、P、S、D、R、H、P、E、または R であり、 X_h は Y、G、M、F、G、P、V、F、H、T、または G、 X_i は T、I、G、R、または F であり； X_j は Y、G、H、または E であり； X_k は Y、G、F、または N であり； X_l は F、または N であり； X_m は Y であり；かつ、 X_n は F である。一実施形態では、

重鎖可変領域 C D R 1 は、配列 S Y X_1 M X_2 を含み、ここで、 X_1 は A、W、Y、S、G、F、E、D、または P であり、かつ X_2 は S、G、T、H、または N である。別の実施形態では、重鎖可変領域 C D R 1 は、配列 X Y A M S (式中、X は S、D、G、N または R である)；S X A M S (式中、X は Y、A、H、F、または S である)；S Y X M S (式中、X は A、W、Y、S、G、F、E、D、P である)；S Y A X S (式中、X は M、I、W、L、F、または V である)；S Y A M X (式中、X は S、G、T、H、または N である)を含む。別の実施形態では、重鎖可変領域 C D R 1 は、アミノ酸 S Y A M S を含む。別の実施形態では、重鎖可変領域 C D R 2 は、配列 A I S G S G G S T Y Y A D S V K G；または A I S G S G G S T Y Y A D S V E G を含む。さらに別の実施形態では、重鎖可変領域 C D R 3 は、配列 D W Y F D L または N W Y L D L を含む。さらに別の実施形態では、抗体またはその断片は、a . 配列

10

20

30

40

50

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ を含む軽鎖可変領域CDR1(ここで、 X_1 はT、G、R、S、またはQであり； X_2 はG、A、またはLであり； X_3 はS、T、D、またはHであり； X_4 はS、N、K、A、Q、T、またはVであり； X_5 はG、I、L、S、またはDであり； X_6 はA、G、R、P、I、D、S、E、Tであり； X_7 はG、N、M、D、K、S、R、Y、またはTであり； X_8 はY、K、F、Q、S、N、Y、D、H、またはRであり； X_9 はD、N、Y、W、F、M、G、またはSであり； X_{10} はV、A、L、I、G、またはPであり； X_{11} はH、T、S、Y、A、Q、Y、N、またはFである)、
 b. 配列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ を含む軽鎖可変領域CDR2(ここで、 X_1 はG、Y、Q、K、N、D、R、A、またはEであり； X_2 はN、D、K、A、V、G、またはT、
 X_3 はN、S、T、I、K、Y、またはDであり； X_4 はN、D、Y、K、E、T、N、S、
 またはQ、 X_5 はR、またはLであり； X_6 はP、E、A、S、またはQであり； X_7 はS、P、またはTである)；

c. 配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ を含む軽鎖可変領域CDR3(ここで、 X_1 はQ、N、A、G、D、S、またはLであり； X_2 はS、V、A、Q、T、L、またはHであり； X_3 はY、W、R、A、S、Q、T、またはGであり； X_4 はD、Y、I、N、M、またはH、 X_5 はT、M、S、N、D、R、G、またはKであり、 X_6 はN、T、S、G、F、LまたはDであり； X_7 はL、T、G、P、A、I、またはNであり； X_8 はK、W、V、I、P、G、L、R、またはYであり； X_9 はV、L、またはTである)

を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域CDR1は、任意選択的に、 $X_4 \sim X_5$ の間に1～3個のアミノ酸 $X_a \sim X_c$ の挿入を含み、ここで、 X_a はSまたはGであり； X_b はN、DまたはSであり；かつ X_c はIまたはVである。別の実施形態では、軽鎖可変領域CDR3は、任意選択的に、 $X_7 \sim X_8$ の間に1～3個のアミノ酸 $X_a \sim X_c$ の挿入を含み、ここで、 X_a はD、N、A、T、S、IまたはHであり； X_b はH、Y、G、A、R、L、S、またはPであり；かつ X_c はSである。さらに別の実施形態では、軽鎖可変領域CDR1は、以下の配列：SGDKL；SGSSSNIG；SGDAL；RASQGIISSWLA；およびRASQGISRWLAのうちの1つを含む。別の実施形態では、軽鎖可変領域CDR2は、以下の配列：GXXYRPS(式中、XはT、S、Kである)またはKDSERPS；KASTLES；QDXKRPS(式中、XはDまたはTである)；およびQDIERPSのうちの1つを含む。別の実施形態では、軽鎖可変領域CDR3は、以下の配列：QQSYSTPWTまたはSSGTYYVVのうちの1つを含む。

【0007】

上記態様の様々な実施形態では、抗体は、重鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。上記態様の他の実施形態では、抗体は、軽鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。上記態様の他の実施形態では、抗体は、重鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびに軽鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。上記態様の他の実施形態では、抗体は、抗体番号1～34のいずれか1つ以上から選択されるファージディスプレイ由来抗体である。特定の実施形態では、抗体は、抗体番号5、8、11、18、29、または33である。

【0008】

上記態様の別の実施形態では、抗体またはその断片は、

a. 配列： $X_1X_2X_3X_4X_5$ を含む重鎖可変領域CDR1(ここで、 X_1 はS、N、D、T、A、またはRであり； X_2 はG、Y、またはFであり； X_3 はY、H、S、G、D、またはFであり； X_4 はD、V、またはIであり； X_5 はN、H、C、R、Sまたは不在である)；

b. 配列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ 、 X_{16} を含む重鎖可変領域CDR2(ここで、 X_1 はM、V、L、I、A、G、またはTであり； X_2 はGまたはIであり； X_3 はY、W、N、またはCであり； X_4 はY、G、D、またはWであり； X_5 はS、D、またはEであり； X_6 はGまたはDであり； X_7 はS、Y、N、またはIであり； X_8 はT、P、またはKであり； X_9 はN、A、G、D、またはVであり； X_{10} はYまたはFであり； X_{11} はNであり； X_{12} はP、S、またはEであり； X_{13} はS、A、また

はNであり； X_{14} はLまたはFであり； X_{15} はKであり； X_{16} はS、G、またはNである）；

c．配列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ を含む重鎖可変領域CDR3（ここで、 X_1 はG、S、A、またはRであり； X_2 はM、G、Y、S、L、R、またはVであり； X_3 はM、D、I、V、H、M、またはSであり； X_4 はV、Y、M、W、またはSであり； X_5 はL、Y、Sまたは不在であり； X_6 はI、D、V、T、G、S、または不在であり； X_7 はP、G、D、S、またはAであり；かつ X_8 はN、Y、またはTである）

を含む。一実施形態では、重鎖可変領域CDR1は、任意選択的にアミノ酸 X_6 および X_7 （各々、VおよびSである）を含む。別の実施形態では、重鎖可変領域CDR2は、任意選択的に、 $X_3 \sim X_4$ の間にアミノ酸 X_a および X_b の挿入を含み、ここで、 X_a はIまたはPでありかつ X_b はSである。別の実施形態では、重鎖可変領域CDR3は、任意選択的に、 $X_6 \sim X_7$ の間に1～6個のアミノ酸 $X_a \sim X_f$ の挿入を含み、ここで、 X_a はG、T、D、またはYであり； X_b はS、A、G、またはFであり； X_c はY、V、P、またはFであり； X_d はYまたはFであり； X_e はYであり；かつ X_f はE、F、またはGである。別の実施形態では、重鎖可変領域CDR1は、配列SGYD；SGSD；またはSGFDを含む。別の実施形態では、重鎖可変領域CDR2は、配列：MGYISYS；VIWGDGSTA；STAYNS；またはSTNYNPを含む。一実施形態では、重鎖可変領域CDR3は、配列GMMVLI；GVSSLS；またはGSYYYXを含み、ここで、XはE、G、またはFである。

【0009】

上記態様の別の実施形態では、抗体またはその断片は、

a．配列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ を含む軽鎖可変領域CDR1（ここで、 X_1 はK、Q、またはRであり； X_2 はAまたはTであり； X_3 はS、R、またはNであり； X_4 はKまたはQであり； X_5 はS、D、R、N、L、またはIであり； X_6 はIまたはSであり； X_7 はT、G、V、またはNであり； X_8 はN、S、H、またはKであり； X_9 はYまたはWであり； X_{10} はL、M、またはIであり； X_{11} はA、S、またはYである）；

b．配列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ を含む軽鎖可変領域CDR2（ここで、 X_1 はS、D、E、またはYであり； X_2 はG、A、またはTであり； X_3 はSまたはTであり； X_4 はT、S、K、またはAであり； X_5 はLであり； X_6 はQ、A、またはVであり； X_7 はSまたはDである）；

c．配列： $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ を含む軽鎖可変領域CDR3（ここで、 X_1 はQ、L、またはHであり； X_2 はQまたはKであり； X_3 はY、A、W、またはTであり； X_4 はY、H、S、またはDであり； X_5 はE、S、R、T、またはNであり； X_6 はK、N、T、L、またはHであり； X_7 はPであり； X_8 はY、W、L、N、P、またはRであり；かつ、 X_9 はTである）

を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域CDR1は、配列KASKXIT（式中、XはX、L、またはIである）；またはQASQDIGNWLを含む。別の実施形態では、軽鎖可変領域CDR2は、配列SGSTLQS；DATSLAD；またはDATTLADを含む。別の実施形態では、軽鎖可変領域CDR3は、配列QQYYEKPXTまたはQQYYENPXT（式中、XはYまたはLである）を含む。

【0010】

別の一連の実施形態では、抗体またはその断片は、

a．配列： SX_1AMS （式中、 X_1 はYまたはFである）を含む重鎖可変領域CDR1；

b．配列： $AISGSGX_1STYYADSVK G$ （式中、 X_1 はSまたはGである）を含む重鎖可変領域CDR2；

c．配列： $X_1X_2DX_3WSX_4X_5X_6X_7X_8TAFDL$ （式中、 X_1 はH、DまたはQであり； X_2 はW、M、F、H、またはRであり； X_3 はW、YまたはFであり； X_4 はT、N、G、またはPであり； X_5 はR、A、S、G、またはYであり； X_6 はS、P、Nま

10

20

30

40

50

たはTであり；かつ、X₇はG、S、R、またはK；X₈はP、M、AまたはLである）を含む重鎖可変領域CDR3

を含むV_Hを、

任意選択的に、

a．配列SGDALPRQYAYを含む軽鎖可変領域CDR1

b．配列KDSXRPS（式中、XはEまたはFである）を含む軽鎖可変領域CDR2

c．配列QSADSSGTXYXV（式中、XはVまたはAである）を含む軽鎖可変領域CDR3

を含むV_Lと組み合わせて含む。

【0011】

上記態様の様々な実施形態では、抗体は、重鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。上記態様の他の実施形態では、抗体は、軽鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。上記態様のさらに他の実施形態では、抗体は、重鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびに軽鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。特定の実施形態では、抗体は、抗体番号35～48のいずれか1つ以上から選択されるハイブリドーマ由来抗体である。

【0012】

上記態様の様々な実施形態では、その抗原結合断片は、一本鎖抗体、一本鎖可変断片（scFv）、Fab断片、またはF（ab'）₂断片である。

【0013】

別の態様では、本発明は、上記態様のいずれかの抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

別の態様では、本発明は、上記態様のポリヌクレオチドを有するベクターを提供する。

【0015】

さらに別の態様では、本発明は、上記態様のベクターを有する宿主細胞を提供する。

【0016】

別の態様では、本発明は、神経障害性疼痛を治療するための方法であって、それを必要とする患者に、上記態様のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片を投与するステップを含む、方法を提供する。一実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、髄腔内送達により投与される。

【0017】

別の態様では、本発明は、組換えP2X4ポリペプチドの大規模生成のための方法であって、ヒトP2X4タンパク質をSF9細胞内、27℃で72時間発現させるステップと；P2X4タンパク質を、n-ドデシル-D-マルトシド、n-ドデシルチオ-マルトシド、CHAPS、およびコレステリルヘミスクシネートを含有する緩衝液に可溶化することによって抽出するステップと；次に可溶化されたタンパク質を単離するステップと、を含む、方法を提供する。一実施形態では、SF9細胞は、2×10⁶個の細胞/mlの細胞密度で2の感染多重度でバキュロウイルス粒子の感染を受けた。別の実施形態では、タンパク質は、親和性およびサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製される。別の実施形態では、精製されたタンパク質は、50mMトリス-HCl pH8.0、600mM NaCl、10%グリセロール、0.025% n-ドデシル-D-マルトシド、0.0125% n-ドデシルチオ-マルトシド、0.0075% CHAPS、および0.0015%コレステリルヘミスクシネートを含有する緩衝液中で維持される。

【0018】

別の実施形態では、本方法では、ミリグラム量の精製されたP2X4ヒトポリペプチドが作成される。別の実施形態では、P2X4タンパク質の大部分は三量体型である。

【0019】

別の態様では、本発明は、任意の先の態様の方法によって生成される組換えヒトP2X4ポリペプチドを提供する。一実施形態では、ポリペプチドの少なくとも約65%～75

10

20

30

40

50

%は三量体型である。

【0020】

本発明の他の特徴および利点は、詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0021】

定義

特に定義されなければ、本明細書で用いられるすべての科学技術用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されている意味を有する。以下の参考文献は、本発明で用いられる用語の多くの一般的定義を当業者に提供する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed., 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。以下の用語は、本明細書で用いられるとき、特に定義されなければ、以下のそれらに帰属する意味を有する。

10

【0022】

「P2Xプリン受容体4 (P2RX4またはP2X4) ポリペプチド」は、NCBI受託番号Q99571で提供されるアミノ酸配列に対して少なくとも約85%以上のアミノ酸同一性を有し、かつP2X4生物学的活性を有するプリン作動性受容体タンパク質またはその断片を意味する。P2X4生物学的活性は、ATP結合および/またはP2X4抗体結合に応答したCa²⁺/Na⁺伝導活性を含む。代表的なヒトP2X4配列は、以下に提供される。

20

【化1】

```
magccaalaa flfeydtpri vlirsrkvgl mnravqlil ayvigwvfvw ekgyqetdsv 61
vssvttkvkg vavtntsklg friwdvadyv ipaqeenslf vmtnviltmn qtqglcpeip 121
dattvcksdasctagsagth sngvstgrcv afngsvktce vaawcpvedd thvpqpaflk 181
aaenftllvk nniwypkfnf skrnlpnit ttylksciyd aktdpfcipif rlgkivenag 241
hsfqdmaveg gimgiqvnwd cnldraaslc lprysfrrld trdvehnvsp gynfrfakyy 301
rdlagneqrt likaygirfd iivfgkagkf diiptminig sglallgmat vlcdiivlyc 361
mkkrlyyrek kykyvedyeq glaseldq
```

30

【0023】

本発明の実施形態では、ヒトP2X4ポリペプチドは、NCBI受託番号Q99571に対して少なくとも約65%、70%、80%、85%、90%、95%、またはさらに100%の同一性を有する。他の実施形態では、本発明は、例えば、E95Q、V105M、G114D、A122V、S131N、A151P、G154R、L303P、およびN306Kを含む、Q99571参照配列に対する1つ以上のアミノ酸置換を含むP2X4ポリペプチドを提供する。

【0024】

代表的なマウスP2Xプリン受容体4は、以下の配列：

40

【化 2】

```

magccsvlgs flfeydtpri vlirsrkvgl mnrvvqllil ayvigwvfw ekgyqetdsv 61
vssvttkakg vavtntsqlg friwdvadyv vpaqeenslf imtnmivtvn qtqgtcpeip 121
dktsicdsda nctlgssdth ssgigtgrcv pfnasvktce vaawcpvend agvptpafk 181
aaenftllvk nniwypkfnf skrnlpnit tsylksciyn artdpfcpiif rlgqivadag 241
hsfqemaveg gimgiqikwd cnldraashc lprysfrrld trdlehnvsp gynfrfakyy 301
rdlagneqrt ltkeygirfd iivfgkagkf diiptminvg sglallgvat vlcdvivlyc 361
mkkryyyrdk kykyvedyeq glsgemmq

```

10

を有する N C B I 受託番号 Q 9 J J X 6 で提供される。

【 0 0 2 5】

代表的なラット P 2 X プリン受容体 4 配列は、以下の配列：

【化 3】

```

magccsvlgs flfeydtpri vlirsrkvgl mnrvvqllil ayvigwvfw ekgyqetdsv 61
vssvttkakg vavtntsqlg friwdvadyv ipaqeenslf imtnmivtvn qtqgtcpeip 121
dktsicdsda dctpgsdth ssgvatgrcv pfnasvktce vaawcpvend vgvptpafk 181
aaenftllvk nniwypkfnf skrnlpnit tsylksciyn aqtdpfcpiif rlgqivadag 241
hsfqemaveg gimgiqikwd cnldraashc lprysfrrld trdlehnvsp gynfrfakyy 301
rdlagneqrt ltkeygirfd iivfgkagkf diiptminvg sglallgvat vlcdvivlyc 361
mkkryyyrdk kykyvedyeq glsgemmq

```

20

を有する N C B I 受託番号 P 5 1 5 7 7 で提供される。

【 0 0 2 6】

代表的なマウス P 2 X プリン受容体 4 配列は、以下の配列：

【化 4】

```

magccaalaa flfeydtpri vlirsrkvgl mnrvvqllil ayvigwvfw ekgyqetdsv 61
vssvttkvkg vavtntsklg friwdvadyv ipaqeenslf imtnmiltmn qtqdlcpeip 121
dvttvcksd nctagsagth sngvstgrcv pfnasvktce vaawcpvedd thvpqpafk 181
aaenftllvk nniwypkfnf skrnlpnit tsylksciyn aqtdpfcpiif rlgqivadag 241
hsfqemaveg gimgiqikwd cnldraashc lprysfrrld trdlehnvsp gynfrfakyy 301
rdpagkeqrt likaygirfd iivfgkagkf diiptminvg sglallgmat vlcdvivlyc 361
mkkryyyrdk kykyvedyeq glsgemmq

```

30

を有する。

【 0 0 2 7】

「P 2 X 4 核酸分子」は、P 2 X 4 ポリペプチドまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを意味する。代表的なヒト P 2 X 4 ポリヌクレオチド配列は、N C B I 受託番号 NM_002560 で提供され、その配列は以下の通りである。

【化 5】

1 aagtgtctggg atgacaggtg tgagccaccg cccccggccc ctgccccgcc ttttgaagga
 61 gccttttcgtc ctcaagggcg aggccactcc cccccgcga gttccatgcc ccctagaggg
 121 tcacgttcc cgacggggag gtggcgccct cccccgggc cggggccccg accgcccgtg
 181 ctgcctcctt cggggccctc ctccgcgatg acggcgccgc cagcaggcca ggcgactgg
 241 gcgggggtcc gagcggggac tgggaccag accgactagg ggactgggag cggggggcgc
 301 ggccatggcg ggctgtgctg ccgcgtggc ggcttctctg ttcgagtacg acacgccgcg
 361 catcgtgctc atccgcagcc gcaaagtggg gctcatgaac cgcgccgtgc aactgctcat
 421 cctggcctac gtcacgggt ggggtgttgt gtgggaaaag ggctaccagg aaactgactc 10
 481 cgtggtcagc tccgttacga ccaaggtcaa gggcgtggct gtgaccaaca cttctaaact
 541 tggattccgg atctgggatg tggcggatta tgtgatacca gctcaggagg aaaactccct
 601 ctctgtcatg accaacgtga tcctcaccat gaaccagaca cagggcctgt gcccgcagat
 661 tccagatgcg accactgtgt gtaaatacaga tgccagctgt actgccggct ctgccggcac
 721 ccacagcaac ggagtctcaa caggcaggtg cgtagcttct aacgggtctg tcaagacgtg
 781 tgaggtggcg gcctgggtgcc cgggtggagga tgacacacac gtgccacaac ctgctttttt
 841 aaaggctgca gaaaacttca ctcttttggg taagaacaac atctgggtatc ccaaatttaa
 901 tttcagcaag aggaatatcc tccccaacat caccactact tacctcaagt cgtgcattta
 961 tgatgctaaa acagatccct tctgccccat attccgtctt ggcaaaatag tggagaacgc 20
 1021 aggacacagt ttccaggaca tggccgtgga gggaggcatc atgggcatcc aggtcaactg
 1081 ggactgcaac ctggacagag ccgcctccct ctgcttgccc aggtactcct tccgcgcct
 1141 cgatacacgg gacgttgagc acaacgtatc tctgggtac aatttcaggt ttgccaagta
 1201 ctacagagac ctggctggca acgagcagcg cacgctcatc aaggcctatg gcatccgctt
 1261 cgacatcatt gtgtttggga aggcaggga atttgacatc atccccacta tgatcaacat
 1321 cggtctggtc ctggcactgc taggcattggc gaccgtgctg tgtgacatca tagtctctta
 1381 ctgcatgaag aaaagactct actatcgga gaagaaatat aaatatgtgg aagattacga
 1441 gcagggtctt gctagtgagc tggaccagtg aggcctaccc cacacctggg ctctccacag
 1501 ccccatcaaa gaacagagag gaggaggagg gagaaatggc caccacatca cccagagaa 30
 1561 atttctggaa tctgattgag tctccactcc acaagcactc aggggtcccc agcagctcct
 1621 gtgtgttgtg tgcaggatct gtttgccac tcggcccagg aggtcagcag tctgttcttg
 1681 gctgggtcaa ctctgctttt cccgcaacct ggggttgtcg ggggagcgt ggcccgcgc
 1741 agtggcactg ctgtggcttt cagggtgga gctggctttg ctcagaagcc tctgtctcc
 1801 agctctctcc aggacaggcc cagtcctctg aggcacggcg gctctgttca agcactttat
 1861 gcggcagggg aggcgcctg gctgcagtca ctagacttgt agcaggcctg ggctgcaggc
 1921 tccccccga ccattccctg cagccatgcg gcagagctgg catttctcct cagagaagcg
 1981 ctgtgctaag gtgatcgagg accagacatt aaagcgtgat tttcttaaaa aaaaaaaaaa
 2041 aaa 40

【0028】

「P2X4 生物学的活性」は、細胞質カルシウムレベルにおけるイオンチャネル伝導活性またはイオンチャネル媒介性変化を意味する。

【0029】

「寛解する」は、疾患の発生または進行を低下させる、抑制する、減弱させる、軽減する、停止させる、または安定化させることを意味する。

【0030】

用語「抗体」は、本開示で用いられるとき、免疫グロブリンまたはその断片または誘導体を指し、抗原結合部位を含む任意のポリペプチドを、それが生成されるのがインビトロであるかまたはインビボであるかに無関係に包含する。この用語は、限定はされないが、

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、多特異性抗体、非特異性抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、ハイブリッド抗体、突然変異抗体、および移植抗体を含む。本開示を意図して、「インタクトな抗体」のように用語「インタクト」によって特に修飾されない限り、用語「抗体」はまた、抗原結合機能、すなわち P 2 X 4 ポリペプチドに特異的に結合する能力を保持する、F a b、F (a b ') 2、F v、s c F v、F d、d A b、および他の抗体断片などの抗体断片を含む。典型的には、かかる断片は、抗原結合ドメインを含むことになる。

【 0 0 3 1 】

用語「抗原結合ドメイン」、「抗原結合断片」および「結合断片」は、抗体と抗原との間の特異的結合に関与する、アミノ酸を含む抗体分子の一部を指す。抗原が大型である場合、抗原結合ドメインは、専ら抗原の一部に結合し得る。抗原結合ドメインとの特異的相互作用に関与する抗原分子の一部は、「エピトープ」または「抗原決定基」と称される。特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域 (V_L) および抗体重鎖可変領域 (V_H) を含むが、必ずしも両方を含む必要はない。例えば、いわゆる F d 抗体断片は V_H ドメインのみからなるが、インタクトな抗体の一部の抗原結合機能を依然として保持している。

【 0 0 3 2 】

抗体の結合断片は、組換え D N A 技術により、またはインタクトな抗体の酵素的または化学的切断により産生される。結合断片は、F a b、F a b '、F (a b ') 2、F v、および一本鎖抗体を含む。「二重特異性」または「二機能性」抗体以外の抗体は、その同一な結合部位を各々有すると理解されている。酵素、パパインを用いた抗体の消化により、「F a b」断片および「F c」断片 (抗原結合活性を全く有しないが結晶化させる能力を有する) としても知られる 2 つの同一の抗原結合断片がもたらされる。酵素、ペプシンを用いた抗体の消化により、抗体分子の 2 つのアームが連結したままであり、2 つの抗原結合部位を含む F (a b ') 2 断片がもたらされる。F (a b ') 2 断片は、抗原に架橋する能力を有する。「F v」は、本明細書で用いられるとき、抗原認識部位および抗原結合部位の双方を保持する抗体の最小断片を指す。「F a b」は、本明細書で用いられるとき、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の C H I ドメインを含む抗体断片を指す。

【 0 0 3 3 】

用語「m A b」は、モノクローナル抗体を指す。本発明の抗体は、限定はされないが、全天然抗体 (w h o l e n a t i v e a n t i b o d y)、二重特異性抗体；キメラ抗体；F a b、F a b '、一本鎖 V 領域断片 (s c F v)、融合ポリペプチド、および非定型抗体 (u n c o n v e n t i o n a l a n t i b o d y) を含む。

【 0 0 3 4 】

本開示では、「含む (c o m p r i s e s)」、「含む (c o m p r i s i n g)」、「含む (c o n t a i n i n g)」および「有する (h a v i n g)」などは、米国特許法においてそれらに帰属される意味を有し、かつ「含む (i n c l u d e s)」、「含む (i n c l u d i n g)」などを意味することができ；同様に「本質的に ~ からなる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f)」または「本質的になる (c o n s i s t s e s s e n t i a l l y)」は、米国特許法において帰属される意味を有し、またこの用語は、限定がなく、列挙されるその基本的または新規な特性が列挙されるそれを超える存在によって変化しない限り、列挙されるそれを超える存在を許容するが、先行技術の実施形態を除外する。

【 0 0 3 5 】

「検出する」は、検出されるべき分析物の存在、不在または量を同定することを指す。一実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、P 2 X 4 ポリペプチドの存在またはレベルを検出するために用いられる。

【 0 0 3 6 】

「検出可能な標識」は、目的の分子に連結されるとき、目的の分子を分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、または化学的手段を介して検出可能にする

10

20

30

40

50

組成物を意味する。例えば、有用な標識として、放射性同位元素、磁気ビーズ、金属ビーズ、コロイド状粒子、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、E L I S A で一般に用いられるもの）、ビオチン、ジゴキシゲニン、またはハプテンが挙げられる。

【0037】

「疾患」は、細胞、組織、または器官の正常な機能を損傷させるかまたはそれに干渉する任意の状態または障害を意味する。疾患の例として、神経障害性疼痛、特に P 2 X 4 チャンネル活性または P 2 X 4 に応答性がある経路の活性に関連する疼痛が挙げられる。

【0038】

用語「有効量」は、患者における症状の寛解を生じさせるかまたは所望される生物学的予後を得るため、P 2 X 4 ポリペプチドの活性を低下させるのに十分な薬剤の用量または量を指す。所望される生物学的予後として、例えば、慢性疼痛またはその症状の寛解、P 2 X 4 生物学的活性の調節、または P 2 X 4 活性に応答性がある経路の調節が挙げられる。

10

【0039】

用語「単離された」は、天然環境下で他のエレメントを実質的に含まない分子を指す。例えば、単離されたタンパク質は、それが由来する細胞または組織供給源に由来する細胞物質または他のタンパク質を実質的に含まない。用語「単離された」はまた、単離されたタンパク質が医薬組成物として投与される上で十分に純粋であるか、あるいは少なくとも 70 ~ 80 % (w / w) 純粋であり、より好ましくは少なくとも 80 ~ 90 % (w / w) 純粋であり、さらにより好ましくは 90 ~ 95 % 純粋であり；また最も好ましくは少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % (w / w) 純粋である場合の製剤を指す。

20

【0040】

「断片」は、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を意味する。この部分は、好ましくは、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % を有する。特定の実施形態では、P 2 X 4 ポリペプチドの断片は、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、または 300 のアミノ酸を有し得る。

【0041】

「参照」は、比較の基準を意味する。

30

【0042】

「参照配列」は、配列比較の基準として用いられる規定された配列である。参照配列は、特定の配列のサブセットまたは全体、例えば、完全長 c D N A または遺伝子配列のセグメント、または完全な c D N A または遺伝子配列で有り得る。ポリペプチドにおいては、参照ポリペプチド配列の長さは、一般に、少なくとも約 16 アミノ酸、好ましくは少なくとも約 20 アミノ酸、より好ましくは少なくとも約 25 アミノ酸、およびさらにより好ましくは約 35 アミノ酸、約 50 アミノ酸、または約 100 アミノ酸となる。核酸においては、参照核酸配列の長さは、一般に、少なくとも約 50 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 60 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約 75 ヌクレオチド、およびさらにより好ましくは約 100 ヌクレオチドまたは約 300 ヌクレオチド、あるいはそれらに近いまたはそれらの間の任意の整数となる。

40

【0043】

用語「レパートリー」は、発現される免疫グロブリンをコードする配列に全体的または部分的に由来するヌクレオチドの遺伝的に多種多様な収集物を指す。この配列は、例えば、H 鎖における V、D、および J セグメント、ならびに例えば、L 鎖における V および J セグメントのインビボでの再構成によって作成される。あるいは、配列は、インビトロ刺激により細胞株から作成してもよく、そのインビトロ刺激に応じて再構成が生じる。あるいは、配列の一部または全部は、例えば再構成されていない V セグメントを D および J セグメントと組み合わせることにより、ヌクレオチド合成、ランダム突然変異誘発、および他の方法（例えば、米国特許第 5,565,332 号明細書に開示される）により、得て

50

もよい。

【0044】

「特異的に結合する」は、試料、例えば生物学的試料の中のある分子（例えばポリペプチド）に対して認識しかつ結合するが、他の分子に対して実質的に認識しかつ結合することのない薬剤（例えば抗体）を意味する。例えば、特異的に結合する2つの分子は、生理的条件下で比較的安定な複合体を形成する。特異的結合は、通常、中～高程度の能力とともに低親和性を有する非特異的結合と区別されて、高親和性および低～中程度の能力によって特徴づけられる。典型的には、結合は、親和性定数 K_A が $10^7 M^{-1}$ より高いか、またはより好ましくは $10^8 M^{-1}$ より高い場合、特異的であると考えられる。

【0045】

P2X4 と抗体との間の結合の強度は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫測定（RIA）、または表面プラズモン共鳴に基づく技術（例えばBiacore）（これらのすべてが当該技術分野で周知の技術である）を用いて測定することができる。必要であれば、非特異的結合は、結合条件を変化させることにより、特異的結合に実質的に影響することなく低下させることができる。抗体の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合を可能にする時間、遮断薬（例えば、血清アルブミン、ミルクカゼイン）の濃度などの適切な結合条件は、通常の技術を用いて当業者により最適化され得る。

【0046】

詳述されないかまたは文脈から明白でない限り、本明細書で用いられるとき、用語「約」は、当該技術分野で通常の許容範囲内、例えば平均の2標準偏差内であると理解される。約は、記述される値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%内であると理解され得る。文脈から特に明白でない限り、本明細書に提供されるすべての数値は、約という用語によって修飾される。

【0047】

本明細書中の変数の任意の定義における化学基のリストの記述は、列挙されるグループの任意の単一のグループまたは組み合わせとしての変数の定義を含む。本明細書中の変数または態様における実施形態の記述は、任意の単一の実施形態あるいは任意の他の実施形態またはその一部との組み合わせとしての実施形態を含む。

【0048】

本明細書に提供される任意の組成物または方法は、本明細書に提供される他の組成物および方法のいずれか1つ以上と組み合わせることができる。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1A～Dは、抗体番号1、11、29、および33のヒトP2X4変異体への結合の分析を示す。

【図2-1】ファージディスプレイ技術を用いて同定された抗体番号1～34のV_HおよびV_L配列を提供する。

【図2-2】図2-1の続きである。

【図2-3】図2-1の続きである。

【図2-4】図2-1の続きである。

【図3-1】ファージディスプレイ選択を用いて同定された抗体（抗体1～34）のP2X4オルソログ結合特性の概要および電気生理学的アッセイによって測定され、対照電流の割合として報告されたそれらの機能的効果の概要を提供する。凡例：+はFMATアッセイにおいて結合が認められたことを示す；-はFMATアッセイにおいて結合が認められなかったことを示す；NTはアッセイにおいて抗体が試験されなかったことを示す。

【図3-2】図3-1の続きである。

【図4】電気生理学的アッセイでスクリーニングされた抗体5、8、11、18、29、および33の結果を示す。これら抗体の各々はP2X4拮抗剤として同定された。抗体の存在下での3μMのATPに応答した、作動薬に誘導される内向き電流ピークは、ヒトま

10

20

30

40

50

たはカニクイザル (c y n o) P 2 X 4 での抗体の不在下での対照電流の割合として示される。

【図 5】ハイブリドーマから単離された抗体 (抗体番号 3 5 ~ 4 8) の P 2 X 4 オルソログ結合特性の概要および電気生理学的アッセイによって測定され、対照電流の割合として報告されたそれらの機能的効果の概要を提供する。

【図 6 - 1】抗体番号 3 5 ~ 4 8 の V_H および V_L 配列を提供する。

【図 6 - 2】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 3】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 4】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 5】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 6】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 7】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 8】図 6 - 1 の続きである。

【図 7 - 1】ハイブリドーマ技術を用いて単離された 2 5 2 の抗体 (抗体番号 3 5 ~ 2 8 6) における結合アッセイの結果の概要および電気生理学的アッセイによって測定され、対照電流の割合として報告されたそれらの機能的効果の概要を提供する。

【図 7 - 2】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 3】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 4】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 5】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 6】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 7】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 8】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 9】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 1 0】図 7 - 1 の続きである。

【図 8 A】Q p a t c h 1 6 X を用いて得られた全細胞の電流トレースを示し、抗体添加の前 (黒色トレース) および後 (灰色トレース) の (灰色バーによって時間的に示される) 作動薬応答を示す。トレースは比較のために重ねられる。点線はゼロ電流を示す。検討対象の P 2 X 4 種は、必要に応じて (m、マウス) (h u、ヒト) によって示される。h u P 2 X 4 に対する活性を示す。

【図 8 B】Q p a t c h 1 6 X を用いて得られた全細胞の電流トレースを示し、抗体添加の前 (黒色トレース) および後 (灰色トレース) の (灰色バーによって時間的に示される) 作動薬応答を示す。トレースは比較として重ねられる。点線はゼロ電流を示す。検討対象の P 2 X 4 種は、必要に応じて (m、マウス) (h u、ヒト) によって示される。m P 2 X 4 に対する活性を示す。

【図 8 C】Q p a t c h 1 6 X を用いて得られた全細胞の電流トレースを示し、抗体添加の前 (黒色トレース) および後 (灰色トレース) の (灰色バーによって時間的に示される) 作動薬応答を示す。トレースは比較として重ねられる。点線はゼロ電流を示す。検討対象の P 2 X 4 種は、必要に応じて (m、マウス) (h u、ヒト) によって示される。m P 2 X 4 に対する活性を示す。

【図 8 D】Q p a t c h 1 6 X を用いて得られた全細胞の電流トレースを示し、抗体添加の前 (黒色トレース) および後 (灰色トレース) の (灰色バーによって時間的に示される) 作動薬応答を示す。トレースは比較として重ねられる。点線はゼロ電流を示す。検討対象の P 2 X 4 種は、必要に応じて (m、マウス) (h u、ヒト) によって示される。h u P 2 X 4 に対する活性を示す。

【図 8 E】Q p a t c h 1 6 X を用いて得られた全細胞の電流トレースを示し、抗体添加の前 (黒色トレース) および後 (灰色トレース) の (灰色バーによって時間的に示される) 作動薬応答を示す。トレースは比較として重ねられる。点線はゼロ電流を示す。検討対象の P 2 X 4 種は、必要に応じて (m、マウス) (h u、ヒト) によって示される。h u P 2 X 4 に対する活性を示す。

10

20

30

40

50

【図 8 F】Q p a t c h 1 6 X を用いて得られた全細胞の電流トレースを示し、抗体添加の前（黒色トレース）および後（灰色トレース）の（灰色バーによって時間的に示される）作動薬応答を示す。トレースは比較として重ねられる。点線はゼロ電流を示す。検討対象の P 2 X 4 種は、必要に応じて（m、マウス）（h u、ヒト）によって示される。h u P 2 X 4 に対する活性を示す。

【図 9】予想される P 2 X 4 三量体 - 抗体番号 1 1 F v 複合体構造を細胞外の視点で模式的に示す。特に、二分のエピトープ - パラトープ界面 - 抗体番号 1 1 V_H C D R - P 2 X 4 プロモーター 1 の頭部（大規模界面 - 大きい点線円）；抗体番号 1 1 V_L C D R - P 2 X 4 プロモーター 2 の右フリッパー部（小規模界面 - 小さい点線円）を図示する。3 つの抗体番号 1 1 分子は、同じ P 2 X 4 三量体分子に潜在的に結合し得る。抗体番号 1 1 の 2 つの F a b アームは同じ P 2 X 4 三量体分子に結合する可能性は低い。抗体番号 1 1 は、2 つの P 2 X 4 サブユニットによって形成されるエピトープにわたって P 2 X ヘテロマーに結合することが予想される。

【図 1 0】ヒト、カニクイザル、マウスおよびラット P 2 X 4 配列のアラインメントを提供する。タンパク質の頭部領域が示される。予想されるエピトープ内部のアミノ酸もまた示される。

【図 1 1】肢への圧力に応答した肢離脱閾値の同側 / 他側比によって測定された、くも膜下腔内に投与された（5 μ g / マウス）P 2 X 4 抗体番号 3 8 および 2 0 8 ならびにアイソタイプ対照抗体（N I P 2 2 8 T M）の、末梢神経結紮（P N L）に誘導される機械的痛覚過敏の反転に対する効果を示す（n = 9 ~ 1 0 / 群）。データは、従属因子として時間および処置を用いた二元配置分散分析を用いて分析した。次いで、統計学的有意性がテューキーのポストホック試験（T u k e y ' s P o s t H o c t e s t）を用いて得られた。 $^* P < 0.05$ ； $^{***} P < 0.001$ - O p + N I P 2 2 8 T M 対 O p + 抗体 2 0 8；+ $P < 0.05$ ；++ $P < 0.01$ ；+++ $P < 0.001$ - O p + N I P 2 2 8 T M 対 O p + 抗体 3 8。

【図 1 2 - 1】抗体 1 1 に由来する抗体番号 2 8 7 ~ 3 1 5 の V_H および V_L 配列のアラインメントを提供する。

【図 1 2 - 2】図 1 2 - 1 の続きである。

【図 1 2 - 3】図 1 2 - 1 の続きである。

【図 1 2 - 4】図 1 2 - 1 の続きである。

【図 1 3】抗体番号 2 0 8 および 3 1 6 ~ 3 2 1 の V_H および V_L 配列を提供する。

【図 1 4】Q p a t c h 1 6 X で記録された h u P 2 X 4 電流に対する抗体番号 1 1、3 0 0 および 3 1 2 の効果を示す。黒色トレースが I g G 添加前の A T P 応答を示す一方、灰色トレースは I g G とのインキュベーション後の A T P 応答を示す。破線はゼロ電流レベルを示し、灰色バーは A T P が細胞浸漬液に添加された時間を示す。トレースは比較のために重ねられる。用量応答曲線は実施例 1 4 に記載のように正規化された電流値でプロットされ、平均 + / - 標準誤差（n = 4）を表す。

【図 1 5】h u P 2 X 4 での抗体 1 1 の、F L I P R または Q p a t c h 1 6 X のいずれかを用いて最適化されたバージョンにおける $I C_{50}$ 値をまとめたものである。値は幾何平均である。

【図 1 6】Q p a t c h 1 6 X で得られた、H E K 2 9 3 F 細胞内で発現されたマウス P 2 X 4 および / または h u P 2 X 4 での抗体 3 8、4 3、4 6 および 2 0 8 における $I C_{50}$ 値をまとめたものである。

【図 1 7】Q p a t c h 1 6 X で測定されたマウスミクログリア P 2 X 4 電流に対する抗体 3 8、4 3、4 6 および 2 0 8 の効果をまとめたものである。

【図 1 8】対照抗体 N I P 2 2 8 または抗体 2 0 8（0.33 mg / ml）のいずれかで前処理されたマウスミクログリアからの代表的な電気生理学的電流トレースを示す。灰色バーは A T P（30 μ M）が細胞に添加された時間を示し、点線はゼロ電流レベルを示す。

【図 1 9】A T P で刺激されるカルシウム応答アッセイにおける 2 つの抗 P 2 X 4 抗体で

10

20

30

40

50

得られた IC_{50} 曲線の例を示す。

【図 20】FLIPR でアッセイされたマウスミクログリアから得られた抗体 46、38 および 208 における IC_{50} 曲線（平均 + / - 標準誤差）を示す。平均 IC_{50} 値が以下に示される。

【図 21】ヒト単球由来マクロファージからの代表的な電気生理学的電流トレースを示す。ATP が細胞に添加された時間はオープンボックスで示される。点線はゼロ電流を示す。

【図 22】ATP (30 μ M) に応答したヒト単球由来マクロファージからの定常状態の内向き電流をまとめたものである。図 23 は、hup2x4 電流に対する抗体 319 ~ 321 の効果をまとめたものである。

【発明を実施するための形態】

【0050】

【表 1】

配列の説明

配列番号	抗体	説明
1	1	VH DNA
2	1	VH PRT
3	1	CDR1 PRT
4	1	CDR2 PRT
5	1	CDR3 PRT

6	1	FW1 PRT
7	1	FW2 PRT
8	1	FW3 PRT
9	1	FW4 PRT
10	1	VL DNA
11	1	VL PRT

12	1	CDR1 PRT
13	1	CDR2 PRT
14	1	CDR3 PRT
15	1	FW1 PRT
16	1	FW2 PRT
17	1	FW3 PRT

【0051】

【表 2】

18	1	FW4 PRT
19	5	VH DNA
20	5	VH PRT
21	5	CDR1 PRT
22	5	CDR2 PRT
23	5	CDR3 PRT
24	5	FW1 PRT
25	5	FW2 PRT
26	5	FW3 PRT
27	5	FW4 PRT
28	5	VL DNA
29	5	VL PRT
30	5	CDR1 PRT
31	5	CDR2 PRT
32	5	CDR3 PRT
33	5	FW1 PRT
34	5	FW2 PRT
35	5	FW3 PRT
36	5	FW4 PRT
37	8	VH DNA
38	8	VH PRT
39	8	CDR1 PRT
40	8	CDR2 PRT

41	8	CDR3 PRT
42	8	FW1 PRT
43	8	FW2 PRT
44	8	FW3 PRT
45	8	FW4 PRT
46	8	VL DNA
47	8	VL PRT
48	8	CDR1 PRT
49	8	CDR2 PRT
50	8	CDR3 PRT
51	8	FW1 PRT
52	8	FW2 PRT
53	8	FW3 PRT
54	8	FW4 PRT
55	11	VH DNA
56	11	VH PRT
57	11	CDR1 PRT
58	11	CDR2 PRT
59	11	CDR3 PRT
60	11	FW1 PRT
61	11	FW2 PRT
62	11	FW3 PRT
63	11	FW4 PRT

64	11	VL DNA
65	11	VL PRT
66	11	CDR1 PRT
67	11	CDR2 PRT
68	11	CDR3 PRT
69	11	FW1 PRT
70	11	FW2 PRT
71	11	FW3 PRT
72	11	FW4 PRT
73	18	VH DNA
74	18	VH PRT
75	18	CDR1 PRT
76	18	CDR2 PRT
77	18	CDR3 PRT
78	18	FW1 PRT
79	18	FW2 PRT
80	18	FW3 PRT
81	18	FW4 PRT
82	18	VL DNA
83	18	VL PRT
84	18	CDR1 PRT
85	18	CDR2 PRT
86	18	CDR3 PRT

10

20

30

40

10

203040

40

[illegible]

【表 5】

253	42	VH DNA
254	42	VH PRT
255	42	CDR1 PRT
256	42	CDR2 PRT
257	42	CDR3 PRT
258	42	FW1 PRT
259	42	FW2 PRT
260	42	FW3 PRT
261	42	FW4 PRT
262	42	VL DNA
263	42	VL PRT
264	42	CDR1 PRT
265	42	CDR2 PRT
266	42	CDR3 PRT
267	42	FW1 PRT
268	42	FW2 PRT
269	42	FW3 PRT
270	42	FW4 PRT
271	43	VH

		DNA
272	43	VH PRT
273	43	CDR1 PRT
274	43	CDR2 PRT
275	43	CDR3 PRT
276	43	FW1 PRT
277	43	FW2 PRT
278	43	FW3 PRT
279	43	FW4 PRT
280	43	VL DNA
281	43	VL PRT
282	43	CDR1 PRT
283	43	CDR2 PRT
284	43	CDR3 PRT
285	43	FW1 PRT
286	43	FW2 PRT
287	43	FW3 PRT
288	43	FW4 PRT
289	44	VH DNA
290	44	VH PRT
291	44	CDR1 PRT
292	44	CDR2 PRT
293	44	CDR3 PRT

294	44	FW1 PRT
295	44	FW2 PRT
296	44	FW3 PRT
297	44	FW4 PRT
298	44	VL DNA
299	44	VL PRT
300	44	CDR1 PRT
301	44	CDR2 PRT
302	44	CDR3 PRT
303	44	FW1 PRT
304	44	FW2 PRT
305	44	FW3 PRT
306	44	FW4 PRT
307	45	VH DNA
308	45	VH PRT
309	45	CDR1 PRT
310	45	CDR2 PRT
311	45	CDR3 PRT
312	45	FW1 PRT
313	45	FW2 PRT
314	45	FW3 PRT
315	45	FW4 PRT
316	45	VL DNA

10

20

30

40

【表 6】

317	45	VL PRT
318	45	CDR1 PRT
319	45	CDR2 PRT
320	45	CDR3 PRT
321	45	FW1 PRT
322	45	FW2 PRT
323	45	FW3 PRT
324	45	FW4 PRT
325	46	VH DNA
326	46	VH PRT
327	46	CDR1 PRT
328	46	CDR2 PRT
329	46	CDR3 PRT
330	46	FW1 PRT
331	46	FW2 PRT
332	46	FW3 PRT
333	46	FW4 PRT
334	46	VL DNA
335	46	VL PRT
336	46	CDR1 PRT
337	46	CDR2 PRT
338	46	CDR3 PRT
339	46	FW1 PRT

340	46	FW2 PRT
341	46	FW3 PRT
342	46	FW4 PRT
343	47	VH DNA
344	47	VH PRT
345	47	CDR1 PRT
346	47	CDR2 PRT
347	47	CDR3 PRT
348	47	FW1 PRT
349	47	FW2 PRT
350	47	FW3 PRT
351	47	FW4 PRT
352	47	VL DNA
353	47	VL PRT
354	47	CDR1 PRT
355	47	CDR2 PRT
356	47	CDR3 PRT
357	47	FW1 PRT
358	47	FW2 PRT
359	47	FW3 PRT
360	47	FW4 PRT
361	48	VH DNA
362	48	VH PRT

363	48	CDR1 PRT
364	48	CDR2 PRT
365	48	CDR3 PRT
366	48	FW1 PRT
367	48	FW2 PRT
368	48	FW3 PRT
369	48	FW4 PRT
370	48	VL DNA
371	48	VL PRT
372	48	CDR1 PRT
373	48	CDR2 PRT
374	48	CDR3 PRT
375	48	FW1 PRT
376	48	FW2 PRT
377	48	FW3 PRT
378	48	FW4 PRT
379	287	VH DNA
380	287	VH PRT
381	287	CDR1 PRT
382	287	CDR2 PRT
383	287	CDR3 PRT
384	287	FW1 PRT
385	287	FW2 PRT

10

20

30

40

【表 7】

386	287	FW3 PRT
387	287	FW4 PRT
388	287	VL DNA
389	287	VL PRT
390	287	CDR1 PRT
391	287	CDR2 PRT
392	287	CDR3 PRT
393	287	FW1 PRT
394	287	FW2 PRT
395	287	FW3 PRT
396	287	FW4 PRT
397	288	VH DNA
398	288	VH PRT
399	288	CDR1 PRT
400	288	CDR2 PRT
401	288	CDR3 PRT
402	288	FW1 PRT
403	288	FW2 PRT
404	288	FW3 PRT
405	288	FW4 PRT
406	288	VL DNA
407	288	VL PRT
408	288	CDR1 PRT

409	288	CDR2 PRT
410	288	CDR3 PRT
411	288	FW1 PRT
412	288	FW2 PRT
413	288	FW3 PRT
414	288	FW4 PRT
415	289	VH DNA
416	289	VH PRT
417	289	CDR1 PRT
418	289	CDR2 PRT
419	289	CDR3 PRT
420	289	FW1 PRT
421	289	FW2 PRT
422	289	FW3 PRT
423	289	FW4 PRT
424	289	VL DNA
425	289	VL PRT
426	289	CDR1 PRT
427	289	CDR2 PRT
428	289	CDR3 PRT
429	289	FW1 PRT
430	289	FW2 PRT
431	289	FW3 PRT

432	289	FW4 PRT
433	290	VH DNA
434	290	VH PRT
435	290	CDR1 PRT
436	290	CDR2 PRT
437	290	CDR3 PRT
438	290	FW1 PRT
439	290	FW2 PRT
440	290	FW3 PRT
441	290	FW4 PRT
442	290	VL DNA
443	290	VL PRT
444	290	CDR1 PRT
445	290	CDR2 PRT
446	290	CDR3 PRT
447	290	FW1 PRT
448	290	FW2 PRT
449	290	FW3 PRT
450	290	FW4 PRT
451	291	VH DNA
452	291	VH PRT
453	291	CDR1 PRT
454	291	CDR2 PRT

10

20

30

40

【表 8】

455	291	CDR3 PRT
456	291	FW1 PRT
457	291	FW2 PRT
458	291	FW3 PRT
459	291	FW4 PRT
460	291	VL DNA
461	291	VL PRT
462	291	CDR1 PRT
463	291	CDR2 PRT
464	291	CDR3 PRT
465	291	FW1 PRT
466	291	FW2 PRT
467	291	FW3 PRT
468	291	FW4 PRT
469	292	VH DNA
470	292	VH PRT
471	292	CDR1 PRT
472	292	CDR2 PRT
473	292	CDR3 PRT
474	292	FW1 PRT
475	292	FW2 PRT
476	292	FW3 PRT
477	292	FW4 PRT

478	292	VL DNA
479	292	VL PRT
480	292	CDR1 PRT
481	292	CDR2 PRT
482	292	CDR3 PRT
483	292	FW1 PRT
484	292	FW2 PRT
485	292	FW3 PRT
486	292	FW4 PRT
487	293	VH DNA
488	293	VH PRT
489	293	CDR1 PRT
490	293	CDR2 PRT
491	293	CDR3 PRT
492	293	FW1 PRT
493	293	FW2 PRT
494	293	FW3 PRT
495	293	FW4 PRT
496	293	VL DNA
497	293	VL PRT
498	293	CDR1 PRT
499	293	CDR2 PRT
500	293	CDR3 PRT

501	293	FW1 PRT
502	293	FW2 PRT
503	293	FW3 PRT
504	293	FW4 PRT
505	294	VH DNA
506	294	VH PRT
507	294	CDR1 PRT
508	294	CDR2 PRT
509	294	CDR3 PRT
510	294	FW1 PRT
511	294	FW2 PRT
512	294	FW3 PRT
513	294	FW4 PRT
514	294	VL DNA
515	294	VL PRT
516	294	CDR1 PRT
517	294	CDR2 PRT
518	294	CDR3 PRT
519	294	FW1 PRT
520	294	FW2 PRT
521	294	FW3 PRT
522	294	FW4 PRT
523	295	VH DNA

10

20

30

40

【表 9】

524	295	VH PRT
525	295	CDR1 PRT
526	295	CDR2 PRT
527	295	CDR3 PRT
528	295	FW1 PRT
529	295	FW2 PRT
530	295	FW3 PRT
531	295	FW4 PRT
532	295	VL DNA
533	295	VL PRT
534	295	CDR1 PRT
535	295	CDR2 PRT
536	295	CDR3 PRT
537	295	FW1 PRT
538	295	FW2 PRT
539	295	FW3 PRT
540	295	FW4 PRT
541	296	VH DNA
542	296	VH PRT
543	296	CDR1 PRT
544	296	CDR2 PRT
545	296	CDR3 PRT
546	296	FW1 PRT

547	296	FW2 PRT
548	296	FW3 PRT
549	296	FW4 PRT
550	296	VL DNA
551	296	VL PRT
552	296	CDR1 PRT
553	296	CDR2 PRT
554	296	CDR3 PRT
555	296	FW1 PRT
556	296	FW2 PRT
557	296	FW3 PRT
558	296	FW4 PRT
559	297	VH DNA
560	297	VH PRT
561	297	CDR1 PRT
562	297	CDR2 PRT
563	297	CDR3 PRT
564	297	FW1 PRT
565	297	FW2 PRT
566	297	FW3 PRT
567	297	FW4 PRT
568	297	VL DNA
569	297	VL PRT

570	297	CDR1 PRT
571	297	CDR2 PRT
572	297	CDR3 PRT
573	297	FW1 PRT
574	297	FW2 PRT
575	297	FW3 PRT
576	297	FW4 PRT
577	298	VH DNA
578	298	VH PRT
579	298	CDR1 PRT
580	298	CDR2 PRT
581	298	CDR3 PRT
582	298	FW1 PRT
583	298	FW2 PRT
584	298	FW3 PRT
585	298	FW4 PRT
586	298	VL DNA
587	298	VL PRT
588	298	CDR1 PRT
589	298	CDR2 PRT
590	298	CDR3 PRT
591	298	FW1 PRT
592	298	FW2 PRT

10

20

30

40

【表 1 1】

662	303	CDR3 PRT
663	303	FW1 PRT
664	303	FW2 PRT
665	303	FW3 PRT
666	303	FW4 PRT
667	304	VH DNA
668	304	VH PRT
669	304	CDR1 PRT
670	304	CDR2 PRT
671	304	CDR3 PRT
672	304	FW1 PRT
673	304	FW2 PRT
674	304	FW3 PRT
675	304	FW4 PRT
676	304	VL DNA
677	304	VL PRT
678	304	CDR1 PRT
679	304	CDR2 PRT
680	304	CDR3 PRT
681	304	FW1 PRT
682	304	FW2 PRT
683	304	FW3 PRT
684	304	FW4 PRT

685	305	VH DNA
686	305	VH PRT
687	305	CDR1 PRT
688	305	CDR2 PRT
689	305	CDR3 PRT
690	305	FW1 PRT
691	305	FW2 PRT
692	305	FW3 PRT
693	305	FW4 PRT
694	305	VL DNA
695	305	VL PRT
696	305	CDR1 PRT
697	305	CDR2 PRT
698	305	CDR3 PRT
699	305	FW1 PRT
700	305	FW2 PRT
701	305	FW3 PRT
702	305	FW4 PRT
703	306	VH DNA
704	306	VH PRT
705	306	CDR1 PRT
706	306	CDR2 PRT
707	306	CDR3 PRT

708	306	FW1 PRT
709	306	FW2 PRT
710	306	FW3 PRT
711	306	FW4 PRT
712	306	VL DNA
713	306	VL PRT
714	306	CDR1 PRT
715	306	CDR2 PRT
716	306	CDR3 PRT
717	306	FW1 PRT
718	306	FW2 PRT
719	306	FW3 PRT
720	306	FW4 PRT
721	307	VH DNA
722	307	VH PRT
723	307	CDR1 PRT
724	307	CDR2 PRT
725	307	CDR3 PRT
726	307	FW1 PRT
727	307	FW2 PRT
728	307	FW3 PRT
729	307	FW4 PRT
730	307	VL DNA

10

20

30

40

【表 1 2】

731	307	VL PRT
732	307	CDR1 PRT
733	307	CDR2 PRT
734	307	CDR3 PRT
735	307	FW1 PRT
736	307	FW2 PRT
737	307	FW3 PRT
738	307	FW4 PRT
739	308	VH DNA
740	308	VH PRT
741	308	CDR1 PRT
742	308	CDR2 PRT
743	308	CDR3 PRT
744	308	FW1 PRT
745	308	FW2 PRT
746	308	FW3 PRT
747	308	FW4 PRT
748	308	VL DNA
749	308	VL PRT
750	308	CDR1 PRT
751	308	CDR2 PRT
752	308	CDR3 PRT
753	308	FW1 PRT

754	308	FW2 PRT
755	308	FW3 PRT
756	308	FW4 PRT
757	309	VH DNA
758	309	VH PRT
759	309	CDR1 PRT
760	309	CDR2 PRT
761	309	CDR3 PRT
762	309	FW1 PRT
763	309	FW2 PRT
764	309	FW3 PRT
765	309	FW4 PRT
766	309	VL DNA
767	309	VL PRT
768	309	CDR1 PRT
769	309	CDR2 PRT
770	309	CDR3 PRT
771	309	FW1 PRT
772	309	FW2 PRT
773	309	FW3 PRT
774	309	FW4 PRT
775	310	VH DNA
776	310	VH PRT

777	310	CDR1 PRT
778	310	CDR2 PRT
779	310	CDR3 PRT
780	310	FW1 PRT
781	310	FW2 PRT
782	310	FW3 PRT
783	310	FW4 PRT
784	310	VL DNA
785	310	VL PRT
786	310	CDR1 PRT
787	310	CDR2 PRT
788	310	CDR3 PRT
789	310	FW1 PRT
790	310	FW2 PRT
791	310	FW3 PRT
792	310	FW4 PRT
793	311	VH DNA
794	311	VH PRT
795	311	CDR1 PRT
796	311	CDR2 PRT
797	311	CDR3 PRT
798	311	FW1 PRT
799	311	FW2 PRT

10

20

30

40

【表 1 3】

800	311	FW3 PRT
801	311	FW4 PRT
802	311	VL DNA
803	311	VL PRT
804	311	CDR1 PRT
805	311	CDR2 PRT
806	311	CDR3 PRT
807	311	FW1 PRT
808	311	FW2 PRT
809	311	FW3 PRT
810	311	FW4 PRT
811	312	VH DNA
812	312	VH PRT
813	312	CDR1 PRT
814	312	CDR2 PRT
815	312	CDR3 PRT
816	312	FW1 PRT
817	312	FW2 PRT
818	312	FW3 PRT
819	312	FW4 PRT
820	312	VL DNA
821	312	VL PRT
822	312	CDR1 PRT

823	312	CDR2 PRT
824	312	CDR3 PRT
825	312	FW1 PRT
826	312	FW2 PRT
827	312	FW3 PRT
828	312	FW4 PRT
829	313	VH DNA
830	313	VH PRT
831	313	CDR1 PRT
832	313	CDR2 PRT
833	313	CDR3 PRT
834	313	FW1 PRT
835	313	FW2 PRT
836	313	FW3 PRT
837	313	FW4 PRT
838	313	VL DNA
839	313	VL PRT
840	313	CDR1 PRT
841	313	CDR2 PRT
842	313	CDR3 PRT
843	313	FW1 PRT
844	313	FW2 PRT
845	313	FW3 PRT

846	313	FW4 PRT
847	314	VH DNA
848	314	VH PRT
849	314	CDR1 PRT
850	314	CDR2 PRT
851	314	CDR3 PRT
852	314	FW1 PRT
853	314	FW2 PRT
854	314	FW3 PRT
855	314	FW4 PRT
856	314	VL DNA
857	314	VL PRT
858	314	CDR1 PRT
859	314	CDR2 PRT
860	314	CDR3 PRT
861	314	FW1 PRT
862	314	FW2 PRT
863	314	FW3 PRT
864	314	FW4 PRT
865	315	VH DNA
866	315	VH PRT
867	315	CDR1 PRT
868	315	CDR2 PRT

10

20

30

40

【表 1 4】

869	315	CDR3 PRT
870	315	FW1 PRT
871	315	FW2 PRT
872	315	FW3 PRT
873	315	FW4 PRT
874	315	VL DNA
875	315	VL PRT
876	315	CDR1 PRT
877	315	CDR2 PRT
878	315	CDR3 PRT
879	315	FW1 PRT
880	315	FW2 PRT
881	315	FW3 PRT
882	315	FW4 PRT
883	316	VH DNA
884	316	VH PRT
885	316	CDR1 PRT
886	316	CDR2 PRT
887	316	CDR3 PRT
888	316	FW1 PRT
889	316	FW2 PRT
890	316	FW3 PRT
891	316	FW4 PRT

892	316	VL DNA
893	316	VL PRT
894	316	CDR1 PRT
895	316	CDR2 PRT
896	316	CDR3 PRT
897	316	FW1 PRT
898	316	FW2 PRT
899	316	FW3 PRT
900	316	FW4 PRT
901	317	VH DNA
902	317	VH PRT
903	317	CDR1 PRT
904	317	CDR2 PRT
905	317	CDR3 PRT
906	317	FW1 PRT
907	317	FW2 PRT
908	317	FW3 PRT
909	317	FW4 PRT
910	317	VL DNA
911	317	VL PRT
912	317	CDR1 PRT
913	317	CDR2 PRT
914	317	CDR3 PRT

915	317	FW1 PRT
916	317	FW2 PRT
917	317	FW3 PRT
918	317	FW4 PRT
919	318	VH DNA
920	318	VH PRT
921	318	CDR1 PRT
922	318	CDR2 PRT
923	318	CDR3 PRT
924	318	FW1 PRT
925	318	FW2 PRT
926	318	FW3 PRT
927	318	FW4 PRT
928	318	VL DNA
929	318	VL PRT
930	318	CDR1 PRT
931	318	CDR2 PRT
932	318	CDR3 PRT
933	318	FW1 PRT
934	318	FW2 PRT
935	318	FW3 PRT
936	318	FW4 PRT
937	319	VH DNA

10

20

30

40

【表 1 5】

938	319	VH PRT
939	319	CDR1 PRT
940	319	CDR2 PRT
941	319	CDR3 PRT
942	319	FW1 PRT
943	319	FW2 PRT
944	319	FW3 PRT
945	319	FW4 PRT
946	319	VL DNA
947	319	VL PRT
948	319	CDR1 PRT
949	319	CDR2 PRT
950	319	CDR3 PRT
951	319	FW1 PRT
952	319	FW2 PRT
953	319	FW3 PRT
954	319	FW4 PRT
955	320	VH DNA
956	320	VH PRT
957	320	CDR1 PRT
958	320	CDR2 PRT
959	320	CDR3 PRT
960	320	FW1 PRT

961	320	FW2 PRT
962	320	FW3 PRT
963	320	FW4 PRT
964	320	VL DNA
965	320	VL PRT
966	320	CDR1 PRT
967	320	CDR2 PRT
968	320	CDR3 PRT
969	320	FW1 PRT
970	320	FW2 PRT
971	320	FW3 PRT
972	320	FW4 PRT
973	321	VH DNA
974	321	VH PRT
975	321	CDR1 PRT
976	321	CDR2 PRT
977	321	CDR3 PRT
978	321	FW1 PRT
979	321	FW2 PRT
980	321	FW3 PRT
981	321	FW4 PRT
982	321	VL DNA
983	321	VL PRT

984	321	CDR1 PRT
985	321	CDR2 PRT
986	321	CDR3 PRT
987	321	FW1 PRT
988	321	FW2 PRT
989	321	FW3 PRT
990	321	FW4 PRT
991	208	VH DNA
992	208	VH PRT
993	208	CDR1 PRT
994	208	CDR2 PRT
995	208	CDR3 PRT
996	208	FW1 PRT
997	208	FW2 PRT
998	208	FW3 PRT
999	208	FW4 PRT
100	208	VL DNA
1001	208	VL PRT
1002	208	CDR1 PRT
1003	208	CDR2 PRT
1004	208	CDR3 PRT
1005	208	FW1 PRT
1006	208	FW2 PRT

10

20

30

40

【表 16】

1007	208	FW3 PRT	1008	208	FW4 PRT
------	-----	------------	------	-----	------------

【0066】

発明の詳細な説明

下記のように、本発明は、P2X4ポリペプチドに特異的に結合しかつP2X4チャネル活性を調節する抗体、組換えP2X4ポリペプチド、およびかかるポリペプチドを作成するための方法、ならびに抗P2X4抗体を作成するための組成物および方法、ならびに神経障害性疼痛および他の徴候の治療のためにP2X4抗体を用いる方法を提供する。

10

【0067】

P2X4の組換え発現

本発明は、安定な三量体複合体を形成する精製され、単離された組換えP2X4ポリペプチドを提供する。本発明は、精製され、単離されたヒトおよびマウスP2X4ポリペプチドの大規模生成のための方法をさらに提供し、精製され、単離された組換えタンパク質が主に安定な三量体として存在する場合、ミリグラム量のP2X4タンパク質を生成するのにそれは十分である。本明細書に記載の選択およびスクリーニング実験用に生成されるP2X4の総量は、6.2mgのhP2X4および3.2mgのmP2X4を含んだ。精製タンパク質の生成レベルは、0.2mg/L昆虫細胞培養液であった。蛍光サイズ排除クロマトグラフィーによってアッセイされるとき、タンパク質調製物は50~75%の三量体を含有する。

20

【0068】

HEK293細胞内でのC末端デカヒスチジンタグを用いたヒト-P2X4の発現および精製については記載がなされている(Young et al., J. Biol. Chem. 283(2008)26241-26251)。精製は、ドデシルマルトシド界面活性剤を用いた可溶化およびNi-固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを含んだ。ポリアクリルアミドゲル電気泳動精製ステップは、三量体型を単離するのに必要とされた。hP2X4の完全なる三量体調製物が単離されているように求められたが、記述される収量はわずか40μg/2.5×10⁸個の細胞であった。

30

【0069】

三量体ラットP2X4チャネル(サブタイプ2、4および7)の小規模発現および精製に関する別の例が実施されている(Antonio et al., Br. J. Pharmacol. 163(2011)1069-1077)。C末端ヘマグルチニンタグを有するラットP2X4受容体が、tsA201細胞(SV40大型T抗原を安定に発現するHEK293細胞のサブクローン)で一過性に発現された。受容体はCHAPS界面活性剤で可溶化され、親和性精製された。P2X2およびP2X7の発現と比べて、P2X4の発現は比較的低かった。AFMイメージングにおいては精製された受容体が用いられ、受容体の三量体配置に加えて、二重の三量体(三量体の二量体)を示した。

40

【0070】

別の報告では、Sf9昆虫細胞系が、ヒトP2X4およびキイロタマホコリカビ(Dicystosellium discoideum)P2XAの発現について評価された(Valente et al., Biochim. Biophys. Acta 1808(2011)2859-2866)。キイロタマホコリカビ(D. discoideum)P2XAが安定な精製された界面活性剤可溶性の形態で得ることができた一方、ヒトP2X4は三量体型で生成される上で不適合であることが報告された。

【0071】

先行技術で提示される方法では、組換えP2X4ポリペプチドを実質量で均一に単離することができなかった。さらに先行技術では、単離されたタンパク質の大部分が三量体型で存在した場合、ヒトP2X4複合体をミリグラム量で単離することができなかった。そ

50

れに対し、スケールアップに適した本発明の方法は、精製された組換え P 2 X 4 ポリペプチドのミリグラム規模での生成を可能にしている。得られた精製 P 2 X 4 の収量は、0 . 2 m g / L 昆虫細胞培地であり、約 8 μ g / 1×10^8 個の細胞に対応した。

【0072】

精製 P 2 X 4 の大規模生成においては、ヒト P 2 X 4 およびマウス P 2 X 4 受容体は、バキュロウイルス発現系を用いて S f 9 昆虫細胞内で発現された。発現およびタンパク質生成は S f 9 昆虫細胞株に限定されず、タンパク質生成を支持する他の昆虫細胞および細胞株として、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) S f 2 1 細胞またはイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来細胞株 T n - 3 6 8 および H i g h - F i v e (商標) B T I - T N - 5 B 1 - 4 が挙げられる。タンパク質生成を増加させるため、P 2 X 4 発現レベルが回収時に監視され、また受容体の品質および均一性が、改良されたサイズ排除クロマトグラフィーを用いる一方、B a c k m a r k らによって記載される通りの (P r o t e i n S c i . 2 2 (2 0 1 3) 1 1 2 4 - 1 1 3 2) 蛍光 (F S E C) 法で検出することで評価された。この方法は、K a w a t e および G o u a u x によって記載される通りの (S t r u c t u r e 1 4 (2 0 0 6) 6 7 3 - 6 8 1) 基本的な F S E C 概念と類似しているが、タンパク質上のヒスチジンタグと特異的に相互作用する蛍光プローブが適用された。本明細書に報告される驚異的な収量を得るため、細胞は、S F 9 0 0 I I 培地中、 $1 . 0 \times 10^6$ 個 / m L の密度で接種された。細胞は、 2×10^6 個の細胞 / m l の細胞密度、2 の感染多重度で感染を受けた。タンパク質発現は 2 7 で実施され、細胞は感染から 7 2 時間後に採取された。これらの条件は、P 2 X 4 の三量体型が最適生成されることを許容した。タンパク質の均一性は想定外であった。発現された P 2 X 4 タンパク質の総量が感染後の時間経過とともに増加した一方、F S E C によるアッセイによると、発現されたタンパク質の品質は 7 2 時間経過すると高まらなかった。

【0073】

抗 P 2 X 4 抗体

本開示は、新規な抗原結合断片を含む抗 P 2 X 4 抗体を提供する。特定の実施形態では、抗 P 2 X 4 抗体は、本明細書に記載の抗 P 2 X 4 抗体 (例えば抗体 1 ~ 4 8) またはその断片である。

【0074】

一般に、抗体は、例えば、伝統的なハイブリドーマ技術 (K o h l e r a n d M i l l s t e i n (1 9 7 5) N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 9) 、組換え DNA 法 (米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号明細書) 、または抗体ライブラリーを用いて実施されるファージディスプレイ (C l a c k s o n , T . a n d L o w m a n , H . B . P h a g e D i s p l a y - A P r a c t i c a l A p p r o a c h , 2 0 0 4 . O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s ; (2) T h o m p s o n , J . e t a l . J M o l B i o l . 2 5 6 (1) : 7 7 - 8 8 , 1 9 9 6 ; (3) O s b o u r n , J . K . e t a l . I m m u n o t e c h n o l o g y , 2 (3) : 1 8 1 - 9 6 , 1 9 9 6) を用いて作成され得る。代表的な抗体 3 5 ~ 4 8 は、本明細書に記載のハイブリドーマ技術を用いて得られた。代表的な抗体 1 ~ 3 4 は、本明細書に記載のファージディスプレイを用いて得られた。他の抗体産生技術については、A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , e d s . H a r l o w e t a l . , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , 1 9 8 8 も参照のこと。本発明は、任意の特定の供給源、種の由来、または産生方法に限定されない。

【0075】

免疫グロブリンとしても知られるインタクトな抗体は、典型的には、2 つの軽 (L) 鎖 (各々、約 2 5 k D a) および 2 つの重 (H) 鎖 (各々、約 5 0 k D a) からなる四量体グリコシル化タンパク質である。鎖および鎖と名付けられた軽鎖の 2 つのタイプは、抗体中に見出される。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは 5 つの主要なクラス : A 、 D 、 E 、 G 、 および M に割り当てることができ、またこれらのい

くつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、 IgG_1 、 IgG_2 、 IgG_3 、 IgG_4 、 IgA_1 、および IgA_2 にさらに分かれる場合がある。

【0076】

免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元配置は、当該技術分野で周知である。抗体構造のレビューについては、Harlow et al.、上記を参照のこと。簡潔に述べると、各軽鎖は、N末端可変ドメイン（ V_L ）および定常ドメイン（ C_L ）からなる。各重鎖は、N末端可変ドメイン（ V_H ）、3つまたは4つの定常ドメイン（ C_H ）、およびヒンジ領域からなる。 V_H に最も近い C_H ドメインは C_{H1} と名付けられている。 V_H および V_L ドメインは、フレームワーク領域と称される比較的保存された配列の4つの領域（FR1、FR2、FR3、およびFR4）からなり、相補性決定領域（CDR）と称される超可変配列の3つの領域に対する足場を形成する。CDRは、抗原との特異的相互作用に関与する残基の大部分を有する。3つのCDRは、CDR1、CDR2、およびCDR3と称される。重鎖上のCDR成分がH1、H2、およびH3と称され、それ故、軽鎖上のCDR成分はL1、L2、およびL3と称される。CDR3、特にH3は、抗原結合ドメイン内部の分子多様性の最大の供給源である。例えば、H3は、アミノ酸残基で2つ程度に短いか、または26を超える可能性がある。特定の実施形態では、重鎖CDR3（H3）は、およそ4アミノ酸（例えば抗体番号2を参照）と22アミノ酸（例えば抗体番号20および34を参照）の間を含む。

10

【0077】

Fab断片（断片抗原結合）は、定常領域間のジスルフィド結合によって共有結合された V_H - C_{H1} および V_L - C_L ドメインからなる。Fv内の非共有結合された V_H および V_L ドメインが宿主細胞内で同時発現される場合の解離する傾向を克服するため、いわゆる一本鎖（sc）Fv断片（scFv）が構築され得る。scFvでは、柔軟かつ十分に長いポリペプチドが、 V_H のC末端を V_L のN末端にまたは V_L のC末端を V_H のN末端にいずれか連結する。最も一般的には、15残基（ Gly_4Ser ）₃ペプチドがリンカーとして用いられるが、他のリンカーもまた当該技術分野で公知である。

20

【0078】

抗体多様性は、可変領域をコードする複数の生殖系列遺伝子のコンビナトリアルアセンブリおよび種々の体細胞事象の結果である。体細胞事象は、完全な V_H 領域を作製する、多様性（D）遺伝子セグメントおよび連結（J）遺伝子セグメントを有する可変遺伝子セグメントの組換え、ならびに完全な V_L 領域を作製する、可変遺伝子セグメントおよび連結遺伝子セグメントの組換えを含む。この組換えプロセス自体は、不明確であって、V（D）J連結部分でアミノ酸の欠失または付加をもたらす。多様性のこれらの機構は、抗原露出前の発達中のB細胞において生じる。抗原刺激後、B細胞において発現される抗体遺伝子は、体細胞突然変異を受ける。

30

【0079】

生殖系列遺伝子セグメントの概算数、これらのセグメントのランダム組換え、およびランダム V_H - V_L 対形成に基づく、最大 1.6×10^7 の様々な抗体が産生され得る（Fundamental Immunology, 3rd ed., ed. Paul, Raven Press, New York, N.Y., 1993）。抗体多様性（例えば体細胞突然変異）に寄与する他のプロセスを考慮に入れる場合、 1×10^{10} 以上の様々な抗体が潜在的に作成され得ると考えられる（Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1995）。抗体多様性に関与する多数のプロセスのため、独立的に作成される抗体が、CDRにおいて同一であるかまたはまさに実質的に類似のアミノ酸配列を有する可能性は極めて低い。

40

【0080】

本開示は、ヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリー由来の新規なCDRを提供する。CDRを保有するための構造は、一般に、抗体の重鎖または抗体の軽鎖あるいはそれらの一部であり、ここで、CDRは、天然に存在する V_H および V_L のCDRに対応する位置に位

50

置する。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md., 1991に記載のように決定することができる。

【0081】

抗P2X4抗体1~48、208、および287~321のアミノ酸配列(それらのV_HおよびV_Lドメインを含む)は図面で示され、本明細書に記載される。

【0082】

抗P2X4抗体は、任意選択的に抗体定常領域またはその一部分を含んでもよい。例えば、V_Lドメインは、そのC末端で、ヒトC鎖またはC鎖を含む抗体軽鎖定常ドメインに結合していてもよい。同様に、V_Hドメインに基づく特定の抗原結合ドメインは、任意の抗体アイソトープ、例えば、IgG、IgA、IgE、およびIgM、ならびに限定はされないがIgG₁およびIgG₄を含むアイソトープサブクラスのいずれかに由来する免疫グロブリン重鎖の全部または一部に結合していてもよい。C末端断片におけるDNAおよびアミノ酸配列は、当該技術分野で周知である(例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md., 1991を参照)。

10

20

【0083】

特定の実施形態は、P2X4抗体由来のFv断片のV_Hおよび/またはV_Lドメインを含む。さらなる実施形態は、これらのV_HおよびV_Lドメインのいずれかの少なくとも1つのCDRを含む。抗体番号1~48で示されるCDR配列の少なくとも1つを含む抗体は、本発明の範囲内に包含される。特定の一実施形態では、本発明の抗体はV_HのCDR3を含む。

【0084】

特定の実施形態では、V_Hドメインおよび/またはV_Lドメインは、生殖系列化され得る、すなわち、これらのドメインのフレームワーク領域(FR)は、従来の分子生物学技術を用いて生殖系列細胞によって産生されるFRに適合するように突然変異される。他の実施形態では、このフレームワーク配列は、コンセンサス生殖系列配列とは異なったままである。

30

【0085】

特定の実施形態では、抗体は、ヒトP2X4の細胞外ドメイン内のエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態では、抗体は、ヒトまたはマウスP2X4の細胞外ドメイン内のエピトープに 10^6M^{-1} 超、 10^7M^{-1} 超、または 10^8M^{-1} 超の親和性で特異的に結合する。

【0086】

本発明の抗体が、例えばP2X4細胞外ドメインの全部または一部を含む組換えタンパク質を含む他のタンパク質とも結合し得ることは十分に考えられる。

40

【0087】

当業者は、本発明の抗体を、P2X4と一部異なるタンパク質を検出し、測定し、また阻害するために用いてもよいことを理解するだろう。本抗体は、標的タンパク質が、P2X4(NCBI参照番号Q99571)の隣接アミノ酸のうち、少なくとも100個、80個、60個、40個、または20個の任意の配列に対して少なくとも約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれを超えて同一である配列を含む限り、結合の特異性を保持することが予想される。パーセント同一性は、標準的なアラインメントアルゴリズム(例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol., 215: 403-410に記載されるBasic Local Alignment Tool (BLAST)、Needleman et al. (1970) J. Mo

50

l . Biol . , 48 : 444 - 453 のアルゴリズム、または Meyers et al . (1988) Comput . Appl . Biosci . , 4 : 11 - 17 のアルゴリズムなど) によって決定される。

【 0088 】

配列相同性分析に加えて、エピトープマッピング (例えば、Epitope Mapping Protocols , ed . Morris , Humana Press , 1996 を参照) ならびに二次構造分析および三次構造分析は、開示された抗体およびその抗原との複合体から推定される特定の 3D 構造を同定するため、実施することができる。かかる 3D 構造の例が抗体番号 11 として提供される。かかる方法として、限定はされないが、X 線結晶学 (Engstrom (1974) Biochem . Exp . Biol . , 11 : 7 - 13) および本開示の抗体の仮想表示のコンピュータモデリング (Fletterick et al . (1986) Computer Graphics and Molecular Modeling , in Current Communications in Molecular Biology , Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor , NY) が挙げられる。

10

【 0089 】

誘導体

本開示は、P2X4 に特異的な抗体を得るための方法を提供する。かかる抗体の CDR は、本明細書で同定される V_H および V_L の特異的な配列に限定されず、また P2X4 に特異的に結合する能力を保持するこれらの配列の変異体を含み得る。かかる変異体は、当業者により当該技術分野で周知の技術を用いて、本明細書で列挙される配列から誘導され得る。例えば、アミノ酸の置換、欠失、または付加は、FR および / または CDR において施すことができる。FR における変化が通常、抗体の安定性および免疫原性を改善するように設計される一方、CDR における変化は、典型的には抗体のその標的に対する親和性を高めるように設計される。FR の変異体はまた、天然に存在する免疫グロブリンアロタイプを含む。かかる親和性を高める変化は、CDR を改変すること、および抗体のその標的に対する親和性を試験することを含む慣例的な技術によって経験的に決定され得る。例えば、保存的アミノ酸置換は、開示される CDR の任意の一つの範囲内で行うことができる。様々な改変が、Antibody Engineering , 2nd ed . , Oxford University Press , ed . Borrebaeck , 1995 に記載される方法に従って行うことができる。これらは、限定はされないが、配列内の機能的に等価なアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって改変され、ひいては「サイレント」変化をもたらすヌクレオチド配列を含む。例えば、非極性アミノ酸として、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸として、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが挙げられる。陽性荷電 (塩基性) アミノ酸として、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが挙げられる。陰性荷電 (酸性) アミノ酸として、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。この配列内のアミノ酸における置換は、アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る (表 1 を参照) 。さらに、このポリペプチドにおける任意の天然残基はまた、アラニンで置換され得る (例えば、MacLennan et al . (1998) Acta Physio . Scand . Suppl . 643 : 55 - 67 ; Sasaki et al . (1998) Adv . Biophys . 35 : 1 - 24 を参照) 。

20

30

40

【 0090 】

【表 17】

表1.

元の 残基	代表的な 置換	典型的な 置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4-ジアミノブタン酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

【0091】

本発明の抗体の誘導体および類似体は、組換え方法および合成方法 (Maniatis (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., および Bodansky et al. (1995) The Practice of Peptide Synthesis, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin, Germany) を含む当該技術分野で周知の様々な技術によって生成することができる。

30

【0092】

一実施形態では、本発明の V_H ドメインのアミノ酸配列変異体である V_H ドメインを作成するための方法は、本開示の V_H ドメインのアミノ酸配列における1つ以上のアミノ酸を付加するか、欠失させるか、置換するか、または挿入するステップ、任意選択的には、このようにして提供される V_H ドメインを1つ以上の V_L ドメインと組み合わせるステップ、 $P2 \times 4$ に対する特異的な結合について V_H ドメインまたは V_H / V_L の1つもしくは複数の組み合わせを試験するステップ、または / および任意選択的には、例えば本明細書に記載の電気生理学的アッセイを用いて、かかる抗原結合ドメインの $P2 \times 4$ 活性を調節する能力を試験するステップを含む。 V_L ドメインは、本発明のポリペプチドに対して同一であるかまたは実質的に同一であるアミノ酸配列を有し得る。

40

【0093】

本明細書中で開示される V_L ドメインの1つ以上の配列変異体が1つ以上の V_H ドメインと組み合わせられる場合での類似の方法を用いることができる。

【0094】

本開示のさらなる態様は、 $P2 \times 4$ と特異的に結合する抗原結合断片を調製する方法を

50

提供する。本方法は、

- (a) 置換されるべき C D R 3 を含むかまたは C D R 3 コード領域が欠如するかのいずれかの V_H ドメインをコードする核酸の開始レパートリーを提供するステップと；
 - (b) レパートリーを、 V_H C D R 3 (すなわち H 3) として本明細書中に実質的に示されるようなアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせ、ドナー核酸がレパートリーの C D R 3 領域内に挿入されることによって、 V_H ドメインをコードする核酸の生成物レパートリーを提供する、ステップと；
 - (c) 生成物レパートリーの核酸を発現させるステップと；
 - (d) P 2 X 4 に特異的な結合断片を選択するステップと；
 - (e) 特異的な結合断片またはそれをコードする核酸を回収するステップと、
- を含む。

10

【0095】

さらに、本発明の V_L C D R 3 (すなわち L 3) が、置換されるべき C D R 3 を含むかまたは C D R 3 コード領域が欠如するかのいずれかの V_L ドメインをコードする核酸のレパートリーと組み合わせられるような類似の方法を用いてもよい。ドナー核酸は、抗体番号 1 ~ 48 で実質的に示されるようなアミノ酸配列をコードする核酸から選択してもよい。

【0096】

本発明の C D R (例えば C D R 3) をコードする配列は、組換え DNA 技術を用いて、例えば、Marks ら (Bio / Technology (1992) 10 : 779 - 783) に記載される方法論を用いて、各々の C D R (例えば C D R 3) が欠如した可変ドメインのレパートリー内へ導入してもよい。特に、可変ドメイン領域の 5' 末端に向けたまたは隣接したコンセンサスプライマーを、ヒト V_H 遺伝子の第三のフレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーと併用することで、C D R 3 が欠如した V_H 可変ドメインのレパートリーを提供することができる。レパートリーは、特定の抗体の C D R 3 と組み合わせてもよい。類似の技術を用いて、C D R 3 由来の配列は、C D R 3 が欠如した V_H または V_L ドメインのレパートリーとシャッフルし、またシャッフルされた完全な V_H または V_L ドメインは、同族の V_H または V_L ドメインと組み合わせられて、本発明の P 2 X 4 特異抗体を作成することができる。次に、好適な抗原結合断片を選択できるように、レパートリーは、本明細書に記載されるまたは国際公開第 92 / 01047 号パンフレットに記載のようなファージディスプレイシステムなどの好適な宿主系において提示され得る。

20

30

【0097】

類似の混合またはコンビナトリアル技術もまた、Stemmer (Nature (1994) 370 : 389 - 391) によって開示されており、Stemmer は、 λ -ラクタマーゼ遺伝子に関する技術について記載しているが、同アプローチが抗体の作成に使用可能であることを認めている。

【0098】

さらなる実施形態では、1つ以上の選択される V_H および / または V_L 遺伝子のランダム突然変異誘発を用いて、本明細書で開示される配列由来の1つ以上の配列を有する新規な V_H または V_L 領域を作成してもよい。一つのかかる技術としてエラープロード PCR が、Gram ら (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1992) 89 : 3576 - 3580) によって記載されている。

40

【0099】

使用可能な別の方法が、 V_H または V_L 遺伝子の C D R に対して突然変異誘発を指示することである。かかる技術は、Barbas ら (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1994) 91 : 3809 - 3813) および Schier ら (J. Mol. Biol. (1996) 263 : 551 - 567) によって開示されている。

【0100】

同様に、1つ以上または3つすべての C D R は、 V_H または V_L ドメインのレパートリー内に挿入することができ、次にそれらは、P 2 X 4 に特異的な抗原結合断片についてスクリーニングされる。

50

【0101】

免疫グロブリン可変ドメインの一部分は、本明細書で実質的に示されるようなCDRのうちの少なくとも1つを含み、任意選択的には、本明細書で示されるようなscFv断片由来のフレームワーク領域に介在することになる。同部分は、FR1およびFR4のいずれかまたは双方の少なくとも約50%を含み得、この50%は、FR1のC末端の50%であり、またFR4のN末端の50%である。可変ドメインの実質的部分のN末端またはC末端での付加的な残基は、天然に存在する可変ドメイン領域に通常関連しない残基であり得る。例えば、組換えDNA技術による抗体の構築では、クローニングまたは他の操作工程を容易にするように、導入されるリンカーによってコードされるN末端またはC末端残基の導入がもたらされ得る。他の操作工程は、可変ドメインを、免疫グロブリン重鎖定常領域、他の可変ドメイン（例えば、二重特異性抗体の作成における）、または以下にさらに詳細に考察されるようなタンパク質性標識を含むさらなるタンパク質配列に連結するためのリンカーの導入を含む。

10

【0102】

実施例に例示される実施形態は、 V_H および V_L ドメインの「マッチング (matching)」対を含むが、当業者は、代替的な実施形態が、 V_L または V_H ドメインのいずれかに由来する単一のCDRのみを有する抗原結合断片を含み得ることを理解するであろう。特定の実施形態では、抗原結合断片は V_H (H3)のCDR3である。例えばP2X4に結合可能な2つのドメインに特異的な抗原結合断片を形成することが可能な相補性ドメインについてスクリーニングするため、一本鎖特異的結合ドメインのいずれか1つを用いることができる。スクリーニングは、国際公開第92/01047号パンフレットに開示されるいわゆる階層的二重コンビナトリアルアプローチを用いたファージディスプレイスクリーニング法によって達成され得、この場合、H鎖またはL鎖クローンのいずれかを有する個々のコロニーが、他鎖 (LまたはH) をコードするクローンの完全なライブラリーを感染させるために用いられ、結果的に得られる二本鎖特異的結合ドメインが、記載されるようなファージディスプレイ技術に従って選択される。

20

【0103】

本明細書に記載の抗P2X4抗体は、別の機能的分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質 (アルブミン、別の抗体など) に連結され得る。例えば同抗体は、化学的架橋または組換え方法によって連結され得る。

30

【0104】

開示される抗体はまた、天然パターンと異なるグリコシル化パターンを有するように改変してもよい。例えば、1つ以上の炭化水素部分を欠失させ、および/または1つ以上のグリコシル化部位を元の抗体に付加することができる。本開示の抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を当該分野で公知のグリコシル化部位コンセンサス配列を含むように改変することによって達成され得る。抗体上の炭化水素部分の数を増加させる別の手段は、抗体のアミノ酸残基へのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによるものである。かかる方法は、国際公開第87/05330号パンフレット、およびApplinet al. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 259-306に記載されている。抗体からの任意の炭化水素部分の除去は、例えば、Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 259: 52; およびEdge et al. (1981) Anal. Biochem., 118: 131、ならびにThotakura et al. (1987) Meth. Enzymol., 138: 350に記載のように、化学的にまたは酵素的に達成され得る。抗体はまた、検出可能な標識あるいは機能的な標識を用いてタグ化され得る。検出可能な標識は、 ^{131}I または ^{99}Tc などの放射性標識を含み、それはまた慣用的な化学を用いて抗体に付着され得る。検出可能な標識はまた、西洋ワサビペルオキシダーゼあるいはアルカリホスファターゼなどの酵素標識を含む。検出可能な標識は、ビオチンなどの化学的部分をさらに含み、特定の同族の検出可能な部分、例えば、標識化アビジンへの結合を介して検出され得る。

40

50

【0105】

典型的には、アミノ酸は、同様の荷電特性、疎水性特性、または立体化学的特性を有する関連したアミノ酸によって置換される。かかる置換であれば、当業者の通常技術の範囲内に含まれることになる。CDRの場合と異なり、FRにおいては、抗体の結合特性に悪影響を及ぼすことなく、さらなる実質的な変更を行うことができる。FRへの変更は、限定はされないが、非ヒト由来フレームワーク残基をヒト化すること、または抗原との接触または結合部位の安定化にとって重要である特定のフレームワーク残基を操作することを含み、例えば、定常領域のクラスまたはサブクラスを変更すること、Fcレセプター結合などのエフェクター機能を改変し得る特定のアミノ酸残基を変更すること（例えば、米国特許第5,624,821号明細書および米国特許第5,648,260号明細書、なら

10

【0106】

当業者は、上記の変更がすべてを網羅しているわけではなく、かつ多くの他の変更が本開示の教示の観点から当業者にとって明白となることを理解するであろう。

【0107】

核酸、クローニングおよび発現系

本開示は、開示される抗体のアミノ酸配列を提供する。当業者は、この情報が一旦提供されると、開示される抗体をコードする核酸分子を容易に得ることができる。核酸は、DNAまたはRNAを含んでもよく、また全体的または部分的に合成または組み換えであってもよい。ヌクレオチド配列への言及では、指定の配列を有するDNA分子が包含され、また指定の配列を有するRNA分子が包含され、ここでは、文脈上別に必要でない限りは、UはTに置換されている。

20

【0108】

本発明の核酸分子は、本明細書で開示されるCDR、V_Hドメイン、および/またはV_Lドメインに対するコード配列を含む。

【0109】

本開示はまた、本明細書で開示されるCDR、V_Hドメイン、および/またはV_Lドメインをコードする少なくとも1つの核酸分子を含むプラスミド、ベクター、ファージミド、転写または発現カセットの形態での構築物を提供する。

30

【0110】

本開示は、1つ以上の上記の構築物を含む宿主細胞をさらに提供する。

【0111】

また、任意のCDR(H1、H2、H3、L1、L2、またはL3)ドメイン、V_HまたはV_Lドメインをコードする核酸、およびコードされた生成物を作成する方法も提供される。本方法は、コード核酸からコードされた生成物を発現することを含む。発現は、核酸を含む組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することにより達成され得る。発現による生成後、V_HまたはV_Lドメイン、または特異的な結合メンバーは、任意の好適な手法を用いて単離し、および/または精製し、次いで必要に応じて用いることができる。

40

【0112】

抗原結合断片、V_Hおよび/またはV_Lドメイン、ならびにコード核酸分子およびベクターは、実質的に純粋または均一な形態で、それらの天然環境から単離および/または精製され得るか、あるいは核酸の場合、要求される機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の核酸または遺伝子源を含まないかまたは実質的に含まない。

【0113】

種々の異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングおよび発現用の系は、当該分野で周知である。抗体産生に適した細胞については、Gene Expression Systems, Academic Press, Fernandez et al., eds, 1999を参照のこと。つまり、好適な宿主細胞は、細菌、植物細胞、哺乳類

50

細胞、または酵母系およびバキュロウイルス系を含む。異種ポリペプチドの発現のために当該技術分野で利用可能な哺乳類細胞株として、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎細胞、NSOマウスミエロマ細胞、および多数の他の細胞が挙げられる。一般的な細菌宿主は、大腸菌(E. coli)である。開示された抗体を産生するのに、本発明に適合可能な任意のタンパク質発現系を用いることができる。好適な発現系は、Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999に記載のトランスジェニック動物を含む。

【0114】

適切なベクターは、適切な調節配列(プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアダニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、および必要に応じて他の配列を含む)を含むように選択され得るか、または構築され得る。ベクターは、プラスミドまたはウイルス、例えば必要に応じてファージまたはファージミドであり得る。さらなる詳細については、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと。例えば、核酸構築物の調製、突然変異誘発、配列決定、細胞へのDNAの導入および遺伝子発現、ならびにタンパク質の分析における核酸の操作のための多数の公知の技法およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, 2nd Edition, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992において詳述されている。

【0115】

本開示のさらなる態様は、本明細書に開示された核酸を含む宿主細胞を提供する。さらなる態様は、かかる核酸を宿主細胞へ導入するステップを含む方法を提供する。この導入では、任意の利用可能な技法を用いてもよい。真核細胞においては、好適な技法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-Dextran、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス(例えば、ワクシニア、または昆虫細胞におけるバキュロウイルス)を用いた形質導入を含み得る。細菌細胞においては、好適な技法は、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを用いたトランスフェクションを含み得る。核酸の細胞への導入に引き続き、例えば遺伝子の発現用の条件下で宿主細胞を培養することにより、核酸からの発現を引き起こすかまたは可能にし得る。

【0116】

使用方法

開示される抗P2X4抗体は、P2X4の電気生理学的活性を調節することが可能である。特に、本明細書に提供される抗体は、P2X4チャネルコンダクタンスを阻害または増強するために用いてもよい。かかる抗体は、哺乳動物、特にヒトにおけるP2X4に関連した医学的障害を処置するために用いることができる。特に、P2X4活性を阻害する抗体は、神経障害性疼痛の治療にとって有用である。P2X4活性を増強する抗体は、限定はされないが、ミクログリア媒介性疾患および障害ならびにマクロファージ媒介性疾患および障害を含む、他の治療方法において有用である。

【0117】

本発明の抗体はまた、P2X4またはP2X4発現細胞を単離するため、用いることができる。

【0118】

実施例で示されるように、P2X4と抗P2X4抗体との結合により、P2X4の生物学的活性がイオンのP2X4チャネルの通過を増強または低減することによって調節される。

【0119】

本発明の抗体または抗体組成物は、治療有効量で投与される。一般に、治療有効量は、

被験体の年齢、状態、および性別、ならびに被験体の医学的状態の重症度により異なる場合がある。適切な用量は、臨床的指標に基づいて、処置をする医師によって選択される。

【0120】

抗体は、ボラス用量として与えられ、投与後の最長期間にわたり、抗体の循環レベルを最大化し得る。持続注入もまた、ボラス投与後に用いてもよい。

【0121】

本発明の抗 P 2 X 4 抗体は、生物学的試料中の P 2 X 4 の存在を検出するため、用いてもよい。抗体を用いる検出方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、イムノプロット、ウエスタンプロット、免疫蛍光、および免疫沈降を含む。必要に応じて、抗 P 2 X 4 抗体は、例えばリガンド基（ビオチンなど）または検出可能なマーカー基（例えば、蛍光基、放射性同位元素または酵素など）で修飾される。必要に応じて、本発明の抗体は、従来の技術を用いて標識してもよい。好適な検出可能な標識として、例えば、フルオロフォア、発色団、放射性原子、高電子密度試薬、酵素、および特異的な結合パートナーを有するリガンドが挙げられる。酵素は、典型的にはそれらの活性によって検出される。例えば、西洋わさびペルオキシダーゼは、テトラメチルベンジジン（T M B）を青色色素に変換するその能力により検出可能であり、分光光度計を用いて定量化され得る。検出においては、好適な結合パートナーとして、限定はされないが、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、I g G およびプロテイン A、ならびに当該技術分野で公知の極めて多数の受容体 - リガンド結合が挙げられる。他の順列および可能性は、当業者に容易に理解されることになり、本発明の範囲内で均等物として考えられる。

10

20

【0122】

医薬組成物および投与方法

本開示は、抗 P 2 X 4 抗体（例えば抗体番号 1 ~ 4 8）を含む医薬組成物を提供する。かかる組成物は、薬学的使用および患者への投与にとって好適であり得る。組成物は、典型的には、1 つ以上の本発明の抗体および薬学的に許容できる賦形剤を含む。語句「薬学的に許容できる賦形剤」は、薬学的投与と適合できる、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。組成物はまた、補足された治療機能、追加された治療機能、または増強された治療機能を提供する他の活性化合物を含有してもよい。医薬組成物はまた、容器、バック、またはディスペンサー中に投与のための使用説明書と一緒に含めてもよい。

30

【0123】

本発明の薬学的組成物は、その意図された投与経路と適合できるように処方される。投与を実施するための方法は、当業者に公知である。投与は、例えば、静脈内、腹腔内、筋内、腔内（i n t r a c a v i t y）、皮下または経皮であってもよい。一実施形態では、神経障害性疼痛は、髄腔内投与によって治療される。局所的または経口的に投与可能である組成物、あるいは粘膜を通じた伝達が可能であり得る組成物を得ることもまた、可能であり得る。

【0124】

皮内または皮下適用のために用いられる溶液または懸濁液は、典型的には、以下の成分：注射用水などの滅菌希釈液、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤；および塩化ナトリウムまたはブドウ糖などの浸透圧を調節するための薬剤のうちの 1 つ以上を含む。p H は、酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムを用いて調節することができる。かかる調製物は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または複数回用量バイアルの中に封入してもよい。

40

【0125】

50

注射に適した医薬組成物は、滅菌水性溶液または分散物、および滅菌注射可能溶液および分散物の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与においては、好適な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL (BASF, Parsippany, N. J.) またはリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を含む。あらゆる場合で、組成物は、無菌でなければならず、容易なシリンガビリティ (syringability) が存在する程度に流体であるべきである。それは、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に備えて保存されなければならない。微生物の作用の阻害は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。多くの場合で、組成物中に等張剤、例えば、糖；ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、および塩化ナトリウムを含むことが好ましいことになる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）を含有する溶媒または分散媒、ならびにそれらの好適な混合液であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、分散の場合において必要とされる粒径の維持により、および/または界面活性剤の使用により、維持され得る。注射可能組成物の延長された吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによって引き起こすことができる。

10

【0126】

経口組成物は、一般に、不活性希釈液または食用担体を含む。それらは、ゼラチンカプセル中に封入され得るかまたは錠剤に圧縮され得る。経口投与においては、抗体は、賦形剤と組み合わせ、また錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で用いることができる。薬学的に適合できる結合剤、および/またはアジュバント材料は、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分；結合剤（例えば、微結晶性セルロース、ガムトラガカントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、プリモゲル (Primogel)、またはコーンスターチ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはステロテス (Sterotes)）；流動促進剤（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカロース）；または矯味矯臭剤（例えば、ペッパーミント、メチルサリチレート、またはオレンジ香料）、あるいは類似する性質の化合物のいずれかを含有し得る。

20

30

【0127】

全身投与はまた、経粘膜的手段または経皮的手段によって行うことができる。経粘膜または経皮投与においては、浸透されるバリアに適切な浸透剤がこの処方で用いられる。かかる浸透剤は、一般に当該技術分野で公知であり、例えば、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、例えば、口内剤、鼻スプレー、吸入器、または坐剤の使用を通じて達成され得る。例えば、Fc部分を含む抗体の場合、組成物は、腸、口、または肺において粘膜を通じた伝達が可能であり得る（例えば、米国特許第6,030,613号明細書に記載の通り、FcRn受容体媒介経路を介するもの）。経皮投与においては、活性化合物は、一般に当該技術分野で公知のように、軟剤、軟膏、ゲル、またはクリーム中に処方され得る。吸入による投与においては、抗体は、加圧された容器またはディスペンサー（好適な噴霧剤、例えば二酸化炭素などのガスを含む）、または噴霧器からエアロゾルスプレーの形態で送達され得る。

40

【0128】

特定の実施形態では、本開示の抗体は、化合物を身体からの迅速な排除に対して保護することになる担体、例えば植込錠およびマイクロカプセル化送達系を含む徐放性製剤を用いて調製される。生分解性ポリマー、生体適合性ポリマー、例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を用いることができる。かかる製剤を調製するための方法は、当業者にとって明らかであろう。本開示の抗体を含有するリボソーム懸濁液もまた、薬学的に許容できる担体と

50

して用いることができる。これらは、例えば米国特許第 4, 522, 811 号明細書に記載のように、当業者に公知の方法に従って調製することができる。

【0129】

経口または非経口組成物を用量単位形態で処方することは、投与の簡略化および用量の均一性にとって有利であり得る。用語「用量単位形態」は、本明細書で用いられるとき、処置される被験体に対する単位用量として適する物理的に別かれた単位を指し、各単位は、必要とされる医薬担体に関連して所望される治療効果をもたらすように計算された所定量の活性化化合物を含有する。

【0130】

本発明の組成物の毒性および治療有効性は、例えば LD_{50} （集団の 50% に対する致死量）および ED_{50} （集団の 50% における治療有効用量）を決定する場合、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順により決定され得る。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、 LD_{50} / ED_{50} 比として表され得る。大きい治療指数を示す組成物が好ましい。

【0131】

電気生理学的実験および動物試験から得られたデータは、ヒトで用いられる用量範囲を処方する際に用いることができる。用量は、 IC_{50} （すなわち、症状の半最大阻害を得る抗体濃度）を含む循環血漿濃度範囲を得るため、動物モデルにおいて処方され得る。血漿における循環レベルは、例えば高性能液体クロマトグラフィーにより測定され得る。任意の特定用量の効果は、好適なバイオアッセイにより監視され得る。用量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性のない循環濃度の範囲内である。用量は、用いられる投薬形態および用いられる投与経路に応じて変化し得る。

【0132】

キット

本発明は、P2X4 活性を調節するためのキットを提供する。P2X4 活性を増強する抗体は、本明細書に記載される通りの低下した P2X4 活性によって媒介される徴候の治療において有用である。P2X4 活性を阻害する抗体は、神経障害性疼痛ならびに / またはミクログリア媒介性疾患および障害ならびに / またはマクロファージ媒介性疾患および障害の治療または予防にとって有用である。一実施形態では、キットは、単位剤形で P2X4 活性を調節する有効量の抗 P2X4 抗体を含有する治療または予防組成物を含む。

【0133】

一の実施形態では、キットは、治療的または予防的細胞組成物を含有する滅菌容器を含み；かかる容器は、ボックス、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、ポーチ、プリスターパック、または当該技術分野で公知の他の好適な容器形態であり得る。かかる容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔、または薬剤保持に適した他の材料で作られ得る。

【0134】

必要に応じて、本発明の抗体は、神経障害性疼痛を有するかまたは発症するリスクがある被験体に抗体または薬剤を投与するための使用説明書とともに提供される。使用説明書は、一般に、かかる徴候の治療または予防のための組成物の使用についての情報を含むことになる。他の実施形態では、使用説明書は、治療薬の説明；免疫不全またはその症状の治療または予防のための投与計画および投与；注意事項；警告；効能；禁忌；過量投与情報；有害反応；動物薬理学；臨床試験；および / または参考文献のうちの少なくとも 1 つを含む。使用説明書は、容器（存在する場合）上に直接印刷されるか、または容器に貼付されたラベルとして、または容器内にまたは容器とともに供給される別のシート、パンフレット、カード、もしくは折り畳み印刷物として印刷される場合がある。

【0135】

本発明の実施には、別段の指示がない限り、当業者の技能の範囲内に十分に含まれる、（組換え技術を含む）分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学に関する従来技術が用いられる。かかる技術は、文献、例えば、「Molecular Clon

10

20

30

40

50

ing: A Laboratory Manual」, second edition (Sambrook, 1989); 「Oligonucleotide Synthesis」 (Gait, 1984); 「Animal Cell Culture」 (Freshney, 1987); 「Methods in Enzymology」 「Handbook of Experimental Immunology」 (Weir, 1996); 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」 (Miller and Calos, 1987); 「Current Protocols in Molecular Biology」 (Ausubel, 1987); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis, 1994); 「Current Protocols in Immunology」 (Coligan, 1991) に十分に解説されている。これらの技術は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの生成に適用可能であり、それ故、本発明を作成し、実施する場合に検討してもよい。特定の実施形態において特に有用な技術は、以下に続くセクションで考察されることになる。

【0136】

以下の実施例は、本発明のアッセイ、スクリーニング、および治療方法における抗 P 2 X 4 抗体をいかに作成し、使用するかについての完全な開示および説明を当業者に提供するために提示され、発明者が彼らの発明とみなすものの範囲を限定することは意図されていない。

【実施例】

【0137】

実施例 1：組換え P 2 X 4 タンパク質の生成および単離

ヒト P 2 X プリン受容体 4 (Q 9 9 5 7 1)、位置 2 4 2 で S から G の突然変異を有するヒト P 2 X プリン受容体 4 の天然変異体 (変異体 r s 2 5 6 4 4 に対応) およびマウス P 2 X プリン受容体 4 (Q 9 J J X 6) タンパク質を、C 末端 A V I タグ (結合活性 L L C) および C 末端ヒスチジンタグを用いて設計した。構築物を p F A S T B A C 1 ベクター (Life Technologies) にクローン化した。バクミドを D H 1 0 B a c (Life Technologies) 大腸菌 (E. Coli) 細胞内で作成した。その後、組換えバキュロウイルス粒子を生成するため、バクミドを、S f 9 昆虫細胞 (Life Technologies 製のツマジロクサヨトウ (Spodoptera frugiperda) S f 9 細胞、カタログ番号 1 1 4 9 6 - 0 1 5) にトランスフェクトし、次いでタンパク質発現を意図して S f 9 細胞を感染させるために用いた。

【0138】

発現パラメータを、Backmarkらによって記載された改良型蛍光検出サイズ排除クロマトグラフィー (FSEC) 法 (Protein Sci. 22 (2013) 1124 - 1132) を用いて、発現レベル、タンパク質品質および受容体の均一性を監視することによって評価した。この方法は、Kawate および Gouaux によって記載された (Structure 14 (2006) 673 - 681) 通りの基本的な FSEC の概念と類似するが、タンパク質上のヒスチジンタグと特異的に相互作用する蛍光プローブを適用した。細胞は、典型的には、S F 9 0 0 I I 培地中、 1.0×10^6 個 / mL の密度で接種した。細胞は、 2×10^6 個の細胞 / mL の細胞密度、2 の感染多重度で感染を受けた。タンパク質発現は 27 で実施し、細胞は感染から 72 時間後に採取した。発現パラメータは、三量体の量を増加させ、三量体として存在するタンパク質の均一性を高めるように選択した。蛍光サイズ排除クロマトグラフィーによるアッセイによると、タンパク質調製物は 50 ~ 75 % の三量体を含有する。受容体の総量が感染後の時間経過とともに増加したが、FSEC 分析によると、発現時間が 72 時間を経過すると、タンパク質の品質が低下することが示された。

【0139】

ヒト P 2 X 4 受容体およびマウス P 2 X 4 を次のように精製した。膜を S F 9 細胞から調製した。膜タンパク質を、界面活性剤、塩、緩衝液および添加剤の組み合わせ、例えば

、n - ドデシル - D - マルトシド CAS 69227 - 93 - 6 (0 ~ 2 % (w / v))、n - ドデシルチオ - マルトシド CAS 148565 - 58 - 6 (0 ~ 1 % (w / v))、(3 - [(3 - コールアミドプロピル) - ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホン酸 / N , N - ジメチル - 3 - スルホ - N - [3 - [[3 , 5 , 7 , 12) - 3 , 7 , 12 - トリヒドロキシ - 24 - オキソコラン - 24 - イル] アミノ] プロピル] - 1 - プロパンアミニウムヒドロキシド、略記 CHAPS CAS 75621 - 03 - 3 (0 ~ 0 . 6 % (w / v))、およびコレステリルヘミスクシネート CAS 102601 - 49 - 0 (0 ~ 0 . 12 % (w / v))を用いる界面活性剤可溶化により、膜から抽出した。理論に固定されない限り、より高濃度の指示物質ならびに他の界面活性剤は、タンパク質の膜からの抽出を支持する。タンパク質は、標準の親和性およびサイズ排除クロマトグラフィー精製を受けた。精製したタンパク質を、50 mM トリス - HCl pH 8 . 0、600 mM NaCl、10 % (v / v) グリセロール、0 . 025 (w / v) % n - ドデシル - D - マルトシド CAS 69227 - 93 - 6、0 . 0125 % (w / v)、n - ドデシルチオ - マルトシド CAS 148565 - 58 - 6、0 . 0075 % (w / v) (3 - [(3 - コールアミドプロピル) - ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホン酸 / N , N - ジメチル - 3 - スルホ - N - [3 - [[3 , 5 , 7 , 12) - 3 , 7 , 12 - トリヒドロキシ - 24 - オキソコラン - 24 - イル] アミノ] プロピル] - 1 - プロパンアミニウムヒドロキシド、略記 CHAPS CAS 75621 - 03 - 3、および 0 . 0015 % (w / v) コレステリルヘミスクシネート CAS 102601 - 49 - 0 を含有する緩衝液中で配合した。

10

20

【 0140 】

精製したタンパク質を、リン酸塩緩衝液およびヘプス緩衝液 2 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - 1 - イル] エタンスルホン酸緩衝液 CAS 7365 - 45 - 9 を含む代替条件下で配合した。様々な緩衝液の pH は、7 . 0 ~ 8 . 0 の範囲であった。塩 (NaCl) は 120 ~ 600 mM の間で変化していた。グリセロールは、タンパク質配合物から抽出することができる。様々な界面活性剤を、タンパク質配合物、例えばラウリルマルトースネオペンチルグリコール 2 , 2 - ジデシルプロパン - 1 , 3 - ビス - D - マルトピラノシド、デシルマルトースネオペンチルグリコール 2 , 2 - ジオクチルプロパン - 1 , 3 - ビス - D - マルトピラノシド、オクチルマルトースネオペンチルグリコール 2 , 2 - ジヘキシルプロパン - 1 , 3 - ビス - D - マルトピラノシド、CYM AL - 55 - シクロヘキシル - 1 - ペンチル - D - マルトシド CAS 250692 - 65 - 0、n - テトラデシルホスホコリン 77733 - 28 - 9、n - デシル - D - マルトピラノシド CAS 82494 - 09 - 5、n - オクチル - D - グルコシド CAS 29836 - 26 - 8 および n - ノニル - D - グルコシド CAS 69984 - 73 - 2 の中で用いている。他の界面活性剤中の配合物もまた考えられる。コレステリルヘミスクシネート CAS 102601 - 49 - 0 の濃度は変化させることができ、加えてタンパク質配合物から除外することができる。

30

【 0141 】

実施例 2 : 三量体 P2X4 複合体の精製

インビボで P2X 受容体は機能的な三量体イオンチャネルを形成する。可溶化および精製 P2X4 タンパク質は、典型的には、単量体、二量体、三量体、および六量体 (すなわち三量体の二量体) を含むオリゴマー状態の範囲内で存在する。オリゴマー状態のこの範囲は、例えば参考文献 (Backmark et al . , Protein Sci . 22 (2013) 1124 - 1132 ; Kawate et al . , Structure 14 (2006) 673 - 681 ; Kawate et al . , Nature 460 (2009) 592 - 598 ; Nakazawa et al . , European Journal of Pharmacology 518 (2005) 107 - 110 ; Nicke et al . , Mol . Pharmacol . 63 (2003) 243 - 252) によって記載がなされている。主に三量体の安定な配置を得るため、可溶化条件を調節した。

40

50

【0142】

界面活性剤、添加剤、緩衝液およびpHの組み合わせは変化させた。より大規模なオリゴマー配置および凝集体を低減しつつも三量体のFSECでの痕跡を高めるように最適な条件を選択した。かかる望ましくない形態は、適用されるサイズ排除カラムのボイドボリュームで溶出された。試験した条件は、KPO₄-HCl pH7.4、600mM NaClおよび2% (w/v) n-ドデシル-β-D-マルトピラノシドCAS69227-93-6を含んだ。n-ドデシル-β-D-マルトシドCAS69227-93-6、n-ドデシルチオ-マルトシドCAS148565-58-6、(3-[(3-コールアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸/N,N-ジメチル-3-スルホ-N-[3-[[3,5,7,12)-3,7,12-トリヒドロキシ-24-オキソコラン-24-イル]アミノ]プロピル]-1-プロパンアミニウムヒドロキシド、略記CHAPS CAS75621-03-3を含む界面活性剤と添加剤のコレステリルヘミスクシネートCAS102601-49-0との組み合わせを含有する緩衝液中で最適な可溶化が得られた。精製したタンパク質は、50mMトリス-HCl pH8.0、600mM NaCl、10% (v/v) グリセロール、0.025 (w/v) % n-ドデシル-β-D-マルトシドCAS69227-93-6、0.0125% (w/v)、n-ドデシルチオ-マルトシドCAS148565-58-6、0.0075% (w/v) (3-[(3-コールアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸/N,N-ジメチル-3-スルホ-N-[3-[[3,5,7,12)-3,7,12-トリヒドロキシ-24-オキソコラン-24-イル]アミノ]プロピル]-1-プロパンアミニウムヒドロキシド、略記CHAPS CAS75621-03-3、および0.0015% (w/v) コレステリルヘミスクシネートCAS102601-49-0を含有する緩衝液中で配合した。

10

20

【0143】

実施例3：抗P2X₄特異抗体をファージディスプレイ選択を用いて単離した

ナイーブヒト一本鎖Fv (scFv) ファージディスプレイライブラリーを、系状ファージM13に基づくファージミドベクターにクローン化し、選択用に用いた (Lloyd (2009) Protein Eng Des Sel 22, 159-168; Vaughan et al., Nature biotechnology 14, 309-314, 1996)。抗P2X₄特異抗体は、本質的にVaughanら (Vaughan et al., 上記) によって先行的に記載される通り、組換えヒトP2X₄ (huP2X₄) に対する一連の選択サイクルを用いて、ファージディスプレイライブラリーから単離した。つまり、PBS (ダルベッコのPBS、pH7.4) 中のヒトP2X₄ を、MaxiSorp (登録商標) マイクロタイタープレート (Nunc) のウェル上に4で一晩固定化した。ウェルをPBSで洗浄し、次にPBS-Marvel乾燥スキムミルク (3% w/v) で1時間ブロッキングした。PBS-Marvel (3% w/v) 中の精製したファージをウェルに添加し、コーティングした抗原に室温で1時間結合させておいた。未結合のファージを、PBSを用いた一連の洗浄サイクルによって除去した。結合したファージ粒子は、37で30分間、トリプシンで溶出させ、大腸菌 (E. coli) TG1細菌に感染させ、次の選択ラウンドのために救済した。あるいは、抗P2X₄ 抗体は、C末端ペプチドhuP2X₄₃₇₀₋₃₈₈ (Alomone Labs # APR-002) に対する精製ファージライブラリーの除外を除いて上記のように単離するか、またはビーズによるフェニル疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) を、抗原を用いた選択の前に行った。

30

40

【0144】

実施例4：ハイブリドーマ技術を用いてのラット抗マウスP2X₄抗体の作成

免疫

精製した組換えマウスP2X₄タンパク質およびマウスP2X₄トランスフェクトHEK293F細胞を、3つの群でスプラーグドローラットを免疫するために用いた。グループ1では、ラットをマウスP2X₄タンパク質で免疫し、グループ2では、ラットをマ

50

ウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞で免疫し、またグループ3では、ラットをマウスP2X4タンパク質およびマウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞で交互に免疫した。

【0145】

0日目のプライミング免疫、次いで7、15、22および24日目の後続する4回の追加免疫を伴う28日の免疫プロトコルを用いた。グループ1においては、等量の完全フロイントアジュバントおよびマウスP2X4タンパク質（総タンパク質：100 μ g）を共に乳化し、ラットの2側に皮下送達した（200 μ L / 部位）。後続する3回の追加免疫注射においては、同量のタンパク質を用いて、フロイント不完全アジュバント中で乳化した。グループ2においては、マウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞を、 5×10^7 個の細胞/mLでPBSに再懸濁し、等量の完全フロイントアジュバントで乳化した。上記の通り、細胞をラットの2側に注射した（200 μ L / 部位）。後続する3回の追加免疫注射においては、同数の細胞を用いて、フロイント不完全アジュバント中で乳化した。グループ3においては、プライミング免疫では、上記のグループ1のようにマウスP2X4タンパク質、その後の3回の追加免疫では、マウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞、マウスP2X4タンパク質、およびマウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞を用いた。

10

【0146】

最終追加免疫は24日目に腹腔内に施し、グループ1およびグループ3のラットは、マウスP2X4タンパク質（トリス緩衝液中50 μ g/mLで400 μ L）を受け、またグループ2のラットは、マウストランスフェクトHEK293F細胞（ 5×10^7 / mLで400 μ L）を受けた。

20

【0147】

尾静脈出血が、免疫前、初回免疫後13日目、および2回目免疫後20日目にラットから得られた。抗マウスP2X4に対するIgG力価を、細胞に基づくDELFA（解離増強ランタニド蛍光免疫測定法）アッセイにより測定した。

【0148】

細胞に基づくDELFAを用いてのマウスP2X4に対するラット免疫応答の評価

血清中のマウスP2X4に対するIgG力価を、mP2X4トランスフェクトHEK293Fおよび親HEK細胞の双方を用いて、細胞に基づくDELFAにより測定した。血清中の抗HEK293F細胞特異抗体を低下させるため、アッセイ前に細胞単独または交互タンパク質のいずれかおよび細胞による方法で免疫したラット由来の血清試料を、非トランスフェクトHEK293F細胞とともにインキュベートした。タンパク質で免疫したラット由来の血清は、この予備吸着ステップなしにアッセイした。

30

【0149】

マウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞および親HEK細胞を、ブラックコラーゲンでコーティングした96ウェルマイクロタイタープレート上の培地に30,000細胞/ウェルの密度で蒔いた。5%CO₂インキュベーター内、37℃で一晩インキュベーション後、培養上清を除去し、細胞を50 μ L/ウェルでの3.7%ホルムアルデヒド溶液で固定した。その後のすべてのインキュベーションは室温で実施した。5分間固定後、ホルムアルデヒド溶液を廃棄し、200 μ Lの3%marvel/PBSブロッキング緩衝液と交換した。1時間後、ブロッキング緩衝液を除去し、血清試料を3倍希釈系列（50 μ L/ウェルで1:200希釈から開始）で添加した。1時間インキュベートした後、ウェルを0.05%（v/v）ツイーン20を添加したPBSで緩やかに3回洗浄した。次に、ビオチン化ポリクローナルヤギ抗ラットIgG Fc に特異的な二次抗体（marvel/PBSで1:500に希釈）を50 μ L/ウェルで添加した。さらに上記のように1時間のインキュベーションと3回の緩やかな洗浄の後、Eu-N1標識ストレプトアビジン（Perkin Elmer）をウェルに添加した（marvel/PBSで100ng/mLに希釈、50 μ L/ウェル）。30分のインキュベーション時間後、ウェルを緩やかに5回洗浄し、DELFA増強溶液を添加した。反応を10分間発生

40

50

させておき、次にプレートにPerkinElmer EnVision 2103多重標識プレートリーダーを用いて読み取った。各ウェルにおけるTRF（時間分解蛍光）シグナルを測定した（励起340nm、放射615nm）。

【0150】

マウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞および親HEK293F細胞における血清適定曲線をプロットし、各々の曲線下面積（AUC）を算出した。マウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞で免疫したラットにおいては、マウスP2X4トランスフェクト細胞におけるAUC値から親HEK細胞からのAUC値を差し引くことにより、特異的なmP2X4 IgG力価が得られた。

【0151】

モノクローナルラットIgGの単離

最終追加免疫後4日目、リンパ節を無菌採取し、細胞を機械的破壊によって単離し、計数した。これらの細胞をSP2/0骨髓腫細胞と混合し、電気融合装置を用いて融合した。得られた融合物をメチルセルロースに基づく半固形培地と混合し、OmniTrayプレートに蒔いた。半固形培地は、CloneMatrixおよびDMEMを含み、20% FCS、10% BM Condimed H1、1mMピルビン酸ナトリウムおよびOP I培地添加物、2%ヒポキサンチンアザセリンおよびFITC結合型ヤギ抗ラットIgGを添加した。半固形培地中の細胞は、5% CO₂インキュベーター内、37℃で13日間培養した。このインキュベーション期間中、クローンコロニーが単一の前駆ハイブリドーマ細胞から形成される。これらのコロニーは、半固形培地中に存在するFITC結合型抗IgGによりコロニー近傍で捕捉されるIgGを分泌する。結果的に生じる免疫複合体の形成は、ClonePix FLコロニーピッカー（Molecular Devices）によって可視化されるとき、蛍光「ハロー」として細胞周囲で認めることができる。次に、これらのハローを伴うコロニーを96ウェルマイクロタイタープレートに採取する。

【0152】

培養液中で3～5日後、採取したコロニーの上清を回収し、細胞に基づく蛍光微量アッセイ技術（FMAT）でのアッセイによってマウスP2X4トランスフェクトHEK293F細胞および親HEK293F細胞への結合を比較することにより、マウスP2X4の特異性についてスクリーニングした。

【0153】

ラットIgGのDNA配列決定

メッセンジャーRNA（mRNA）を細胞から磁気オリゴ（dT）粒子を用いて抽出し、cDNAに変換した。ポリCおよび定常領域V_H/V_Lプライマーを用いてPCR増幅を実施した。

【0154】

ラットIgGの精製

精製前、どのクローンがラットIgG2aを分泌したかを判定するため、ハイブリドーマを、ヤギ抗ラットIgG2aでコーティングしたマイクロタイタープレートを用いるELISAによって試験した。というのは、このアイソタイプがラットIgG1、IgG2bおよびIgG2cアイソタイプに対する異なる精製マトリックスを用いて精製されるためである。

【0155】

細胞は、24ウェルプレート内で増殖し、HyperZeroおよびグルタミンを添加した血清フリーHL-1培地中で過成長した。10日後、上清を96ウェルマスターブロックに移し、ラットIgG1、IgG2bおよびIgG2cアイソタイプを、ProPlus樹脂（Phynexus）を含有する20μLのPhytips上で精製した。ラットIgG2a抗体は、Perkin Elmer Minitrackを用いて、CaptureSelect IgG-Fc多種樹脂（Lift Technologies）を含有するカスタムパックのPhytips上で精製した。捕捉されたラットIgGを、

10

20

30

40

50

75 μ L の 100 mM ヘース、140 mM NaCl pH 3.0 で溶出させ、次に等体積の 200 mM ヘース pH 8.0 で中和させた。精製した IgG を、UV-Star 384 ウェルプレート内で 280 nm での吸光度読み取りを用いて定量化した。

【0156】

ラット IgG からヒト IgG1 への再フォーマット化

以下の改良を伴うが本質的に Persic et al., 1997 (Gene 187, 9-18) に記載のように、ラット V_H および V_L ドメインならびにヒト IgG1 定常ドメインを発現するキメラ構築物を作成するため、ラットハイブリドーマ IgG クローンを分子的に再フォーマットした。CHO- α 過性細胞での使用を促進し、またエピソーム複製を可能にするため、OriP 断片を発現ベクター内に含めた。哺乳類細胞内で全 IgG1 重鎖を発現させるため、 V_H ドメインを、ヒト重鎖定常ドメインおよび調節エレメントを有するベクター (pEU1.4) にクローン化した。この定常領域は、エフェクターヌルヒト IgG1 を生じる三重変異 (TM) L234F / L235E / P331S を有した (Oganesyan et al., (2008) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64, 700-704)。同様に、哺乳類細胞内で全 IgG 軽鎖を発現させるため、 V_L ドメインを、ヒト軽鎖 () 定常ドメインおよび調節エレメントの発現用のベクター (pEU4.4) にクローン化した。IgG を得るため、重鎖および軽鎖 IgG 発現ベクターを CHO- α 過性哺乳類細胞にトランスフェクトした。IgG は培地中に発現され、分泌された。回収物を精製前に濾過し、次に IgG をプロテイン A クロマトグラフィーを用いて精製した。培養上清を、適切なサイズの Ceramic Protein A (Pall 20078-036) のカラム上に負荷し、50 mM トリス-HCl pH 8.0、250 mM NaCl で洗浄した。結合 IgG を、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 3.0) を用いてカラムから溶出させ、トリス-HCl (pH 9.0) の添加によって中和させた。溶出材料に対して、Nap10 カラム (GE Lifesciences 17-0854-02) を用いて緩衝液を PBS に交換し、IgG の濃度を、IgG のアミノ酸配列に基づき、吸光係数を用いて分光光度的に測定した (Pace et al., (1995) Protein Sci. 4, 2411-23)。精製 IgG を、SDS-PAGE を用いて純度について分析した。

【0157】

実施例 5：ファージディスプレイ選択からのヒト P2X4 結合抗体の同定

実施例 3 に記載のファージディスプレイ法から同定した scFv 抗体を、細菌中で発現させ、(scFv を含有する) 未精製細菌ペリプラズム抽出物としてスクリーニングし、0.2 M ヘース緩衝液 pH 7.4、0.5 mM EDTA および 0.5 M スクロースで調製した。あるいは、重鎖および軽鎖可変領域を PCR により増幅し、HEK293F 細胞においてヒト IgG1 抗体としての発現用ベクターにクローン化した。

【0158】

細菌 scFv 試料のスクリーニングのため、5 μ l の細菌抽出物を 384 ウェルアッセイプレート (Corning 3655) に添加した。アッセイ緩衝液を、1x ハンクス平衡塩溶液 (HBSS) (Sigma H8264)、0.1% (v/v) BSA (PAA K05-013)、20 mM ヘース (Gibco 15630) および 1 U/ml のアピラーゼ (Sigma A6535) として調製し、細菌 scFv 抽出物を有するアッセイプレートに 5 μ l を添加した。抗-myc 検出試薬 (Serotec MCA2200) および抗マウス DyLight 649 (Jackson Immuno Research Labs 115-495-071) を各々、同じ溶液中、15.6 nM および 24 nM にアッセイ緩衝液で希釈し、scFv 試料を有するアッセイプレートに 5 μ l を添加した。ヒト P2X4 (huP2X4) (Q99571、ENSP00000336607) を発現する HEK293F 細胞を、アッセイ緩衝液で 2.6×10^5 個の細胞/ml に希釈し、15 μ l をアッセイプレートに添加した。同時に、scFv 試料の、huP2X4 を発現しない HEK293F 細胞への結合についても試験した。

【0159】

HEK293Fに発現されるIgG試料のスクリーニングのため、2.5μlの細胞培養上清を384ウェルアッセイプレート(Corning3655)に添加した。アッセイ緩衝液を上記のように調製し、IgG試料を有するアッセイプレートに7.5μlを添加した。抗ヒトAlexaFluor647(Life Technologies A21445)を6nMにアッセイ緩衝液で希釈し、IgG試料を有するアッセイプレートに10μlを添加した。huP2X4(Q99571、ENSP00000336607)を発現するHEK293F細胞を、アッセイ緩衝液で 4×10^5 個の細胞/mlに希釈し、10μlをアッセイプレートに添加した。同時に、IgG試料の、huP2X4を発現しないHEK293F細胞への結合性についても試験した。両タイプの試料をスクリーニングするためにセットアップしたアッセイプレートを、Topsellプレートシーラー(Perkin Elmer 6005250)で密封し、マイクロウェルの底に定着したビーズまたは細胞に局在化した蛍光を検出する蛍光に基づくプラットフォームである蛍光微量アッセイ技術(FMAT)で読み取る前の少なくとも4時間、室温でインキュベートした(Dietz et al., Cytometry 23:177-186(1996)、Miraglia et al., J. Biomol. Screening 4:193-204(1999))。FMAT分析ソフトウェアを用いてデータを分析し、蛍光として0~10,000のFL1カウント、典型的には0.15~0.40の色および10~60のサイズに基づいて事象をゲーティングした。各ウェルについてデータを報告する前に、20事象の最小カウントを閾値として設定した。対照HEK293F細胞ではなく、HEK293F huP2X4細胞への結合性を示すScFvを、FL1カウントがhuP2X4細胞に対して1000を超えるか否かをさらに試験するために選択し、200を超えるFL1カウントの特異的なhuP2X4結合シグナルを示すIgG試料をヒットとして同定し、さらに特徴づけた。

10

20

30

40

50

【0160】

未精製試料としてHEK293F huP2X4細胞に特異的な結合シグナルを示すScFvまたはIgG試料に対して、DNA配列決定を施した(Vaughan et al. 上記, Nature Biotechnology 14:309-314)、(Osbourne 1996; Immunotechnology. 2, 181-196)。固有のscFvを細菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した(Bannister et al.(2006) Biotechnology and bioengineering, 94.931-937に記載の通り)。ヒトP2X4への結合性が確認されたそれらscFvは、実施例4に記載のように、完全IgGとして作成し、発現させ、精製した。精製したIgG抗体は、電気生理学的アッセイにおける機能的活性について、またマウスおよびカニクイザルP2X4を発現する細胞への結合性について、精製したIgG試料の適定を用いた以外は、上記のヒトP2X4細胞について説明したのと同じ方法を用いて試験した。電気生理学的アッセイの結果を図3および図4に提供する。

【0161】

実施例6：マウスP2X4に特異的に結合するハイブリドーマIgGの同定

mP2X4への特異的結合を有するIgGを同定するため、免疫から作成した上清をスクリーニングした。つまり、上清は、アッセイ緩衝液(HBSS、0.1%(v/v)BSA、20mMヘプスおよび1U/mlのアピラーゼ)に10倍希釈し、5μlをアッセイプレートに添加した。AlexaFluor647(Jackson Immuno Research labs)で標識した抗ラット検出抗体を6nMに希釈し、10μlをアッセイプレートに添加した。mP2X4を発現するHEK293F細胞を 2.6×10^5 /mlに希釈し、15μlをアッセイプレートに添加した。同時に、IgG試料の非特異的結合性についても、試料のHEK293F細胞への結合について試験することによって試験した。mP2X4への特異的結合およびHEK293F細胞への非結合を示すIgGをヒットとして同定し、電気生理学による抗体精製および分析用に選択した。電気生理学的スクリーニングの結果を、前述と同じアッセイを用いた、ヒトおよびカニクイ

ザル P 2 X 4 を発現する細胞株に対するこれらの試料における結合結果とともに、図 7 に提供する。

【 0 1 6 2 】

実施例 7：ヒト P 2 X 4 変異体の作成および H E K 2 9 3 F 細胞における一過性トランスフェクションによる発現

P 2 X 4 機能的抗体が結合するエピトープを判定するため、ヒト P 2 X 4 において、以下の突然変異、すなわち E 9 5 Q、V 1 0 5 M、G 1 1 4 D、A 1 2 2 V、S 1 3 1 N、A 1 5 1 P、G 1 5 4 R、L 3 0 3 P、N 3 0 6 K を作成した。これらの改変を伴う h u P 2 X 4 配列を有する D N A ベクターを、標準の分子生物学技術を用いて作成した。D N A ベクターは、2 9 3 - f e c t i n (L i f e T e c h n o l o g i e s 1 2 3 4 7 0 1 9) を用いて製造業者のガイドラインに従い、H E K 2 9 3 F 細胞にトランスフェクトした。h u P 2 X 4 変異体を発現する細胞は、抗ヒト A l e x a F l u o r 6 4 7 (L i f e T e c h n o l o g i e s A 2 1 4 4 5) 検出試薬とともに、抗体番号 1、1 1、2 9、および 3 3 とともにインキュベートした。結合は、F M A T プレートリーダーを用いて測定した。変異体 S 1 3 1 N は、抗体番号 1 1、2 9、および 3 3 の結合によって重要であることが示された。図 1 A ~ 1 D は、F M A T アッセイの結果を示し、ヒト P 2 X 4 の変異体を発現する H E K 2 9 3 F 細胞への P 2 X 4 抗体の結合を特徴づけている。

10

【 0 1 6 3 】

実施例 8：P 2 X 4 に対するモノクローナル抗体の電気生理学的特徴づけ

20

ファージディスプレイ由来 m A b における方法：図 3 および図 4

ヒト P 2 X 4、マウス P 2 X 4 またはカニクイザル P 2 X 4 を安定に発現する H E K 2 9 3 F 細胞を、アキュターゼを用いて 5 0 % の培養密度で採取した。次に細胞を、 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞 / m l の密度で、ヘペス (1 0 m M) + アピラーゼ (1 U / m l、A T P アーゼ / A D P アーゼ活性 = 1) を添加した 1 0 m l の F r e e s t y l e 2 9 3 F 培地に再懸濁した。ポピュレーションパッチ配置での自動化された電気生理学プラットフォーム Q P a t c h 1 6 X (S o p h i o n) を用いて、P 2 X 4 機能をアッセイした。Q P a t c h 細胞外緩衝液 (Q E B) の組成は、(m M で) N a C l (1 4 0)、K C l (2)、M g C l₂ (1) C a C l₂ (2)、ヘペス (1 0) であった。コンパウンドプレート細胞外緩衝液 (C P E B 1) の最終組成は、N a C l (1 3 7 . 6)、K C l (2 . 2)、M g C l₂ (0 . 6 6)、C a C l₂ (1 . 3)、ヘペス (6 . 6)、K H₂ P O₄ (0 . 4 9)、N a H₂ P O₄ (2 . 6 6) であった。細胞外緩衝液の p H は N a O H (1 M) で 7 . 4 に調整し、モル浸透圧濃度はスクロースで 3 0 0 m O s m に調整し、溶液は 0 . 2 μ m で濾過した。コンパウンドプレート細胞外緩衝液に 0 . 1 % ウシ血清アルブミンを添加した。Q P a t c h 細胞内緩衝液は、(m M で) C s F (1 4 0)、N a C l (1 0)、E G T A (1)、ヘペス (1 0) を含有した。細胞内緩衝液の p H は C s O H (1 M) で 7 . 3 に調整し、溶液は 0 . 2 μ m で濾過した。I g G は、N a O H (1 M) で p H 7 . 4 に滴定した。

30

【 0 1 6 4 】

全細胞の立体配置を得た後、細胞を - 5 0 m V で電圧固定し、7 0 % の直列抵抗補償を用いた。C P E B 1 中のリガンド作動薬アデノシン 5 ' - 三リン酸二ナトリウム塩 (A T P、3 μ M) を 2 0 分間、5 分毎に 3 秒間適用し、4 つの対照作動薬応答を得た。各作動薬応答は、C P E B 1 + アピラーゼ (1 U / m l) で洗い落した。次に 4 つの追加的な作動薬応答を、試験 I g G またはアイソタイプ対照 I g G (N I P 2 2 8) の継続存在下で 5 分毎に測定した。I g G 適用の 5 分後に阻害性 I g G の効果を示す代表的トレースを図 8 A 中に認めることができる一方、増強性 I g G の例を図 8 D 中に認めることができる。図 3 および図 4 中に示される電気生理学的数据は、リガンドの不在下での電流を差し引くことによってリーク電流を除去し、P 2 X 4 応答の大きさはリガンドの存在下での内向き電流ピークとして測定した。I g G のインキュベーションから 5 分後の I g G + A T P の存在下での内向き電流ピークは、4 番目の対照 A T P 応答の割合として表した。次いで

40

50

、データは、方程式 $I_{norm} = I_{IgG} \cdot (1 / I_{isotype})$ (式中、 I_{IgG} = 試験 I_{gG} における対照電流の割合および $I_{isotype}$ = アイソタイプ対照 I_{gG} における対照電流の割合) を用いてアイソタイプ対照抗体応答に一致させた時間および濃度に対して正規化した。6つの I_{gG} ; 抗体番号 5、8、11、18、29、および 33 が、ヒト P2X4 電流を有意に阻害することを見出した (図 3、4、8A)。P2X4 電流の阻害は迅速であり、 I_{gG} 添加後の最初の時点で生じる一方、アイソタイプ対照 I_{gG} NIP228 は有意な効果を有しなかった。引き続き、 I_{gG} のマウスおよびカニクイザル P2X4 に対する機能について試験し (図 3、図 4)、データを $n = 3 \sim 4$ の実験の平均として報告した。

【0165】

ファージディスプレイ抗体における配列を図 2 に提供する。ヒト、カニクイザル、およびマウスの間でのファージディスプレイ抗体における交差反応性の結果を図 3 に提供する。図 9 は、エピトープ / パラトープ界面の構造分析を提供する。図 10 は、予想される P2X4 エピトープの配列を提供する。

【0166】

ハイブリドーマ由来 mAb における方法 - 図 5、図 7 および図 8

マウス P2X4 (UniProt 番号 Q9JJX6) またはヒト P2X4 (UniProt 番号 Q99571) のいずれかを安定に発現する HEK293F 細胞を、アキュターゼを用いて 50% の培養密度で採取した。次に、細胞を、ヘペス (10 mM) + アピラーゼ (1 U/ml、ATP アーゼ / ADP アーゼ活性 = 1) を $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞 / ml の密度で添加した 10 ml の FreeStyle 293F 培地に再懸濁した。ポピュレーションパッチ配置での自動化された電気生理学プラットフォーム QPatch 16X (Sophion) を用いて、P2X4 機能をアッセイした。QPatch 細胞外緩衝液 (QEB) の組成は、(mM で) NaCl (140)、KCl (2)、 $MgCl_2$ (1) $CaCl_2$ (2)、ヘペス (10) であった。コンバウンドプレート細胞外緩衝液 (CEB2) の最終組成は、NaCl (115.5)、KCl (1.3)、 $MgCl_2$ (0.66)、 $CaCl_2$ (1.32)、ヘペス (56.1) であった。細胞外緩衝液の pH は NaOH (1 M) で 7.4 に調整し、溶液は $0.2 \mu m$ で濾過した。QPatch 細胞内緩衝液は、(mM で) CsF (140)、NaCl (10)、EGTA (1)、ヘペス (10) を含有した。細胞内緩衝液の pH は、CsOH (1 M) で 7.3 に調整し、溶液は $0.2 \mu m$ で濾過した。 I_{gG} は、NaOH (1 M) で pH 7.4 に滴定した。全細胞の立体配置を得た後、細胞を -50 mV で電圧固定し、70% の直列抵抗補償を用いた。QEB 中のリガンド作動薬 アデノシン 5' - トリリン酸二ナトリウム塩 (ATP) (マウス P2X4 に対して $6 \mu M$ 、ヒト P2X4 に対して $3 \mu M$) を 3 秒間適用し、次に QEB + アピラーゼ (1 U/ml) で洗い落した。次に、CEB2 + I_{gG} を 3 分間インキュベートし、その後 2 回目の ATP 添加を行った。データは、リガンドの不在下での電流を差し引くことによってリーク電流を除去し、P2X4 応答の大きさはリガンドの存在下での内向き電流ピークとして測定した。 I_{gG} 添加後の ATP 応答は、 I_{gG} 添加前の ATP 応答の割合として表した。h I_{gG1} NIP228 TM を、機能的抗体を限定するためのカットオフを測定するための対照抗体として用いた。 I_{gG} は、最初に mP2X4 で二通りにスクリーニングし (図 5、最初のスクリーニングおよび図 7)、 $n = 1 \sim 2$ の実験の平均として表した。対照抗体 NIP228 TM は、 1.08 ± 0.27 (平均 \pm 標準偏差)、 $n = 49$ の対照電流の割合を有した。これらのデータから、機能的阻害抗体を限定するためのカットオフは、 < 0.5 (平均から $>$ 約 2 の標準偏差) で設定した。最初のスクリーニングから得た機能的抗体については、より大規模な試料セット ($n = 3 \sim 4$) の場合で繰り返し、データは平均 \pm 標準偏差として報告した (図 5)。

【0167】

ヒトとマウスの間でのハイブリドーマ抗体における交差反応の結果を図 5 および図 7 に提供する。ハイブリドーマ抗体における配列を図 6 および図 13 に提供する。

【0168】

実施例 9: 神経障害性疼痛の Sel t z e r モデルにおける P2X4 に対するモノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体のインビボ試験

雌 C 5 7 B L / 6 マウス 5 0 匹を試験に用いた。すべてのマウスが、同定を目的として、試験開始の少なくとも 5 日前、トランスポンダーの挿入を受けた。機械的痛覚過敏を、鎮痛作用測定装置を用いて測定した (R a n d a l l & S e l i t t o 1 9 5 7) (U g o B a s i l e)。各後足の背側表面に順に、増加する力を離脱応答が認められるまで加えた。この時点で力の適用を停止し、重量をグラムで記録した。データは、同側足および他側足におけるグラムでの離脱閾値として表した。ベースライン読み取りが確立してから、マウスを、坐骨神経を部分的に結紮させる手術を受けるかまたは偽手術を受ける対照としての役割を担う、ほぼ等しい同側 / 他側比を有する 2 群に分けた。手術を受けるマウスはイソフルランで麻酔した。この後、左坐骨神経の約 1 c m を、大腿中部レベルでの切開による鈍的切開によって露出させた。次に、縫合系 (9 / 0 V i r g i n S i l k : E t h i c o n) を背側の神経の 3 番を通過させ、きつく結んだ。次に、接着剤を用いて切開を閉じて、試験開始前の少なくとも 6 日間、マウスを回復させておいた。偽手術を受けるマウスは同じプロトコルを受けたが、神経の露出後、マウスを縫合し、回復させておいた。

10

【 0 1 6 9 】

マウスは、手術後の 7 日目および 1 0 日目、痛覚過敏の発症について試験した。8 0 % を超える同側 / 他側比を示す任意のマウスを非応答者として分類し、試験から除外した。1 0 日目の試験後、マウスを最終的な処置群：

20

A . グループ 1 : 偽手術 + N I P 2 2 8 T M 5 μ g / マウス、くも膜下腔内 (N = 1 0)

B . グループ 2 : 神経結紮 + N I P 2 2 8 T M 5 μ g / マウス、くも膜下腔内 (N = 1 0)

C . グループ 3 : 神経結紮 + 抗体番号 2 0 8 5 μ g / マウス、くも膜下腔内 (N = 1 0)

D . グループ 4 : 神経結紮 + 抗体番号 3 8 5 μ g / マウス、くも膜下腔内 (N = 1 0)

を示すグループにさらに細分化した。

【 0 1 7 0 】

マウスに対して、N I P 2 2 8 T M (アイソタイプ対照) または試験分子を 1 3 日目に投与し、投与から 4 時間後、また投与後 1、2、4 および 7 日目、機械的痛覚過敏における変化について再試験した。投与においては、マウスはイソフルランで麻酔した。くも膜下腔内投与は脊髄の L 4 ~ L 6 領域に手動で行い、N I P 2 2 8 T M および全試験化合物は、1 . 0 2 m g / m l = 溶液 = 1 μ g / μ l = 5 μ g / マウスとして供した。同側および他側の読み取り値は、各試験時刻に各動物に対して取得し、同側 / 他側比を算出するため、E X C E L に入力した。概略データは、グラフィカルおよび統計学的分析のため、P R I S M に移した。結果は、2 元配置分散分析 (2 - w a y A N O V A) を用いて分析した。ペアワイズ比較は、必要に応じて、テューキーの検定 (T u k e y ' s t e s t) を用いて行った。

30

【 0 1 7 1 】

40

結果の分析によると、坐骨神経の部分的結紮が機械的痛覚過敏をもたらし、それが 7 日目および 1 0 日目、偽手術を受けた対照と比べて同側 / 他側比の有意な低下として現れることが示された。N I P 2 2 8 での処置後、手術を受けたマウスは、機械的痛覚過敏のレベルの投与前レベルからの変化を全く示さず、これはアイソタイプ対照の機械的痛覚過敏に対する効果の欠如を示した。抗体番号 2 0 8 の投与により、応答がベースラインレベルまで戻る投与後の最大で 4 日間有意であるという有意な逆転がもたらされた。抗体番号 3 8 で同様の効果が見られた (図 1 3)。

【 0 1 7 2 】

実施例 1 0 : ハイブリドーマ技術によるマウス抗ヒト P 2 X 4 抗体の作成

マウス抗ヒト P 2 X 4 抗体を作成するための方法は、以下の違いを除き、ラット抗マウス

50

P 2 X 4 抗体の作成に関して先のセクションに記載されたのと同じ方法で実施した。

【 0 1 7 3 】

免疫

ヒト P 2 X 4 (h P 2 X 4) をトランスフェクトした H E K 2 9 3 F および X S 6 3 細胞を、3つの群における C D 1 マウスを免疫するために用いた。グループ 1 では、マウスを h P 2 X 4 トランスフェクト H E K 2 9 3 F 細胞で免疫し、グループ 2 マウスは、h P 2 X 4 トランスフェクト X S 6 3 細胞で免疫し、またグループ 3 マウスは、h P 2 X 4 トランスフェクト X S 6 3 細胞および h P 2 X 4 トランスフェクト H E K 2 9 3 F 細胞により交互に免疫した。

【 0 1 7 4 】

h P 2 X 4 トランスフェクト細胞は、 $1 \times 10^8 / \text{mL}$ で再懸濁し、等量の完全フロイントアジュバントで乳化し、またマウスの両側に $100 \mu\text{L}$ / 部位注射した。その後の 3 回の注射においては、同数の細胞をフロイント不完全アジュバントで乳化し、上記のように注射した。最終の追加免疫は 24 日目に行い、 $200 \mu\text{L}$ のトランスフェクト細胞を $1 \times 10^8 / \text{mL}$ で腹腔内注射した。

【 0 1 7 5 】

細胞に基づく D E L F I A を用いてのマウスの h P 2 X 4 に対する免疫応答の評価

h P 2 X 4 に対する血清 I g G 力価を、親 H E K 2 9 3 F 細胞および h P 2 X 4 トランスフェクト H E K 2 9 3 F 細胞を用いて、細胞に基づく時間分解蛍光アッセイ (D E L F I A) により測定した。

【 0 1 7 6 】

モノクローナルマウス I g G の単離

脾臓およびリンパ節から単離したリンパ球様細胞を、電気融合法を用いて S P 2 / 0 骨髓腫細胞と融合させた。融合物を F I T C 結合型ヤギ抗マウス I g G を含有する半固形選択培地に蒔いた。

【 0 1 7 7 】

マウス I g G における細胞結合アッセイ

上清は、h P 2 X 4 に特異的に結合する I g G について、h P 2 X 4 を発現する H E K 2 9 3 F および X S 6 3 細胞の双方ならびに親 H E K 2 9 3 F 細胞を用いて、最初にスクリーニングした。h P 2 X 4 に対する特異的結合性を示し、親 H E K 2 9 3 F 細胞に対する結合性を全く示さない I g G は、マウス P 2 X 4 (m P 2 X 4) H E K 2 9 3 F 細胞に対するさらなる特異性試験のために選択した。h P 2 X 4 または h P 2 X 4 および m P 2 X 4 の双方に特異的に結合する I g G を、抗体精製および電気生理学による機能分析のために選択した。

【 0 1 7 8 】

マウス I g G の D N A 配列決定および精製

メッセンジャー R N A (m R N A) をハイブリドーマ細胞から磁気オリゴ (d T) 粒子を用いて抽出し、c D N A に逆転写した。すべてのマウス I g G サブクラスに特異的なボリ C および定常領域 V_H または V_L プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅を実施した。

【 0 1 7 9 】

すべてのサブクラスのマウス I g G (I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3) は、P r o P l u s 樹脂 (P h y n e x u s) 上に過成長した細胞培養上清から精製した。

【 0 1 8 0 】

電気生理学による機能的スクリーニング

ヒト P 2 X 4 (U n i p r o t 番号 Q 9 9 5 7 1) を安定に発現する H E K 2 9 3 F 細胞を、アキュターゼを用いて 50 % の培養密度で採取した。次に、細胞は、ヘプス (10 m M) + アピラーゼ (1 U / m l、A T P アーゼ / A D P アーゼ活性 = 1) を $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞 / m l の密度で添加した 10 m l の F r e e s t y l e 2 9 3 F 培地に再

10

20

30

40

50

懸濁した。ポピュレーションパッチ配置での自動化された電気生理学プラットフォーム Q Patch 16 X (Sophion) を用いて、P2X4 機能のアッセイした。Q Patch 細胞外緩衝液 (QEB) の組成は、(mM で) NaCl (140)、KCl (2)、MgCl₂ (1) CaCl₂ (2)、ヘプス (10) であった。コンパウンドプレート細胞外緩衝液 (CPEB2) の最終組成は、NaCl (115.5)、KCl (1.3)、MgCl₂ (0.66)、CaCl₂ (1.32)、ヘプス (56.1) であった。細胞外緩衝液の pH は NaOH (1M) で 7.4 に調整し、溶液は 0.2 μm で濾過した。Q Patch 細胞内緩衝液は、(mM で) CsF (140)、NaCl (10)、EGTA (1)、ヘプス (10) を含有した。細胞内緩衝液の pH は、CsOH (1M) で 7.3 に調整し、溶液は 0.2 μm で濾過した。IgG は、NaOH (1M) で pH 7.4 に滴定した。全細胞の立体配置を得た後、細胞を -50 mV で電圧固定し、70% の直列抵抗補償を用いた。QEB 中のリガンド作動薬アデノシン 5' - トリリン酸二ナトリウム塩 (ATP、3 μM) を 3 秒間適用し、次に QEB + アピラーゼ (1 U/ml) で洗い落した。次に、CPEB2 + IgG を 3 分間インキュベートし、その後 2 回目の ATP 添加を行った。データは、リガンドの不在下での電流を差し引くことによってリーク電流を除去し、P2X4 応答の大きさはリガンドの存在下での内向き電流ピークとして測定した。IgG 添加後の ATP 応答は、IgG 添加前の ATP 応答の割合として表した。hIgG1 NIP228TM を、機能的抗体を限定するためのカットオフを測定するための対照抗体として用いた。結果を図 23 に提供する。抗体配列を図 13 に提供する。

10

20

30

40

50

【0181】

実施例 11：抗体 11 の親和性成熟

抗体番号 11 を、標的化またはランダム突然変異誘発のいずれかの 2 つの手法とその後の親和性に基づくファージディスプレイ選択を介して、親和性について最適化した。標的化手法では、(Clackson, T. and Lowman, H. B. Phage Display - A Practical Approach, 2004. Oxford University Press) 記載の標準の分子生物学技術を用いて、可変重 (V_H) 相補性決定領域 3 (CDR3) および軽 (V_L) 鎖 CDR3 のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発により、リードクローン由来の大規模 scFv - ファージライブラリーを作成した。ヒト P2X4 に対してより高い親和性を有する変異体を選択するため、ライブラリーに、親和性に基づくファージディスプレイ選択を施した。選択は、4 回にわたる選択で固定化したヒト P2X4 の濃度を低下させた (10 μg/ml ~ 1.25 μg/ml) 点を除き、本質的に実施例 3 で先述の通りに実施した。改善された親和性を有する抗体は、(実施例 12 に記載の) 抗体 11 の huP2X4 発現細胞への結合に基づく競合アッセイで同定した。さらに親和性を改善したものを作成するため、標準の分子生物学技術を用いて、改善された抗体からの CDR 突然変異を新たな scFv に組み換えた。

【0182】

抗体 11 はまた、ヒト P2X4 への結合を改善し得る全可変ドメイン内部の主要な残基を同定するため、ランダム突然変異誘発手法を用いて最適化した。かかる技法は、エラープローン PCR を用いる Gramらによって記載がなされている [Gram et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576 - 3580]。一部の実施形態では、1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換が、CDR の全可変ドメインまたはセット内部でなされる。上で概説した標的化選択についての記載の通り、作成したライブラリーに親和性に基づく選択を施した。

【0183】

この選択法から得られる代表的な抗体を、抗体 287 ~ 315 として本明細書で開示し、それらの配列のアラインメントを図 12 に示す。

【0184】

実施例 12：ヒト P2X4 に対して親和性がより高い抗体の同定

実施例 11 に記載のファージディスプレイ選択による成果物 (outputs) を、抗体 11 の huP2X4 発現細胞への結合に基づく競合アッセイで活性についてスクリーニ

ングした。つまり、抗体 11 の IgG は、製造業者の使用説明書 (Innova Biosciences Ltd) に従い、Lightning-Link (登録商標) Rapid DyLight (登録商標) 650 結合キットを用いて、DyLight (登録商標) 650 で標識した。細菌によって発現された scFv を、原形質周囲 (periplasmic) 抽出物として、0.2 M ヘプス緩衝液 pH 7.4、0.5 mM EDTA および 0.5 M スクロースに回収し、アッセイ緩衝液 (HBSS、0.1% BSA、1 U/ml アピラーゼ、20 mM ヘプスを含むかまたは含まない) とともにアッセイプレート (Corning (登録商標) 3655) に添加した。

【0185】

抗体 11 - DyLight (登録商標) 650 を、バックグラウンド結合を明確化するのに用いられるウェル以外の各ウェルに最終濃度が 2 nM になるまで添加した。HEK 293F huP2X4 細胞を、約 2000 個の細胞/ウェルの最終密度で各ウェルに添加した。mirrorball (登録商標) プレートリーダー (TTP Labtech, Ltd) で読み取り、全 FL3 蛍光/ウェル (中央値 (平均強度) 蛍光に対象数を乗じたもの) を決定する前、プレートをカバーし、室温で 2 ~ 3 時間インキュベートした。個別の事象はサイズおよび蛍光に対してゲーティングし、全 FL3 値を報告するのに十分な事象を有するウェルを決定するため、25 を超える最小対象数を用いた。% 特異的結合は、以下の方程式を用いて各ウェルに対して算出し、最大全 FL3 値を、scFv を全く受けないが原形質周囲試料用緩衝液を確実に受けるウェルから定義した。

【数 1】

$$\text{特異的結合\%} = \frac{\text{試料全FL3} - \text{バックグラウンド全FL3}}{\text{最大全FL3} - \text{バックグラウンド全FL3}} \times 100$$

【0186】

結合シグナルが 85 % より低い特異的結合の場合の試料を配列決定用に選択し、配列固有ヒットを精製 scFv として作成した。

【0187】

これらの scFv 抗体の阻害を確認するため、精製 scFv 抗体を上記のアッセイ緩衝液で希釈して希釈系列を作成し、また希釈した試料を、抗体 11 - DyLight (登録商標) 650 の添加前、アッセイプレートに最終濃度が 2 nM になるまで添加し、その後ウェルあたり約 2000 個の HEK 293F huP2X4 細胞を添加した。プレートを、mirrorball (登録商標) プレートリーダーで読み取る前に室温で 2 ~ 3 時間インキュベートした。データは、上記のように分析し、阻害を示す scFv クローンを完全 IgG 抗体として作成した。

【0188】

実施例 13 : ヒト P2X4 1321N1 細胞株 FLIPR (登録商標) アッセイを用いてのヒト P2X4 に対して改善された力価を有する抗体の同定

実施例 12 に記載の抗体 11 競合アッセイで同定された抗体を、精製 IgG として作成し、滴定して希釈系列を作成した。これらの抗体を、HBSS および 0.1% BSA を含むアッセイ緩衝液で希釈し、huP2X4 を発現する 1321N1 細胞とともに 30 分間予備インキュベートした (この場合、同細胞に Fluo-4 NW カルシウム色素 (Molecular Probes (商標)、Life Technologies) を製造業者の使用説明書に従って先行的に負荷していた)。P2X4 を、アッセイ緩衝液で希釈した 1 μM の ATP の添加によって活性化し、得られた細胞内カルシウムの上昇をカルシウム色素によって検出し、FLIPR (登録商標) Tetra プレートリーダー (Molecular Devices, LLC) を用いて蛍光の増加によって測定した。データを計算し、アッセイ期間中、バックグラウンド蛍光を超えて認められる最大蛍光を判定した。次に、これらのデータを分析し、以下の方程式を用いて、ATP を省く場合で、ウェル内で認められる緩衝液応答単独を超える % 最大応答を判定した。

【数 2】

$$\text{最大応答\%} = \frac{\text{試料応答} - \text{緩衝液応答}}{\text{全応答} - \text{緩衝液応答}} \times 100$$

【0189】

データを Prism (GraphPad Software, Inc) で分析し、以下の方程式を用いて IC_{50} 値を判定した。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{Log} IC_{50} - X) * \text{HillSlope}})$$

10

【0190】

抗体のランク付けを可能にするため、曲線の top および bottom を各々、100 および 0 に固定した。試験抗体における IC_{50} 値の幾何平均を図 15 に列挙し、2 つの抗体における IC_{50} 曲線の例を、アイソタイプ対照抗体とともに図 19 に示す。

【0191】

実施例 14：自動化された電気生理学プラットフォーム Qpatch 16 X 上の HEK 293 F huP2X4 細胞株を用いてのヒト P2X4 に対して改善された力価を有する抗体の同定

ヒト P2X4 を安定に発現する HEK 293 F 細胞を、アキュターゼを用いて 50 % の培養密度で採取した。次に、細胞を、 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞 / ml の密度で、ヘブス (10 mM) + アピラーゼ (1 U / ml、ATP アーゼ / ADP アーゼ活性 = 1) を添加した 10 ml の FreeStyle 293 F 培地に再懸濁した。ポピュレーションパッチ配置での自動化された電気生理学プラットフォーム QPatch 16 X (Sophion) を用いて、P2X4 機能をアッセイした。QPatch 細胞外緩衝液 (QEB) の組成は、(mM で) NaCl (140)、KCl (2)、 $MgCl_2$ (1) $CaCl_2$ (2)、ヘブス (10) であった。細胞外緩衝液の pH は NaOH (1 M) で 7.4 に調整し、モル浸透圧濃度はスクロースで 300 mOsm に調整し、溶液は $0.2 \mu m$ で濾過した。QPatch 細胞内緩衝液 (QIB) は、(mM で) CsF (140)、NaCl (10)、EGTA (1)、ヘブス (10) を含有した。細胞内緩衝液の pH は、CsOH (1 M) で 7.3 に調整し、溶液は $0.2 \mu m$ で濾過した。IgG は、NaOH (1 M) で pH 7.4 に滴定した。

20

30

【0192】

抗体 11 の最適化された変異体の力価を測定するため、IgG を QEB + 0.1 % ウシ血清アルブミンで連続希釈し、ポピュレーションパッチ配置での QPatch 16 X 上で機能について試験した。細胞外緩衝液は QEB であり、細胞内緩衝液は QIB であり、ATP 洗浄用緩衝液は QEB + アピラーゼ (1 U / ml) であった。このアッセイでは、ATP (3 μM) を、10 分毎に 3 秒間適用し、1 実験あたり全部で 5 回適用した。最初の 2 回の ATP 添加 (ATP 1 および ATP 2) に先立ち、QEB 緩衝液 + 0.1 % BSA とともに 5 分間予備インキュベートした一方、それに続く 3 回の ATP 添加に先立ち、漸増用量の IgG とともに 5 分間インキュベートした。6 ポイントの用量応答曲線 (用量範囲 100 ~ 0.3 nM) を作成するため、事後分析で対数および半対数用量の IgG をインターリーブした。データはリガンドの不在下での電流を差し引くことによってリーク電流を除去し、P2X4 応答の大きさはリガンドの存在下での内向き電流ピークとして測定した。ATP に応答した内向き電流ピークは、対照電流の割合として表し (ATP 2)、 I / I_{basal} と表示した。データは、log (阻害剤) 対応答 (勾配変化) (4 パラメータ) 方程式を用いて Prism でフィットさせた。 $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{Log} IC_{50} - X) * \text{HillSlope}})$ 。IgG 用量応答曲線の top は、0.3 nM の NIP228 への応答によって画定し、この値に固定した。曲線の bottom は、0 より大きいように固定した。図 14 ~ 15 を参照のこと。

40

50

【0193】

実施例15 マウスおよびヒトP2X4でのハイブリドーマ由来抗体の力価測定

P2X4を発現するHEK293F細胞を、実施例8のように処理した。ハイブリドーマ由来IgGの力価を、ポピュレーションパッチ配置でのQpatch 16X上でアッセイした。IgG力価の測定においては、IgGをPBS + 0.1%ウシ血清アルブミンで連続希釈し、ポピュレーションパッチ配置でのQpatch 16X上で機能について試験した。次に、IgGをQEB + 0.1%BSAで1:3に希釈し、CPEB1に等価なNaCl (137.6)、KCl (2.2)、MgCl₂ (0.66)、CaCl₂ (1.3)、ヘプス (6.6)、KH₂PO₄ (0.49)、NaH₂PO₄ (2.66)、BSA (0.1%)の緩衝液の最終組成が得られた。細胞外緩衝液はQEBであり、細胞内緩衝液はQIBであり、ATP洗浄用緩衝液はQEB + アピラーゼ (1U/ml)であった。このアッセイでは、ATP (3 μM)を、10分毎に3秒間適用し、1実験あたり全部で5回適用した。最初の2回のATP添加 (ATP1およびATP2)に先立ち、CPEB1 + 0.1%BSAとともに5分間予備インキュベートした一方、それに続く3回のATP添加に先立ち、漸増用量のIgGとともに5分間インキュベートした。6ポイントの用量応答曲線を作成するため、対数および半対数用量をインターリーブした。データはリガンドの不在下での電流を差し引くことによってリーク電流を除去し、P2X4応答の大きさはリガンドの存在下での内向き電流ピークとして測定した。ATPに応答した内向き電流ピークは、対照電流の割合として表した (ATP2)。データは、log (阻害剤) 対応答 (勾配変化) (4パラメータ) 方程式を用いてPrismでフィットさせた。 $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \cdot \text{HillSlope}))}$ 。IgG用量応答曲線のtopは1に固定する一方、曲線のbottomは0より大きいように固定した。図16を参照のこと。

10

20

【0194】

実施例16 天然マウスミクログリアP2X4でのマウス反応性抗体の有効性

マウスミクログリアの培養：

C57新生児P2由来の初代マウスミクログリアを培養した。脳をマウスの頭蓋から取り除き、培地 (DMEM + 10% FCS + pen / strep) 中で維持した。次に、脳を、20mlの新しい培地中に配置し、単一の細胞懸濁液を得るように粉砕する前、粘着性の脈管構造および髄膜を除去するため、回転させながら濾紙を通過させた。次に、細胞を、40 μmのセルストレーナーを通してフィルター滅菌し、次に1200 rpmで5分間遠心分離した。次に、細胞を、T175フラスコあたり4つの脳での40mlの培地 / フラスコに再懸濁し、1週間培養した。この後、培地にGM-CSF (5 ng/ml)を添加し、細胞をさらに1週間培養した。ミクログリアを、培地に添加したヘプス (20 mM)とともに回転式振盪培養機 (CO₂なし)で一晩振盪させることによって取り除いた。精製したミクログリアを、1200 rpmで5分間遠心分離し、20mlのDMEM + 10% FCS + pen / strep増殖培地に再懸濁した。細胞を計数し、超低結合T75細胞培養フラスコ (Corning) に 7×10^6 個の細胞 / フラスコで播種した。次に、ミクログリアを、Qpatch 16X電気生理学的アッセイまたはFLIPRカルシウムイメージングアッセイに用いる前、培地中で1~7日間維持した。

30

40

【0195】

細胞処理用Qpatch：

1 x T75フラスコをdPBSで2回洗浄し、5~10分間アキュターゼ処理を用いて細胞を採取した。次に、細胞を293F Freeestyle培地 + 20 mMヘプス + 1 U/mlのアキュターゼ (10 ml) に再懸濁し、800 rpmで5分間遠心沈殿した。次に、細胞を3 mlの293F Freeestyle培地 + 20 mMヘプス + 1 U/mlのアキュターゼに再懸濁し、1 mlの細胞懸濁液を実験毎に用いた。

【0196】

Qpatch 16Xをポピュレーションパッチ配置で用いて、細胞を - 70 mVで電圧固定した。細胞を、ATP (30 μM)を適用する前の5分間、対照抗体または試験抗

50

体のいずれかとともに灌流した。ATPの不在下での電流を全データから差し引いた。ATPに応答する内向き電流を測定した(図15を参照)。外部緩衝液はQEBであり、内部緩衝液はQIBであった。図17および図18を参照のこと。

【0197】

FLIPR:

マイクログリアを、Cell Coatポリ-D-リジンでコートした384ウェルプレート(黒、不透明)に30 μ l/ウェルで蒔き、加湿インキュベーター内、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。

【0198】

培地を除去し、製造業者の使用説明書に従い、Screen Quest(商標)Fluo-8 No Wash Calcium Assay Kit(AAT Bioquest, Inc.)を添加した、20 μ l/ウェルのHBSS緩衝液+20mMヘペス+0.1%BSAと交換した。次に、細胞を37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、次にFLIPR(Molecular devices)でのアッセイ前の15分間、室温に戻した。イベルメクチン(12 μ M)を、さらなる384ウェルのコンパウンドプレート(コンパウンドプレート1)内で作成した。IgGを、PBS+0.1%BSA(コンパウンドプレート2)内で作成した。ATP(30 μ M)を、別の384ウェルコンパウンドプレート(コンパウンドプレート3)内、HBSS+20mMヘペス+0.1%BSA中で作成した。Fluo-8を470~495nmの波長で励起させ、放射光を515~575nmの波長で測定した。カメラゲインを、0.4秒の露光で静止時1000カウントを得るように調節した。コンパウンドプレート1からの10 μ lの溶液を細胞に添加し、蛍光を測定した。5分間のインキュベーション後、コンパウンドプレート2からの10 μ lの溶液を添加した。15分後、ATP(最終5 μ M)を添加し、蛍光のピークエンドをATP添加後200~300秒間に測定した。蛍光カウントを、抗体の不在下でのATP応答に正規化し(バックグラウンド蛍光を減算)、ATP応答の%としてプロットした(図21を参照)。各IgGに対する10ポイントの用量応答曲線を二連ウェルから構築し、データは、log(阻害剤)対応答(勾配変化)(4パラメータ)方程式を用いてPrismでフィットさせた。 $Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{-(LogIC50 - X) * HillSlope})$ 。図20を参照のこと。

【0199】

実施例17: P2X4抗体のヒト単球由来マクロファージに対する機能的効果
細胞培養

ヒト単球を、フィコール・バック勾配での遠心分離により、末梢血の単核分画から単離した。次に、細胞を、T175細胞培養フラスコ内、血清の不在下での細胞培地中で1時間インキュベートすることによって精製した。非接着性細胞を取り除き、残存細胞を、10%FCS(HI/GI)+1%P/S+100ng/mlのM-CSFを添加したRPMI Glutamax I培地中で7日間成長させた。2~3日目、追加的な10mlの培地を添加することによって細胞を成長させた。マクロファージを10分間のアキュターゼ処理によって採取し、次いで細胞をかき取り、超低結合T75フラスコに6 \times 10⁶個の細胞/フラスコで再播種した。次に細胞を、電気生理学的記録用に用いる前、さらに1~10日間培養した。実験日に、細胞をアキュターゼを用いて採取し、3mlのCHOA CF培地+20mMヘペスに再懸濁した。1mlの細胞懸濁液を、ポピュレーションパッチ配置でのQpatch 16X上で実験毎に用いた。Qpatch 16Xのアッセイパラメータは、実施例16に記載の通りであった。Nippon拮抗剤は、1H-ナフト[1,2-b][1,4]ジアゼピン-2,4(3H,5H)-ジオン(特許:国際公開第2010/093061号パンフレットおよび欧州特許出願公開第2397480A1号明細書に記載を指す。図21および図22を参照のこと。

【0200】

他の実施形態

前述の説明から、本明細書に記載の本発明を様々な使用および条件に採用するように、

10

20

30

40

50

それに対して変形および修飾を行ってもよいことは明らかになるであろう。かかる実施形態はまた、以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれる。

【 0 2 0 1 】

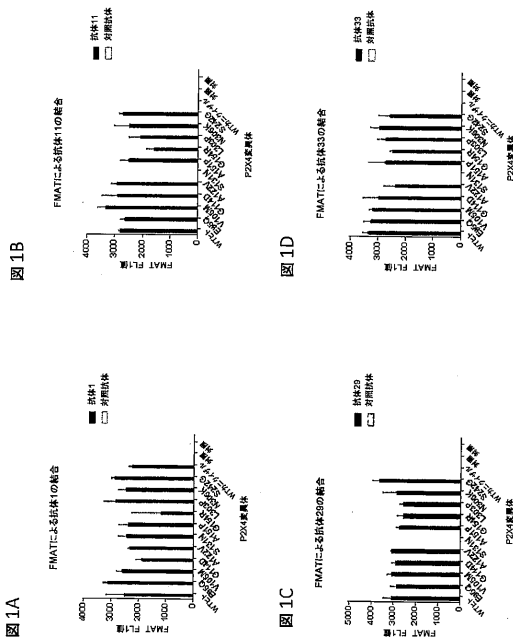
本明細書中の変数の任意の定義における要素のリストの記述は、列挙される要素の任意の単一の要素または組み合わせ（またはサブコンビネーション）としての変数の定義を含む。本明細書中の実施形態の記述は、任意の単一の実施形態あるいは任意の他の実施形態またはその一部との組み合わせとしての実施形態を含む。

【 0 2 0 2 】

本明細書中に記載のすべての特許および出版物は、あたかも各々の独立した特許および出版物が参照により援用されるように詳細かつ個別に示されるのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

10

【 図 1 】



【 図 2 - 1 】

行	列	PW1	CSB1	PW2	CSB2
1	1	0	0	0	0
1	2	0	0	0	0
1	3	0	0	0	0
1	4	0	0	0	0
1	5	0	0	0	0
1	6	0	0	0	0
1	7	0	0	0	0
1	8	0	0	0	0
1	9	0	0	0	0
1	10	0	0	0	0
1	11	0	0	0	0
1	12	0	0	0	0
1	13	0	0	0	0
1	14	0	0	0	0
1	15	0	0	0	0
1	16	0	0	0	0
1	17	0	0	0	0
1	18	0	0	0	0
1	19	0	0	0	0
1	20	0	0	0	0
1	21	0	0	0	0
1	22	0	0	0	0
1	23	0	0	0	0
1	24	0	0	0	0
1	25	0	0	0	0
1	26	0	0	0	0
1	27	0	0	0	0
1	28	0	0	0	0
1	29	0	0	0	0
1	30	0	0	0	0
1	31	0	0	0	0
1	32	0	0	0	0
1	33	0	0	0	0
1	34	0	0	0	0
1	35	0	0	0	0
1	36	0	0	0	0
1	37	0	0	0	0
1	38	0	0	0	0
1	39	0	0	0	0
1	40	0	0	0	0
1	41	0	0	0	0
1	42	0	0	0	0
1	43	0	0	0	0
1	44	0	0	0	0
1	45	0	0	0	0
1	46	0	0	0	0
1	47	0	0	0	0
1	48	0	0	0	0
1	49	0	0	0	0
1	50	0	0	0	0
1	51	0	0	0	0
1	52	0	0	0	0
1	53	0	0	0	0
1	54	0	0	0	0
1	55	0	0	0	0
1	56	0	0	0	0
1	57	0	0	0	0
1	58	0	0	0	0
1	59	0	0	0	0
1	60	0	0	0	0
1	61	0	0	0	0
1	62	0	0	0	0
1	63	0	0	0	0
1	64	0	0	0	0
1	65	0	0	0	0
1	66	0	0	0	0
1	67	0	0	0	0
1	68	0	0	0	0
1	69	0	0	0	0
1	70	0	0	0	0
1	71	0	0	0	0
1	72	0	0	0	0
1	73	0	0	0	0
1	74	0	0	0	0
1	75	0	0	0	0
1	76	0	0	0	0
1	77	0	0	0	0
1	78	0	0	0	0
1	79	0	0	0	0
1	80	0	0	0	0
1	81	0	0	0	0
1	82	0	0	0	0
1	83	0	0	0	0
1	84	0	0	0	0
1	85	0	0	0	0
1	86	0	0	0	0
1	87	0	0	0	0
1	88	0	0	0	0
1	89	0	0	0	0
1	90	0	0	0	0
1	91	0	0	0	0
1	92	0	0	0	0
1	93	0	0	0	0
1	94	0	0	0	0
1	95	0	0	0	0
1	96	0	0	0	0
1	97	0	0	0	0
1	98	0	0	0	0
1	99	0	0	0	0
1	100	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0
2	4	0	0	0	0
2	5	0	0	0	0
2	6	0	0	0	0
2	7	0	0	0	0
2	8	0	0	0	0
2	9	0	0	0	0
2	10	0	0	0	0
2	11	0	0	0	0
2	12	0	0	0	0
2	13	0	0	0	0
2	14	0	0	0	0
2	15	0	0	0	0
2	16	0	0	0	0
2	17	0	0	0	0
2	18	0	0	0	0
2	19	0	0	0	0
2	20	0	0	0	0
2	21	0	0	0	0
2	22	0	0	0	0
2	23	0	0	0	0
2	24	0	0	0	0
2	25	0	0	0	0
2	26	0	0	0	0
2	27	0	0	0	0
2	28	0	0	0	0
2	29	0	0	0	0
2	30	0	0	0	0
2	31	0	0	0	0
2	32	0	0	0	0
2	33	0	0	0	0
2	34	0	0	0	0
2	35	0	0	0	0
2	36	0	0	0	0
2	37	0	0	0	0
2	38	0	0	0	0
2	39	0	0	0	0
2	40	0	0	0	0
2	41	0	0	0	0
2	42	0	0	0	0
2	43	0	0	0	0
2	44	0	0	0	0
2	45	0	0	0	0
2	46	0	0	0	0
2	47	0	0	0	0
2	48	0	0	0	0
2	49	0	0	0	0
2	50	0	0	0	0
2	51	0	0	0	0
2	52	0	0	0	0
2	53	0	0	0	0
2	54	0	0	0	0
2	55	0	0	0	0
2	56	0	0	0	0
2	57	0	0	0	0
2	58	0	0	0	0
2	59	0	0	0	0
2	60	0	0	0	0
2	61	0	0	0	0
2	62	0	0	0	0
2	63	0	0	0	0
2	64	0	0	0	0
2	65	0	0	0	0
2	66	0	0	0	0
2	67	0	0	0	0
2	68	0	0	0	0
2	69	0	0	0	0
2	70	0	0	0	0
2	71	0	0	0	0
2	72	0	0	0	0
2	73	0	0	0	0
2	74	0	0	0	0
2	75	0	0	0	0
2	76	0	0	0	0
2	77	0	0	0	0
2	78	0	0	0	0
2	79	0	0	0	0
2	80	0	0	0	0
2	81	0	0	0	0
2	82	0	0	0	0
2	83	0	0	0	0
2	84	0	0	0	0
2	85	0	0	0	0
2	86	0	0	0	0
2	87	0	0	0	0
2	88	0	0	0	0
2	89	0	0	0	0
2	90	0	0	0	0
2	91	0	0	0	0
2	92	0	0	0	0
2	93	0	0	0	0
2	94	0	0	0	0
2	95	0	0	0	0
2	96	0	0	0	0
2	97	0	0	0	0
2	98	0	0	0	0
2	99	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
3	2	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0
3	5	0	0	0	0
3	6	0	0	0	0
3	7	0	0	0	0
3	8	0	0	0	0
3	9	0	0	0	0
3	10	0	0	0	0
3	11	0	0	0	0
3	12	0	0	0	0
3	13	0	0	0	0
3	14	0	0	0	0
3	15	0	0	0	0
3	16	0	0	0	0
3	17	0	0	0	0
3	18	0	0	0	0
3	19	0	0	0	0
3	20	0	0	0	0
3	21	0	0	0	0
3	22	0	0	0	0
3	23	0	0	0	0
3	24	0	0	0	0
3	25	0	0	0	0
3	26	0	0	0	0
3	27	0	0	0	0
3	28	0	0	0	0
3	29	0	0	0	0
3	30	0	0	0	0
3	31	0	0	0	0
3	32	0	0	0	0
3	33	0	0	0	0
3	34	0	0	0	0
3	35	0	0	0	0
3	36	0	0	0	0
3	37	0	0	0	0
3	38	0	0	0	0
3	39	0	0	0	0
3	40	0	0	0	0
3	41	0	0	0	0
3	42	0	0	0	0
3	43	0	0	0	0
3	44	0	0	0	0
3	45	0	0	0	0
3	46	0	0	0	0
3	47	0	0	0	0
3	48	0	0	0	0
3	49	0	0	0	0
3	50	0	0	0	0
3	51	0	0	0	0
3	52	0	0	0	0
3	53	0	0	0	0
3	54	0	0	0	0
3	55	0	0	0	0
3	56	0	0	0	0
3	57	0	0	0	0
3	58	0	0	0	0
3	59	0	0	0	0
3	60	0	0	0	0
3	61	0	0	0	0
3	62	0	0	0	0
3	63	0	0	0	0
3	64	0	0	0	0
3	65	0	0	0	0
3	66	0	0	0	0
3	67	0	0	0	0
3	68	0	0	0	0
3	69	0	0	0	0
3	70	0	0	0	0
3	71	0	0	0	0
3	72	0	0	0	0
3	73	0	0	0	0
3	74	0	0	0	0
3	75	0	0	0	0
3	76	0	0	0	0
3	77	0	0	0	0
3	78	0	0	0	0
3	79	0	0	0	0
3	80	0	0	0	0
3	81	0	0	0	0
3	82	0	0	0	0
3	83	0	0	0	0
3	84	0	0	0	0
3	85	0	0	0	0
3	86	0	0	0	0
3	87	0	0	0	0
3	88	0	0	0	0
3	89	0	0	0	0
3	90	0	0	0	0
3	91	0	0	0	0
3	92	0	0	0	0
3	93	0	0	0	0
3	94	0	0	0	0
3	95	0	0	0	0
3	96	0	0	0	0
3	97	0	0	0	0
3	98	0	0	0	0
3	99	0	0	0	0
3	100	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0
4	2	0			

【 図 2 - 2 】

図2-バート2:ファージディスプレイP2X4結合-抗体(Ab)\VH配列

[illegible]

【 図 2 - 3 】

図2-バート3:フアージディスプレイP2X4結合-抗体(Ab)VL配列

[illegible]

【 図 2 - 4 】

日期 Date	PM 3												COP 3												PM 4											
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
1	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
2	1	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	1	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	1	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56
3	2	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	2	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	2	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57
4	3	8	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	3	8	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	3	8	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58
5	4	9	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	4	9	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	4	9	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59
6	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
7	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61
8	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62
9	8	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	8	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	8	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63
10	9	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	9	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	9	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64
11	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
12	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66
13	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	12	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67
14	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	13	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68
15	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69
16	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
17	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71
18	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	17	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72
19	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	18	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73
20	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74
21	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
22	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76
23	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	22	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77
24	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	23	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78
25	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	24	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79
26	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
27	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81
28	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	27	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82
29	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	28	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83
30	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	29	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84
31	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85
32	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86
33	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	32	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87
34	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	33	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88
35	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	34	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89
36	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
37	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91
38	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	92	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	92	37	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	92
39	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	93	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	93	38	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	93
40	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	94	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	94	39	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	94
41	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
42	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	96	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	96	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	96
43	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	92	97	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	92	97	42	47	52	57	62	67	72	77	82	87	92	97
44	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	93	98	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	93	98	43	48	53	58	63	68	73	78	83	88	93	98
45	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	94	99	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	94	99	44	49	54	59	64	69	74	79	84	89	94	99
46	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
47	46	51	56																																	

【 図 3 - 1 】

図3:抗体(Ab)の結合および機能:ファージディスプレイP2X4結合抗体

[illegible]

【 図 6 - 2 】

[illegible]

図6 パート2:ハイブリドーマ由来P2X4抗体(Ab)VH配列

【 図 6 - 3 】

[illegible]

図6 パート3:ハイブリドーマ由来P2X4抗体(Ab)VH配列

【 図 6 - 4 】

任务 编号	任务 名称	FW4											
		103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
	35	W	Q	Q	G	V	M	T	V	V	S	S	
	36	M	G	Q	G	V	M	T	V	V	S	S	
	37	W	Q	Q	G	V	M	T	V	V	S	S	
	38	M	G	Q	G	V	M	T	V	V	S	S	
	39	W	Q	R	G	V	M	T	V	V	S	S	
	40	M	G	Q	G	V	M	T	V	V	S	S	
	41	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
	42	M	G	Q	G	V	M	T	V	V	S	S	
	43	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
	44	M	G	Q	G	V	M	T	V	V	S	S	
	45	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
	46	M	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
	47	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
	48	M	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	

図6 パート4:ハイブリドーマ由来P2X4抗体(Ab)VH配列

【 図 6 - 5 】

[illegible]

図6 パート5:ハイブリドーマ由来P2X4抗体(Ab)VL配列

【 図 6 - 6 】

図6 パート6:ハイブリドーマ由来P2X4抗体(Ab)VL配列

[illegible]

【 図 6 - 7 】

図6 パート7:ハイブリドーマ由来P2X4抗体(Ab)VL配列

[illegible]

【 図 6 - 8 】

図6 パート8:ハイブリドーマ由来P2X4抗体(Ab)VL配列

[illegible]

【 図 7 - 1 】

図7: パート1a 抗体(Ab)の結合および機能: ハイブリドーマP2X4結合抗体(全クローン)

社名	日19204 通算	カンパニー 別通算	ヤフー2024 通算	はてな2024 通算	はてな2024 別通算の割合 (電装と電算)	ネット利用者の割合 (電装と電算)	ネット利用者の割合 (電装と電算)
55	+		+		0.648	0.463	115
56	+	-	+		0.604	0.051	327
37	+		+		1.056	0.320	207
38	+	-	+		0.488	0.178	40
39	+		+		0.007	0.007	141
40	+		+		0.015	0.231	176
41	+		+		0.032	0.072	73
42	+	+			0.014	0.333	109
43	+		+		0.395	0.307	86
44	+		+		0.233	0.233	75
45	+		+		0.020	0.231	158
46	+		+		0.393	-0.079	396
47	+		+		0.012	0.186	161
48	+		+		0.569	0.041	227
49	+		+			<100	電装 電算
50	+		+			0.940	53
51	+		+			0.944	246
52	+		+			0.516	97
53	+		+			0.965	81
54	+		+			1.397	213
55	+		+			0.570	104
56	+		+			0.607	86
57	+		+			1.090	113
58	+		+			0.051	<100
59	+		+			0.485	179
60	+		+			1.093	83
61	+		+			1.713	<100
62						0.112	24

社名	ネット利用者の割合 (電装と電算)	ネット利用者の割合 (電装と電算)
+	FAM77パーセント 電装のみ	FAM77パーセント 電装のみ
-	FAM77パーセント 電装のみ	FAM77パーセント 電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ
	電装のみ	電装のみ

【 図 7 - 2 】

図注 番号	ヒドP204 割合	カニタイプル P204割合	マウスP204 割合	ヒドP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	マウスP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	電流比基準P204に 対する電流 (μg/ml)
63			+		0.976	<LOD
64			+		1.893	67
65			+		0.994	364
66			+		1.574	85
67			+		0.714	107
68			+		1.767	107
69			+		0.887	89
70			+		0.784	161
71			+		3.280	76
72			+		0.882	337
73			+		0.657	71
74			+		3.767	95
75			+		0.713	61
76			+		0.793	91
77			+		1.118	37
78			+		0.769	54
79			+		0.686	39
80			+		0.650	<LOD
81			+		0.812	199
82			+		1.240	181
83			+		1.091	372
84			+		0.381	31
85			+		1.821	<LOD
86			+		1.153	<LOD
87			+		0.760	212
88			+		1.093	219

図7-パート1d

【 図 7 - 3 】

図注 番号	ヒドP204 割合	カニタイプル P204割合	マウスP204 割合	ヒドP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	マウスP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	電流比基準P204に 対する電流 (μg/ml)
89			+		1.710	381
90			+		0.933	210
91			+		1.388	116
92			+		2.693	80
93			+		1.749	171
94			+		2.093	136
95			+		1.221	48
96			+		0.939	89
97			+		0.976	94
98			+		0.564	69
99			+		0.821	181
100			+		0.907	30
101			+		4.969	318
102			+		0.778	311
103			+		0.860	94
104			+		0.720	311
105			+		0.398	233
106			+		0.703	233
107			+	0.540	0.151	84
108			+		1.007	238
109			+		0.805	52
110			+		0.790	89
111			+		0.095	216
112			+		0.650	86
113			+		1.136	238
114			+		1.567	398
115			+		1.695	183

図7-パート1c

【 図 7 - 4 】

図注 番号	ヒドP204 割合	カニタイプル P204割合	マウスP204 割合	ヒドP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	マウスP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	電流比基準P204に 対する電流 (μg/ml)
115			+		1.635	189
116			+		1.287	141
117			+		0.749	315
118			+		0.398	109
119			+		2.211	49
120			+		0.845	317
121			+		0.952	73
122			+		0.982	103
123			+		0.933	235
124			+		0.711	120
125			+		1.238	360
126			+		3.792	196
127			+		0.467	75
128			+		0.542	76
129			+		0.716	57
130			+		0.595	138
131			+		1.233	351
132			+		0.860	118
133			+		0.608	195
134			+		1.435	97
135			+		1.157	81
136			+		0.679	70
137			+		0.903	118
138			+		1.521	295
139			+		1.658	150
140			+		0.973	118

図7-パート1d

【 図 7 - 5 】

図注 番号	ヒドP204 割合	カニタイプル P204割合	マウスP204 割合	ヒドP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	マウスP204での 対照電流の割合 (電流比基準)	電流比基準P204に 対する電流 (μg/ml)
141			+		0.892	231
142			+		1.505	367
143			+		0.770	269
144			+		0.656	174
145		+	+		0.150	69
146			+		1.480	141
147			+		0.727	60
148			+		2.619	391
149			+		1.602	379
150			+		0.450	203
151			+		1.011	293
152			+		0.938	400
153			+		1.926	282
154			+		0.704	444
155			+		0.928	279
156			+		1.078	<LOD
157			+		1.096	247
158			+		1.305	298
159			+		5.781	118
160			+		0.918	190
161			+		0.956	206
162			+		1.389	185
163			+		0.375	59
164			+		0.546	288
165			+		0.616	<LOD

図7-パート1e

【図 7 - 6】

図形番号	ヒト204 結合	カンパイル P204結合	ワウ204 結合	ヒト204での 対称電位の割合 (電圧比等)	ワウ204での 対称電位の割合 (電圧比等)	電圧比等ワウ204に 対する電圧比等 (電圧比等)
165			+		0.830	152
167			+		1.258	151
168					1.808	88
169			+		1.773	135
170			+		0.690	95
171			+		0.514	295
172	-	-	+	1.078	0.307	354
173			+		0.702	154
175			+		0.556	225
176			+		1.223	266
178			+		1.444	148
179			+		0.728	251
179			+		1.356	297
180			+		0.888	332
181			+		0.679	351
182			+		1.352	89
183			+		0.572	<LOD
184			+		0.627	153
185			+		0.373	84
186			+		0.484	310
187			+		1.320	257
187			+		0.845	315
188			+		0.645	114
189	+	-	+	0.593	0.052	308
190			+		0.555	127
191			+		0.932	97
192			+		1.855	29
193			+		0.660	<LOD
194			+		0.940	215

図7-6-11

【図 7 - 7】

図形番号	ヒト204 結合	カンパイル P204結合	ワウ204 結合	ヒト204での 対称電位の割合 (電圧比等)	ワウ204での 対称電位の割合 (電圧比等)	電圧比等ワウ204に 対する電圧比等 (電圧比等)
195			+		0.895	110
196			+		0.860	100
197			+		0.665	155
198			+		0.871	57
199			+		0.650	413
200			+		0.503	110
201			+		0.584	124
202			+		0.988	317
203			+		0.650	283
204			+		1.202	104
205			+		0.707	279
206			+		0.911	104
207			+		0.659	214
208	-	-	+	0.937	0.072	296
209			+		0.709	126
210			+		1.505	411
211			+		1.108	74
212			+		1.031	91
213			+		1.346	223
214			+		0.873	85
215			+		0.512	373
216			+		1.177	124
217			+		0.836	66
218			+		0.711	78
219			+		0.746	100
220			+		0.645	139
221	-	-	+	1.009	0.103	363

図7-7-11

【図 7 - 8】

図形番号	ヒト204 結合	カンパイル P204結合	ワウ204 結合	ヒト204での 対称電位の割合 (電圧比等)	ワウ204での 対称電位の割合 (電圧比等)	電圧比等ワウ204に 対する電圧比等 (電圧比等)
222			+		1.317	<LOD
223			+		1.071	302
224			+		1.047	337
225			+		0.539	81
226			+		0.514	297
227			+		0.781	111
228			+		0.546	92
229			+		0.760	135
230			+		1.131	117
231			+		1.840	262
232			+		0.652	281
233			+		0.714	486
234	-	-	+	0.807	0.156	452
235			+		0.660	287
236			+		0.530	58
237			+		0.725	95
238	-	-	+	0.908	0.238	157
239			+		1.054	<LOD
240			+		1.899	<LOD
241			+		0.877	<LOD
242			+		1.059	230
243			+		1.143	18
244			+		0.787	171
245			+		0.625	367
246			+		1.059	64
247			+		0.867	268
248			+		0.747	32

図7-8-11

【図 7 - 9】

図形 番号	ヒト204 結合	カンパイル P204結合	ワウ204 結合	ヒト204での 対称電位の割合 (電圧比等)	ワウ204での 対称電位の割合 (電圧比等)	電圧比等ワウ204に 対する電圧比等 (電圧比等)
249			+		0.935	153
250			+		0.800	53
251			+		0.460	199
252			+		1.979	<LOD
253			+		1.016	252
254			+		1.097	144
255			+		0.916	273
256			+		0.688	302
257			+		1.316	<LOD
258			+		0.606	67
259			+		1.345	57
260			+		0.885	244
261			+		0.691	79
262			+		0.557	220
263			+		1.286	92
264			+		0.161	66
265			+		1.076	<LOD
266			+		0.463	61
267			+		0.443	49
268			+		4.057	73
269			+		0.757	<LOD
270			+		0.802	91
271			+		0.696	112
272			+		0.832	158
273			+		0.814	408
274			+		0.801	300
275			+		0.982	141

図7-9-11

図 8F

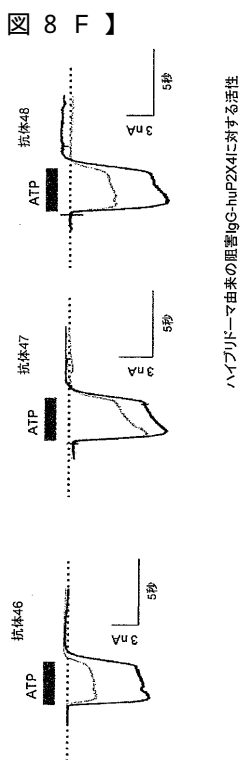
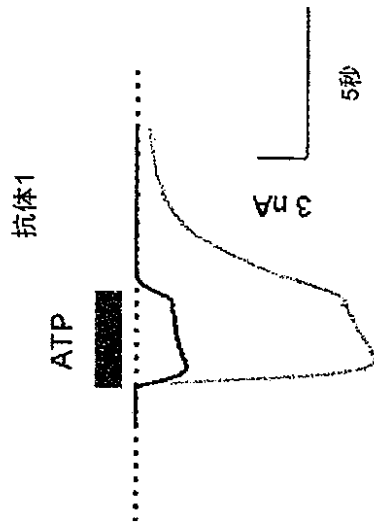


図 8D



増強IgGの例-huP2X4に対する活性

図 9

【 図 9 】

二つのエプITOープ/パトープ抗体番号11 VHCOR-P2X4プロモーター1の阻害(大きい面)抗体番号11 VHCOR-P2X4プロモーター2の右リッパバー(小さい面)。

3つの抗体番号11分子は、同じP2X4三量体分子に非特異的に結合し得る。

抗体番号11の2つのFabアームは同じP2X4三量体分子に結合する可能性は低い。

同抗体は、2つのP2X4サブユニットによって形成されるエプITOープにわたってP2X4ヘテロマーに結合することが予想される。

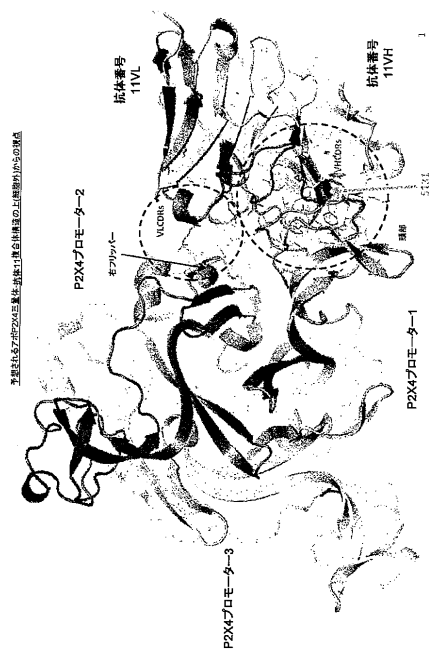
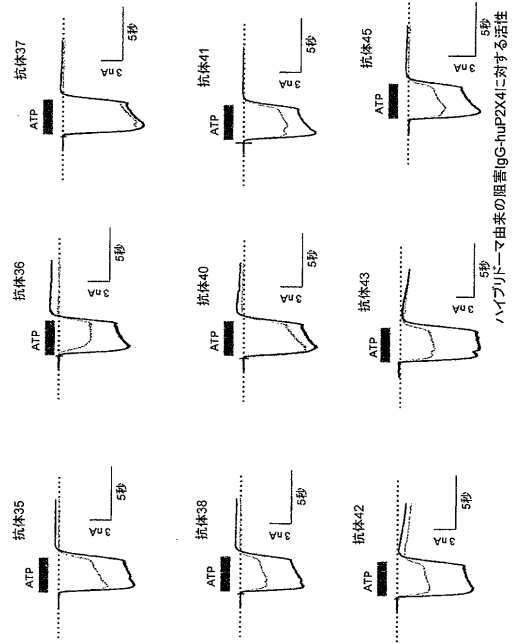
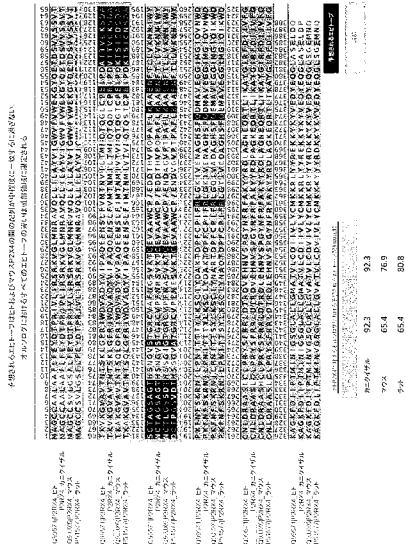


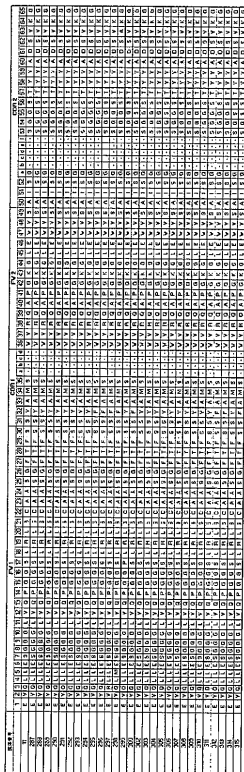
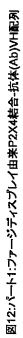
図 8E



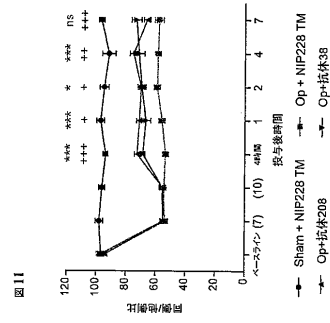
【 ㊦ 1 0 】



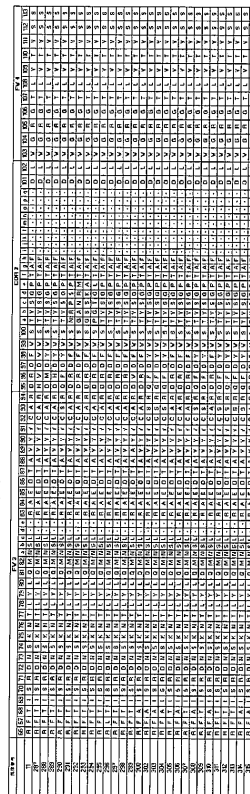
【 図 1 2 - 1 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 - 2 】



【 図 1 2 - 3 】

図12: パート3: フォージディスプレイ由来P2X4結合-抗体(Ab)VL配列

[illegible]

【 図 1 2 - 4 】

図12: パート4: ファージディスプレイ由来P2X4結合-抗体(Ab)VL配列

[illegible]

【 図 1 3 】

図13 パート1:ハイブリドーマ由来P2X4結合-抗体(Ab)VH配列

[illegible]

図13 パート2:ハイブリドーマ由来P2X4結合-抗体(Ab)VH配列

[illegible]

図13 パート3:ハイブリドーマ由来P2X4結合-抗体(Ab)VL配列

[illegible]

図13 パート4:ハイブリドーマ由来P2X4結合-抗体(Ab)V_L配列

[illegible]

【 図 1 4 】

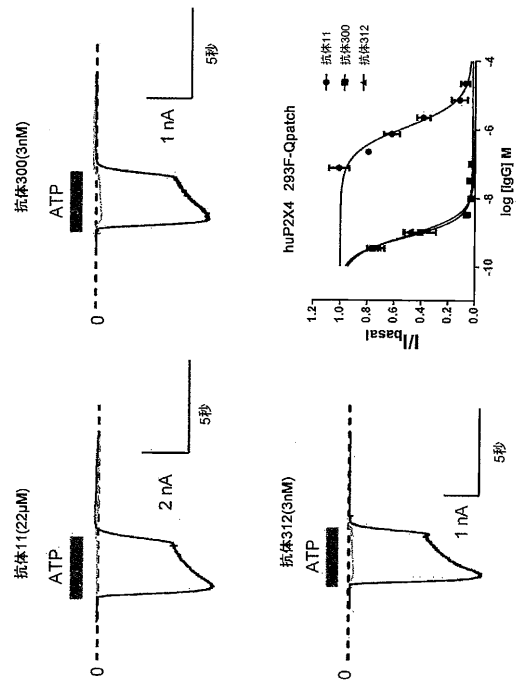


図14: huP2X4電気生理学的アッセイにおける抗体の活性

【 図 1 5 】

図 15: huP2X4での抗体 110 濃減化された抗体の力価

抗体番号	幾何平均IC ₅₀ (モル)huP2X4 FLIPRアッセイ	IC ₅₀ (モル)huP2X4 電気生理学(HK239)
287	3.9E-08	3.5E-09
288		4.7E-08
289		4.5E-08
290	4.6E-07	2.6E-09
291	1.1E-07	4.9E-09
292	1.8E-07	7.4E-09
293	7.7E-08	4.9E-09
294	1.6E-07	1.5E-08
295	2.4E-07	1.2E-09
296	4.5E-08	1.3E-09
297	5.3E-08	1.8E-09
298	2.9E-08	1.1E-09
299		2.2E-09
300	7.9E-09	7.1E-10
302	8.0E-10	5.6E-10
303	1.9E-07	2.4E-09
304	9.5E-08	2.4E-09
305		>1E-07
306		>1E-07
307		>1E-07
308	7.0E-10	6.1E-10
309	7.3E-08	1.2E-09
310		6.2E-09
311	4.0E-10	5.0E-10
312	5.8E-10	5.3E-10
313	3.3E-10	5.4E-10
314	3.5E-08	1.1E-09
315	3.0E-10	6.9E-10

空白データが緑表示

【 図 1 6 】

図 16: マウスおよびヒトP2X4でのハイブリドーマ由来抗体の力価

抗体番号	IC ₅₀ (モル)huP2X4 電気生理学(HK239)	n	IC ₅₀ (モル)huP2X4 電気生理学(HK239)	n
38	3.26E-07	3	4.89E-09	4
43	NT		8.13E-09	4
46	1.79E-07	4	2.03E-08	8
208	> 30E-06	4	2.57E-08	16

NTは試験されなかったことを示す

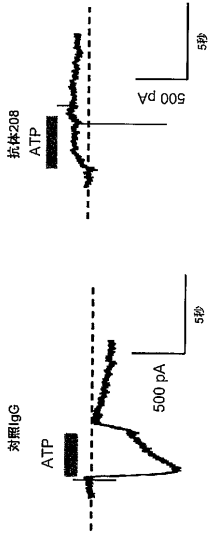
【 図 1 7 】

図 17: マウスミクログリアP2X4電流に対するP2X4抗体の効果

抗体番号	E-IgG1			フラグIgG1		
	濃度 (mg/ml)	電流(pA)	n	対照からの 有意差	濃度 (mg/ml)	電流(pA)
対照IgG	0.33	-446.2	11	-		
38	0.33	-99.29	4	N	0.4	-622.5
43	0.33	-332.3	3	N	0.11	-244.6
46	0.33	9.06	2	Y	NT	NT
208	0.33	12.12	4	Y	0.25	40.96
					0.4	35.09

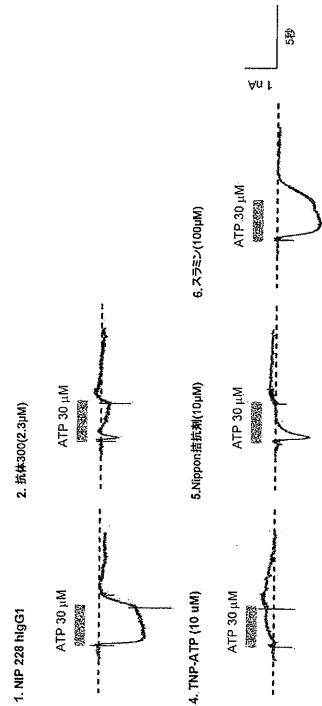
【 図 1 8 】

図 18: 新成マウスミクログリアにおける天然P2X4電流に対する抗体208の代表的効果



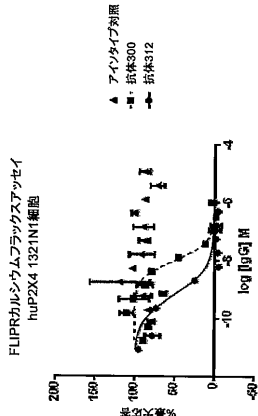
【 図 2 1 】

図 21: ヒト胚球由来マクロファージからの代表的な電気生理学的電流トレース



【 図 1 9 】

図 19: カルシウムフラックスアッセイにおける2つの抗P2X4抗体の活性の例。



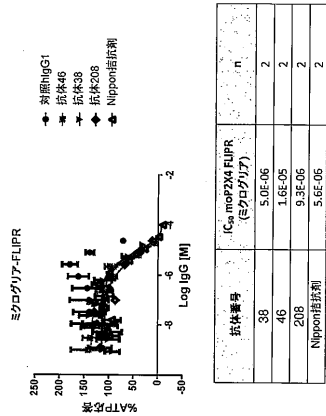
【 図 2 2 】

図 22: ヒト胚球由来マクロファージ、ATP感受性電流に対するP2X4抗体の効果の概要。

抗体番号	ドナー1		ドナー2	
	平均電流(A)	n	平均電流(A)	n
NIP 228	-1.4E-09	8	-7.0E-10	7
ATP	-2.5E-11	5	1.4E-12	7
Nippon 66	3.6E-10	7	1.3E-10	6

【 図 2 0 】

図 20: FLIPRでアッセイされる天然マウスミクログリアP2X4に対するマウス反抗体P2X4抗体の効果



【配列表】

2017515473000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/059633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/286 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. T. YOUNG ET AL: "Molecular Shape, Architecture, and Size of P2X4 Receptors Determined Using Fluorescence Resonance Energy Transfer and Electron Microscopy", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 38, 19 September 2008 (2008-09-19), pages 26241-26251, XP055205467, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M804458200	1
Y	the whole document ----- -/--	2,5-8, 25-29, 41-51

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 2015

Date of mailing of the international search report

18/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheffzyk, Irmgard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/059633

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/48395 A1 (BIOSCEPTRE PTY LTD [AU]; BARDEN JULIAN [AU]; SLATER MICHAEL [AU]) 20 June 2002 (2002-06-20)	1
Y	example 3	2,5-8, 25-29, 41-51
X	----- TSUDA MAKOTO ET AL: "P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 424, no. 6950, 14 August 2003 (2003-08-14), pages 778-783, XP002376086, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE01786	1
Y	the whole document	2,5-8, 25-29, 41-51
X	----- E. TOULME ET AL: "P2X4 receptors in activated C8-B4 cells of cerebellar microglial origin", THE JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 4, no. 1, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 4.19-353, XP055142775, ISSN: 1934-2616, DOI: 10.1006/bbrc.1996.0380	1
Y	the whole document	2,5-8, 25-29, 41-51
X	----- US 2005/074819 A1 (INOUE KAZUhide [JP] ET AL) 7 April 2005 (2005-04-07)	1,3-6, 25-27, 41-43
	[0017]; the whole document	
X	----- US 6 242 216 B1 (LYNCH KEVIN J [US] ET AL) 5 June 2001 (2001-06-05)	1,2,5-8, 25-29, 41-51
	the whole document	
A	----- GARCIA-GUZMAN M ET AL: "CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN P2X4 RECEPTOR REVEALS PHARMACOLOGICAL DIFFERENCES TO THE RAT HOMOLOGUE", MOLECULAR PHARMACOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 51, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 109-118, XP002059398, ISSN: 0026-895X the whole document	1,2,5-8, 25-29, 41-51
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/059633

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/287467 A1 (TAMURA GEN [JP] ET AL) 20 November 2008 (2008-11-20) the whole document	1,3-6, 25-27, 41-51
A	REBECCA J GUM ET AL: "P2X receptor antagonists for pain management: examination of binding and physicochemical properties", PURINERGIC SIGNALLING, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 8, no. 1, 16 November 2011 (2011-11-16), pages 41-56, XP035006784, ISSN: 1573-9546, DOI: 10.1007/S11302-011-9272-5 the whole document	1-22, 25-29, 41-51
X	MARIA VALENTE ET AL: "Expression, purification, electron microscopy, N-glycosylation mutagenesis and molecular modeling of human P2X4 and P2X6", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - BIOMEMBRANES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1808, no. 12, 19 August 2011 (2011-08-19), pages 2859-2866, XP028316556, ISSN: 0005-2736, DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2011.08.025 [retrieved on 2011-08-26] the whole document	1-22, 25-29, 41-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/059633**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
2-4, 9-22(completely); 1, 5-8, 25-29, 41-51(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2015/ 059633

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2(completely); 1, 5-8, 25-29, 41-51(partially)

Antibody specifically binding human P2X4 wherein the antibody is a P2X4 potentiator

2. claims: 3, 4(completely); 1, 5-8, 25-29, 41-51(partially)

Antibody specifically binding P2X4 wherein the antibody is a P2X4 antagonist

3. claims: 9-16(completely); 1, 5-8, 25-29, 41-51(partially)

Antibody specifically binding human P2X4 wherein the antibody is characterised by the presence of the heavy chain variable region CDR1,CDR2,CDR3 as recited in claims 9-16

4. claims: 17-22(completely); 1, 5-8, 25-29, 45-51(partially)

Antibody specifically binding human P2X4 wherein the antibody is characterised by the presence of the light chain variable region CDR1,CDR2,CDR3 as defined in claims 17-22

5. claims: 23, 24(completely); 1, 5-8, 25-29, 45-51(partially)

Antibody specifically binding P2X4 wherein the antibody comprises the heavy chain variable region sequences as recited in claims 23 and 24

6. claims: 30-36(completely); 1, 5-8, 25-29, 41-51(partially)

Antibody specifically binding to P2X4 wherein the antibody comprises the heavy chain variable region sequences as recited in claims 30-36

7. claims: 37-40(completely); 1, 5-8, 25-29, 41-51(partially)

Antibody specifically binding to P2X4 wherein the antibody comprises the light chain variable regions as defined in claims 37-40

8. claims: 52-59

Method for large scale production of recombinant P2X4 polypeptide

International Application No. PCT/ EP2015/ 059633

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/059633

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0248395	A1	20-06-2002	AT 428803 T 15-05-2009
		CA 2431362 A1	20-06-2002
		CN 1533440 A	29-09-2004
		EP 1352085 A1	15-10-2003
		JP 4334223 B2	30-09-2009
		JP 2004520025 A	08-07-2004
		JP 2009143933 A	02-07-2009
		US 2004067542 A1	08-04-2004
		US 2008227122 A1	18-09-2008
		WO 0248395 A1	20-06-2002
		ZA 200304853 A	19-02-2004

US 2005074819	A1	07-04-2005	CA 2444161 A1 01-04-2005
		US 2005074819 A1	07-04-2005

US 6242216	B1	05-06-2001	NONE

US 2008287467	A1	20-11-2008	US 2008287467 A1 20-11-2008
		WO 2005107804 A1	17-11-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/16 (2006.01)	C 1 2 N 5/16	
C 0 7 K 1/16 (2006.01)	C 0 7 K 1/16	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
	C 1 2 P 21/02	Z N A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100196966

弁理士 植田 渉

(72)発明者 ウィリアムズ, ウェンディ エー

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 ジョンズ, クラル

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 ブトン, ジェイムズ

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 リンレイ, ジョン

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 ファン, リン

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 スニジュダー, ハルム ジャン

スウェーデン国 - 4 3 1 8 3 モルンダル, アールアンドディー モルンダル, アストラゼネカ

(72)発明者 柴田 庸子

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 スリドハラン, スドハルサン

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 グローブス, マリア

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディムーン リミテッド

(72)発明者 ドブソン, クレア

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パー
ク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド

F ターム(参考) 4B064 AG27 AG31 BJ12 CA10 CA19 CA20 CC24 CE10 CE13 DA01
4B065 AA93X AA93Y AB01 BA02 BD14 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 CC02 CC23 DD32 DD33 DD62 EE01
GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74 GA22