

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5701752号  
(P5701752)

(45) 発行日 平成27年4月15日(2015.4.15)

(24) 登録日 平成27年2月27日(2015.2.27)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/28

Z N A

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/705

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/574

A

請求項の数 9 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2011-515029 (P2011-515029)  
 (86) (22) 出願日 平成21年7月3日(2009.7.3)  
 (65) 公表番号 特表2011-526249 (P2011-526249A)  
 (43) 公表日 平成23年10月6日(2011.10.6)  
 (86) 國際出願番号 PCT/AU2009/000869  
 (87) 國際公開番号 WO2010/000041  
 (87) 國際公開日 平成22年1月7日(2010.1.7)  
 審査請求日 平成24年7月2日(2012.7.2)  
 (31) 優先権主張番号 2008903451  
 (32) 優先日 平成20年7月4日(2008.7.4)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア(AU)

前置審査

(73) 特許権者 510069984  
 バイオセプター・インターナショナル・リ  
 ミテッド  
 オーストラリア・2113・ニュー・サウ  
 ス・ウェールズ・ノース・ライド・ジュリ  
 アス・アベニュー・11  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗P2X<sub>7</sub>ペプチドおよびエピトープ

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

P2X<sub>7</sub>受容体のエピトープに結合する抗体であって、  
 前記エピトープが、

P2X<sub>7</sub>受容体の第1の単量体からの配列番号1のアミノ酸残基200～211を含む第1の領域と、  
 前記受容体の第2の単量体からの配列番号1のアミノ酸残基296～306を含む第2の領域とか  
 ら形成され、

第1の領域および第2の領域が、前記受容体の単量体の配列番号1の210位の残基のシス異性化  
 によって前記受容体内に形成され、

第1の領域および第2の領域が前記受容体内で互いに隣接して配置され、それによって抗体  
 の抗原結合部位が、エピトープを形成している第1の領域および第2の領域に結合するこ  
 とが可能になる、抗体。 10

## 【請求項2】

精製された又は単離された形態である、請求項1に記載の抗体。

## 【請求項3】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、およ  
 び抗体断片からなる群より選択される、請求項1又は2に記載の抗体。

## 【請求項4】

抗体断片が、dAb断片、Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、scFv断片、Fd断片およびFv  
 断片からなる群より選択される、請求項3に記載の抗体。

**【請求項 5】**

抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲートである、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 6】**

二価または二重特異性である、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 7】**

二量体、三量体、または他の高次多量体の形をとる、請求項1から6のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 8】**

アミノ酸配列GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEKからなるペプチド。 10

**【請求項 9】**

個体が癌を有するかどうかを判定するための試薬の製造における、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、ペプチド、エピトープおよびそれからのモノクローナル抗体の产生に関する。  
。

**【背景技術】****【0002】**

本明細書においてどの従来技術を参照することも、その従来技術がオーストラリアまたは任意の他の管轄における共通の一般知識の一部を形成すること、またはその従来技術が、当業者によって関連性があると確認、理解およびみなされると当然予想されることの承認またはいかなる形態の提案でもなく、またそう受け取られるべきではない。 20

**【0003】**

プリン(P2X)受容体は、ATP依存性陽イオン選択性チャネルである。各受容体は、3つのタンパク質のサブユニットまたは単量体で構成されている。これまで、P2X単量体をコードする7つの別々の遺伝子が同定されている:P2X<sub>1</sub>、P2X<sub>2</sub>、P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>4</sub>、P2X<sub>5</sub>、P2X<sub>6</sub>、P2X<sub>7</sub>。  
。

**【0004】**

P2X<sub>7</sub>受容体は、これらの受容体の発現が、胸腺細胞、樹状細胞、リンパ球、マクロファージおよび単球などのプログラム細胞死を受ける可能性がある細胞に限られると理解されているので、特に興味深い。赤血球においてなど、正常な恒常性でP2X<sub>7</sub>受容体が一部発現している。 30

**【0005】**

興味深いことに、Pro210(図1の配列番号1による)においてシス異性化を有する1つまたは複数の単量体を含有し、ATP結合機能を欠くP2X<sub>7</sub>受容体が、前新生物細胞および新生細胞などの、プログラム細胞死を受けることができないと理解されている細胞で見出されている。この受容体アイソフォームは、「非機能性」受容体と称されている。

**【0006】**

Pro210をシスの状態で含むペプチドを用いた免疫化から生成した抗体は、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合する。しかし、この抗体は、ATPと結合可能なP2X<sub>7</sub>受容体には結合しない。したがって、これらの抗体は、癌腫および造血系癌の多くの型を選択的に検出するため、およびこれらの状態の一部を治療するために有用である。 40

**【0007】**

WO02/057306A1およびWO03/020762A1はどちらも、モノクローナル抗体の形で機能性P2X<sub>7</sub>受容体と非機能性P2X<sub>7</sub>受容体を区別するためのプローブについて考察している。

**【0008】**

モノクローナル抗血清は、ポリ血清では見られないある種の血清学的特性を有し、それによりモノクローナル抗血清は、研究、診断および治療において使用するために特に価値 50

ある試薬になっている。その中で重要なのは、モノクローナル抗体が、一般に、ポリ血清において見られる特異性の大部分についての親和性よりも高い、抗原に対する親和性を有することである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO02/057306A1

【特許文献2】WO03/020762A1

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、16版(1980年)

【非特許文献2】Hansen, M.A., Barden, J.A., Balcar, V.J., Keay, K.A., Bennett, M.R. (1997年) Biochem. Biophys. Res. Commun. 236巻、670~675頁、Structural motif and characteristics of the extracellular domain of P2X receptors

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

これまで、生細胞で発現しているような非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に対するモノクローナル抗体、および特に、幅広い診断および治療への適用に使用することができるモノクローナル抗体を有用量生成するハイブリドーマを得ることは非常に困難であった。さらに、本発明者らは、生細胞の機能性P2X<sub>7</sub>受容体に対して生成されたいかなるモノクローナル抗体も知らない。そのような試薬、具体的には、生細胞のATP結合性P2X<sub>7</sub>受容体と非ATP結合性P2X<sub>7</sub>受容体を区別できる新規抗体が必要とされている。

【0012】

さらに、本発明者らが知っている限り、抗P2X<sub>7</sub>抗体は、一般にP2X<sub>7</sub>単量体とそれらの単量体から形成される三量体P2X<sub>7</sub>受容体を区別しない。とりわけ進行した新生組織で三量体受容体が見られると、三量体受容体に結合するが、P2X<sub>7</sub>単量体には結合しない抗体が、癌の病期を決定するために有利であると思われる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、生細胞の非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しない抗体を生じさせるためのペプチドおよびエピトープに関する。このペプチドは、生細胞の機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しない抗体を生じさせるためにも有用である。本発明は、これらのペプチドに結合する抗体、これらのペプチドを含有する組成物、このペプチドを使用して抗体を生成する方法、および非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現に関連付けられる疾患を診断および治療する方法にも関する。

【0014】

特定の実施形態において、P2X<sub>7</sub>受容体のエピトープであって、前記エピトープが、P2X<sub>7</sub>受容体の第1の単量体の一領域の形である第1の領域と、前記受容体の第2の単量体の一領域の形である第2の領域とから形成され、第1の領域および第2の領域が、前記受容体の単量体の配列番号1の210位の残基のシス異性化によって受容体内に形成され、第1の領域および第2の領域が前記受容体内で互いに隣接して配置され、それによって抗P2X<sub>7</sub>抗体の抗原結合部位が、エピトープを形成している第1の領域および第2の領域に結合することが可能になる、エピトープが提供される。

【0015】

他の実施形態において、上記のエピトープを有するP2X<sub>7</sub>受容体が提供される。一般には、受容体の単量体の1つまたは複数が、その単量体の配列番号1の210位においてシス異性化を有する。

【0016】

10

20

30

40

50

他の実施形態において、P2X<sub>7</sub>受容体のエピトープに結合する抗体であって、前記エピトープが、P2X<sub>7</sub>受容体の第1の単量体の一領域の形である第1の領域と、前記受容体の第2の単量体の一領域の形である第2の領域とから形成され、第1の領域および第2の領域が、前記受容体の単量体の配列番号1の210位の残基のシス異性化によって前記受容体内に形成され、第1の領域および第2の領域が前記受容体内で互いに隣接して配置され、それによって抗体の抗原結合部位が、エピトープを形成している第1の領域および第2の領域に結合することが可能になる、抗体が提供される。

**【 0 0 1 7 】**

一実施形態において、上記のエピトープが抗体に結合した形の免疫複合体が提供される。  
。

10

**【 0 0 1 8 】**

別の実施形態において、それぞれN末端残基およびC末端残基によって画定されるN末端領域およびC末端領域を含むペプチドであって、

N末端領域が、配列HNYTTRN1L(配列番号2)または少なくとも4残基のその断片を含み、

C末端領域が、プロリン、アラニン、またはグリシンであるC末端残基を含み、

N末端領域のC末端残基がC末端領域のN末端残基に共有結合しており、

C末端領域のC末端残基が、長さ約10～40オングストロームのリンカーによって別のペプチドに連結されており、

前記別のペプチドが、配列

KTTNVSLYPGYNFRYAKYYKENNVEKTLIKVFGIRFDILVFGTGGKFD(配列番号6)または少なくとも4残基のその断片からなる、ペプチドが提供される。  
。

20

**【 0 0 1 9 】**

さらに別の実施形態において、式(A)(Xn)(B)で定義されるペプチドであって、

(A)が、アミノ酸配列GHNYTTRN1LP(配列番号8)または少なくとも4アミノ酸のその断片であり、

(Xn)が、1つまたは複数のアミノ酸残基からなる長さ10～40オングストロームのリンカーであり、

(B)が、アミノ酸配列AKYYKENNVEK(配列番号9)または少なくとも4アミノ酸のその断片である、ペプチドが提供される。

**【 0 0 2 0 】**

30

別の実施形態において、以下の配列:GHNYTTRN1LPGAGAKYYKENNVEK(配列番号10)を有するペプチドが提供される。

**【 0 0 2 1 】**

さらに別の実施形態において、上記のペプチドが抗体に結合した形の免疫複合体が提供される。一般には、抗体は非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しない。

**【 0 0 2 2 】**

さらに別の実施形態において、非特異性P2X<sub>7</sub>受容体に結合する抗体を産生させるための上記ペプチドの使用が提供される。

**【 0 0 2 3 】**

40

さらに別の実施形態において、個体が癌を有するかどうかを判定するための上記抗体の使用が提供される。

**【 0 0 2 4 】**

さらに別の実施形態において、癌を有する個体を治療するための上記抗体の使用が提供される。

**【 0 0 2 5 】**

さらに別の実施形態において、上記抗体と、場合によって、

上記ペプチドと

を含むキットであって、癌の診断または治療における使用説明書を含むキットが提供される。

50

**【発明を実施するための形態】****【0026】**

ここで、本発明の特定の実施形態に関して詳細を参照する。本発明は実施形態と併せて説明するが、当然のことながら、その意図は本発明をそれらの実施例に限定することではない。逆に、本発明は、特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲内に含めることができる全ての代替、改変、および同等のものを包含するものとする。

**【0027】**

当業者は、本明細書に記載のものと同様または等価であり、本発明の実施において使用することができる多くの方法および材料を認識されよう。本発明は、記載した方法および材料に決して限定されない。

10

**【0028】**

当然のことながら、本明細書で開示し、定義した本発明は、本文または図面で言及した、またはそこから明らかである個々の特徴の2つ以上の代替の組み合わせ全てに及ぶ。それらの異なる組み合わせは全て、本発明の種々の代替態様を構成する。

**【0029】**

文脈上他の解釈が必要な場合を除いて、本明細書で使用する「含む(comprise)」という用語ならびに「含んでいる(comprising)」、「含む(comprises)」および「含んだ(comprised)」などのその用語の変化形は、別の付加物、構成要素、整数またはステップを除外するものではない。

**【0030】**

20

本明細書で参照した全ての特許および出版物は、その全体が参考により組み込まれている。

**【0031】**

本発明時に入手可能な、生細胞で発現している非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に対する抗P2X<sub>7</sub>抗血清は、全てポリクローナルであった。

**【0032】**

本発明者らは、非ATP結合性P2X<sub>7</sub>受容体(別名「非機能性受容体」として公知である)で独占的に発現するエピトープを同定した。このエピトープおよびこのエピトープを形成するペプチドは、生細胞で発現している非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するモノクローナル抗体を生成するために有用であることがわかっている。

30

**【0033】**

細胞、例えば上皮細胞の細胞内または細胞上での非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現が、上皮癌などの多くの癌および他の状態についてのバイオマーカーであると考えられているため、生細胞結合性が重要である。したがって、生細胞に結合するモノクローナル抗体を用いると、抗体それ自体または抗体-細胞傷害性薬剤コンジュゲートのいずれかの形で、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現を特徴とする幅広い疾患に対して全身性治療を提供することができる。非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現を特徴とする疾患のin vivoにおけるイメージングおよび診断、またはモニタリングを提供することも可能になる。

**【0034】**

本発明者らは、本明細書でさらに説明している詳細な分子モデリングから、P2X<sub>7</sub>受容体、すなわちP2X<sub>7</sub>単量体から形成された三量体においてのみエピトープが見られることを観察した。より具体的には、エピトープは、三量体P2X<sub>7</sub>受容体内の隣接するP2X<sub>7</sub>単量体にまたがる。したがって、非機能性三量体受容体と同じように整列していない個々のP2X<sub>7</sub>単量体はエピトープを含有しない。このことにより、腫瘍の病期決定が有利に可能になる。これは、単量体P2X<sub>7</sub>受容体と三量体P2X<sub>7</sub>受容体の両方に結合する抗体を用いると、行うのが難しい。

40

**【0035】**

本明細書を解釈するために、下記の定義が一般に適用され、必要に応じて、単数形で使用されている用語は複数も含み、またその逆も同様である。明記した任意の定義が、参照により本明細書に組み込まれている任意の文献と矛盾する場合、下記に明記した定義がま

50

さるものとする。

【0036】

「プリン受容体」は、一般に、リガンドとしてプリン(ATPなど)を使用する受容体を指す。

【0037】

「P2X<sub>7</sub>受容体」は、一般に、3つのタンパク質のサブユニットまたは単量体から形成され、その単量体の少なくとも1つが、配列番号1に示したようなアミノ酸配列を実質的に有するプリン受容体を指す。P2X<sub>7</sub>受容体は、3つの単量体から形成されるという点で「三量体(trimer)」または「三量体の(trimeric)」である。「P2X<sub>7</sub>受容体」は、下記の通り機能性受容体または非機能性受容体でありうる。「P2X<sub>7</sub>受容体」は、P2X<sub>7</sub>受容体の自然に発生する変異体、例えば、P2X<sub>7</sub>単量体が、自然に発生する、P2X<sub>7</sub>受容体を形成する単量体の切断型または分泌型(例えば、細胞外ドメイン配列からなる型またはその切断型)、自然に発生する変異型(例えば、二者択一的にスプライスされた型)および天然に発生する対立遺伝子変異体を含めたスプライス変異体、対立遺伝子変異体およびアイソフォームであるものを包含する。本発明の特定の実施形態において、本明細書で開示した天然配列のP2X<sub>7</sub>単量体ポリペプチドは、配列番号1に示したアミノ酸配列全長を含む成熟または全長の天然配列ポリペプチドである。特定の実施形態において、P2X<sub>7</sub>受容体は、改変されたアミノ酸配列を有してよく、例えば、配列番号1に示した配列内の種々のアミノ酸が置換、削除されてよく、または残基が挿入されてよい。

10

【0038】

「機能性P2X<sub>7</sub>受容体」は、一般に、P2X<sub>7</sub>受容体の、ATPに結合するための結合部位または間隙を有する型を指す。ATPに結合すると、受容体はサイトゾルへのカルシウムイオンの移入を可能にする、孔に似た構造を形成し、その1つの結果はプログラム細胞死である。正常な恒常性において、機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現は一般に胸腺細胞、樹状細胞、リンパ球、マクロファージおよび単球などの、プログラム細胞死を受ける細胞に限定されている。赤血球でも機能性P2X<sub>7</sub>受容体が一部発現しうる。

20

【0039】

「非機能性P2X<sub>7</sub>受容体」は、一般に、P2X<sub>7</sub>受容体の単量体の1つまたは複数がPro210(配列番号1による)においてシス異性化を有する型を指す。異性化は、例えば、単量体の一次配列の突然変異または異常な転写後プロセシングを含めた、単量体のミスフォールディングを導く任意の分子事象から発生しうる。異性化の1つの結果は、受容体がATPに結合できないことである。この状況では、受容体は孔を形成することができず、これにより、サイトゾルに入ることができるカルシウムイオンの程度が限定される。非機能性P2X<sub>7</sub>受容体は、幅広い上皮癌および造血系癌で発現している。

30

【0040】

「抗体」または「免疫グロブリン」または「Ig」は、脊椎動物の血液中、または他の体液中に見られるガンマグロブリンタンパク質であり、抗原に結合し、それゆえ異物を同定および/または中和する免疫系において機能する。

【0041】

抗体は、一般に、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖でできているヘテロ四量体の糖タンパク質である。各L鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合している。2つのH鎖は、H鎖のアイソタイプに応じて1つまたは複数のジスルフィド結合によって互いに結合している。各H鎖および各L鎖は、規則的に間隔があいた鎖内ジスルフィド架橋も有する。

40

【0042】

H鎖およびL鎖は特異的なIgドメインを画定する。より具体的には、各H鎖は、N末端に可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を有し、続いて、鎖および鎖それぞれについては3つの定常ドメイン(C<sub>H</sub>)、およびμおよびのアイソタイプについては4つのC<sub>H</sub>ドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン(V<sub>L</sub>)、続いてもう一方の末端に定常ドメイン(C<sub>L</sub>)を有する。V<sub>L</sub>はV<sub>H</sub>と並列しており、C<sub>L</sub>は重鎖の第1の定常ドメイン(C<sub>H</sub>1)と並列している。

50

## 【0043】

抗体は、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンにはIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの5つのクラスがあり、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、および $\mu$ と呼ばれる重鎖を有する。および $\gamma$ のクラスは、C<sub>H</sub>配列および機能の比較的小さい相違に基づいてサブクラスにさらに分けられ、例えば、ヒトでは以下のサブクラス:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2が発現される。任意の脊椎動物種からのL鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパおよびラムダと呼ばれる2つの明らかに異なる種類のうちの1つに割り当てることができる。

## 【0044】

定常ドメインは、ジスルフィドによって結びついた両H鎖のカルボキシ末端部を含むFc部を含む。ADCCなどの抗体のエフェクター機能は、Fc領域内の配列によって決定され、その領域は、ある種類の細胞に見られるFc受容体(FcR)によって認識される部分でもある。

10

## 【0045】

V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>の対は、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを含む「可変領域」または「可変ドメイン」を一緒に形成する。重鎖の可変ドメインは「VH」と称することができる。軽鎖の可変ドメインは「VL」と称することができる。Vドメインは、抗原結合性に影響し、特定の抗体の特定の抗原に対する特異性を規定する「抗原結合部位」を含有する。V領域は、約110アミノ酸残基に及び、それぞれ9~12アミノ酸長の「超可変領域」と呼ばれる非常に可変性の短い領域(一般に約3つ)と分離された15~30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变のひと配列(一般に約4つ)からなる。FRは、大部分にシート配置が取り入れられ、超可変領域が連結ループを形成し、場合によってはシート構造の一部を形成している。

20

## 【0046】

「超可変領域」は、配列が超可変的かつ/または構造的に画定されたループを形成する抗体の可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、VHに3つ(H1、H2、H3)、およびVLに3つ(L1、L2、L3)の6つの超可変領域を含む。

## 【0047】

「フレームワーク」残基または「FR」残基は、本明細書で定義した超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

30

## 【0048】

「無処置の」または「全」抗体は、抗原結合部位ならびにC<sub>L</sub>および少なくとも重鎖の定常ドメイン、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3を含む抗体である。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列変異体であってよい。

## 【0049】

「可変ドメインを含む全抗体断片」としては、抗体断片から形成されるFab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、およびFv断片;二重特異性抗体;直鎖状抗体;单鎖抗体分子;および多選択性抗体が挙げられる。

## 【0050】

「Fab断片」は、L鎖全体に加えて、H鎖の可変領域ドメイン(V<sub>H</sub>)、および重鎖の第1の定常ドメイン(C<sub>H</sub>1)からなる。各Fab断片は、抗原結合性に関して一価である、すなわち、单一の抗原結合部位を有する。

40

## 【0051】

「Fab'断片」は、C<sub>H</sub>1ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域からの1つまたは複数のシステインを含む追加の数残基を有することによりFab断片と異なる。Fab'-SHは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基(1つまたは複数)に遊離のチオール基を持つFab'に対する呼称である。

## 【0052】

「F(ab')<sub>2</sub>断片」は、2つのジスルフィド結合したFab断片にほぼ相当し、二価の抗原結合活性を有し、なお抗原に架橋することができる。

50

## 【0053】

「Fv」は、完全な抗原認識、結合部位を含有する最小の抗体断片である。この断片は、1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインが非共有結合的に緊密に関連した二量体からなる。

## 【0054】

单鎖Fv(scFv)種では、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインは可動性ペプチドリンクによって共有結合することができ、それによって軽鎖と重鎖は二本鎖Fv種の構造に類似した「二量体」構造で関連することができる。これらの2つのドメインのフォールディングから、6つの超可変ループ(H鎖およびL鎖からそれぞれ3つのループ)が発し、それによって抗原に結合するためのアミノ酸残基がもたらされ、抗体に抗原結合の特異性が付与される。10

## 【0055】

「单鎖Fv」は、「s Fv」または「sc Fv」とも略される、連結されて单一のポリペプチド鎖を形成するV<sub>H</sub>抗体ドメインとV<sub>L</sub>抗体ドメインを含む抗体断片である。scFvポリペプチドは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインの間に、scFvが抗原に結合するために望ましい構造を形成できるようにするポリペプチドリンクをさらに含むことが好ましい。

## 【0056】

「单一の可変ドメイン」は、Fvの半分(抗原に特異的な3つのCDRのみを含む)であり、結合部位全体に比べて親和性が低いが、抗原を認識し結合することができる。20

## 【0057】

「二重特異性抗体」は、2つの抗原結合部位を持つ抗体断片を指し、その断片は、同一のポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン(VL)に連結した重鎖可変ドメイン(VH)を含む(VH-VL)。小さい抗体断片は、鎖間ではなく鎖内でのVドメインの対合が実現され、二価の断片、すなわち2つの抗原結合部位を有する断片がもたらされるようにV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインの間に短いリンク(約5~10残基)を持つsFv断片(前述の段落を参照されたい)を構築することによって調製する。

## 【0058】

二重特異性抗体は、二価または二重特異性でありうる。二重特異性抗体は、2つの抗体のV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する、2つの「クロスオーバー」sFv断片のヘテロ二量体である。三重特異性抗体および四重特異性抗体も、当技術分野で一般に知られている。30

## 【0059】

「単離された抗体」は、それが以前から存在している環境の構成要素から同定および分離および/または回収された抗体である。汚染成分は、抗体の治療への使用を妨げるであろう材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を挙げることができる。

## 【0060】

「ヒト抗体」は、ヒトによって產生される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有する抗体を指す。ヒト抗体は、ファージ提示ライブラリーを含めた当技術分野で公知の種々の技法を使用して產生させることができる。ヒト抗体は、抗原による攻撃に応答してそのような抗体を產生するが、内生遺伝子座は無能になるように改変されたトランスジェニック動物に抗原を投与することによって調製することができる。40

## 【0061】

非ヒト(例えばげっ歯類)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト抗体由来の最小限の配列を含有するキメラ抗体である。大抵の場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン(レピシエント抗体)の超可変領域からの残基が、所望の抗体特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト靈長類などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域からの残基で置き換えられているものである。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レピシエント抗体内またはドナー抗体内には見られない残基を含んでよい。これら50

の改変は、抗体の性能をさらに磨くために行う。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、一般には2つの可変ドメインを実質的に全部含み、全部または実質的に全部の超可変ループが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに相当し、全部または実質的に全部のFRがヒト免疫グロブリン配列のFRである。ヒト化抗体は、場合によって、免疫グロブリン定常領域(Fc)、一般にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部も含む。

#### 【0062】

「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少量存在しうる、可能性がある自然に発生する突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、抗原の単一の抗原性部位または抗原決定基を対象とする。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は他他の抗体によって汚染されずに合成することができるという点で有利である。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマの方法体系によって調製することができる。「モノクローナル抗体」は、その技法を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

#### 【0063】

「抗P2X<sub>7</sub>受容体抗体」または「P2X<sub>7</sub>受容体に結合する抗体」という用語は、その抗体がP2X<sub>7</sub>受容体、一般には非機能性P2X<sub>7</sub>受容体を標的とする診断薬剤および/または治療薬剤として有用であるように、十分な親和性でP2X<sub>7</sub>受容体に結合することができる抗体を指す。P2X<sub>7</sub>受容体抗体の、関係ないP2X<sub>7</sub>受容体タンパク質への結合の程度は、例えば、放射免疫測定法(RIA)によって測定される、抗体のP2X<sub>7</sub>受容体への結合の約10%未満であることが好ましい。特定の実施形態において、P2X<sub>7</sub>受容体に結合する抗体は、<1 μM、<100nM、<10 nM、<1nM、または<0.1nMの解離定数(Kd)を有する。抗非機能性P2X<sub>7</sub>受容体抗体は、一般に、一部または全てのこれらの血清学的特性を有するものであり、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しない。

20

#### 【0064】

「親和性成熟した」抗体は、1つまたは複数の超可変領域に1つまたは複数の変化を持つ、それによって、それらの変化(1つまたは複数)を有さない親抗体と比較して抗原に対する抗体の親和性が改善された抗体である。好ましい親和性成熟した抗体は、標的抗原に対してナノモルまたはピコモルまでの親和性を有する。親和性成熟した抗体は、当技術分野で公知の手順によって產生される。

30

#### 【0065】

「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物活性を阻害または縮小する抗体である。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的または完全に阻害する。

#### 【0066】

本明細書で使用する「アゴニスト抗体」は、対象のポリペプチドの少なくとも1つの機能活性を模倣する抗体である。

#### 【0067】

「結合親和性」は、一般に、分子(例えば抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)の間の非共有結合性相互作用の合計の強度を指す。他に指定のない限り、本明細書で使用する「結合親和性」は、結合対(例えば抗体と抗原)のメンバー間の1:1相互作用を反映する内因性の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(Kd)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載の方法を含めた、当技術分野に公知の共通方法によって測定することができる。親和性が低い抗体は、一般に、抗原にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向があるが、一方親和性が高い抗体は、一般に、抗原にすばやく結合し、長く結合したままである傾向がある。結合親和性を測定する種々の方法は当技術分野で公知であり、その方法はどれも本発明の目的のために使用することができる。

40

#### 【0068】

「エピトープ」は、一般に、抗体の抗原結合部位が結合する抗原の部分を指す。エピト

50

ープは、抗原結合部位を形成する抗体CDRの超可変ループが、タンパク質の一次構造に見られるようなアミノ酸配列に結合するという意味で「直鎖状」でありうる。特定の実施形態において、エピトープは「立体構造エピトープ」、すなわち、CDRの超可変ループが、タンパク質の三次構造または四次構造に存在するような残基に結合するエピトープである。

【 0 0 6 9 】

一実施形態において、P2X<sub>7</sub>受容体のエピトープであって、前記エピトープが、P2X<sub>7</sub>受容体の第1の単量体の一領域の形である第1の領域と、前記受容体の第2の単量体の一領域の形である第2の領域とから形成され、

第1の領域および第2の領域が、前記受容体の単量体の配列番号1の210位の残基のシス異性化によって前記受容体内に形成され、

第1の領域および第2の領域が前記受容体内で互いに隣接して配置され、それによって抗P2X<sub>7</sub>抗体の抗原結合部位が、エピトープを形成している第1の領域および第2の領域に結合することが可能になる、エピトープが提供される。

【 0 0 7 0 】

一般には、エピトープは立体構造エピトープである。これらの実施形態において、第1の領域および第2の領域はそれぞれ、それが1つまたは複数の配列番号1の残基を含む分子空間を画定する。一般には、第1の領域は、配列番号1に示した配列を有する単量体のPro210のシス異性化の結果として抗体の抗原結合部位への結合にさらされる、配列番号1の残基の1つまたは複数を含む分子空間を画定する領域である。これらの残基として、Gly200、His201、Asn202、Tyr203、Thr204、Thr205、Arg206、Asn207、Ile208、Leu209およびPro210が挙げられる。一実施形態において、第1の領域は、これらの残基の少なくとも1つを含む。一般には、第1の領域は、これらの残基の少なくとも4つを含むが、第2の領域にいくつの残基が存在するかによって、少なくなる可能性があり、例えば2つまたは3つである。一実施形態において、第1の領域は、下記のTable1(表1)に示した残基対を少なくとも1つ含む。

【 0 0 7 1 】

10

20

## 【表1】

Table1

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

## 【0072】

特定の実施形態において、第1の領域は、Table2(表2)に示した残基対を2つ以上含む。

## 【0073】

第1の領域は、そのうえ、2つの細胞外ドメインの折りたたみのうち大きい方のATP結合部位の形成に密接に関与する1つまたは複数の周辺残基を含有しうる。これらは、Lys193、Phe275およびArg294である。Arg125は、2つの細胞外ドメインの折りたたみのうち小さい方に位置する。したがって、特定の実施形態において、第1の領域は、配列番号1の以下の残基:Arg125、Lys193、Phe275およびArg294の1つまたは複数をさらに含む。当然のことながら、第1の領域は、これらの残基単独からなるのではない。つまり、第1の領域は、上記で考察したように、配列番号1に示した配列を有する単量体のPro210のシス異性化の結果として、抗体の抗原結合部位への結合にさらされる、配列番号1の残基の1つまたは複数を含む分子空間を画定する。この状況では、Arg125、Lys193、Phe275およびArg294は追加的にのみもたらされるが、例えば、残基Gly200、His201、Asn202、Tyr203、Thr204、Thr205、Arg206、Asn207、Ile208、Leu209の1つまたは複数と交替しない。

## 【0074】

一般には、第2の領域は、配列番号1に示した配列を有する単量体のPro210のシス異性化

10

20

30

40

50

の結果として、抗体の抗原結合部位への結合にさらされる、配列番号1の残基の1つまたは複数を含む分子空間を画定する領域である。これらの残基としては、Lys297、Tyr298、Tyr299、Lys300、Glu301、Asn302、Asn303、Val304、Glu305およびLys306が挙げられる。一実施形態において、第2の領域は、これらの残基の少なくとも1つを含む。一般には、第2の領域は、これらの残基の少なくとも4つを含むが、第1の領域にいくつの残基が存在するかによって、少なくなる可能性があり、例えば2つまたは3つである。一実施形態において、第2の領域は、下記のTable2(表2)に示した残基対を少なくとも1つ含む。

## 【0075】

## 【表2】

Table2

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

10

20

30

40

## 【0076】

特定の実施形態において、第2の領域はTable2(表2)に示した残基対を2つ以上含む。

## 【0077】

第2の領域は、そのうえ、ATP結合部位の形成に密接に関与する1つまたは複数の周辺残基を含有しうる。これらは、Arg307およびLys311である。したがって、特定の実施形態において、第2の領域は、Arg307および/またはLys311をさらに含む。当然のことながら、第2の領域は、これらの残基単独からなるのではない。つまり、第2の領域は、上記で考察したように、配列番号1に示した配列を有する单量体のPro210のシス異性化の結果として、抗体の抗原結合部位への結合にさらされる、配列番号1の残基の1つまたは複数を含む分子

50

空間を画定する。この状況では、Arg307およびLys311は追加的にのみもたらされるが、例えば、残基Lys297、Tyr298、Tyr299、Lys300、Glu301、Asn302、Asn303、Val304、Glu305およびLys306の1つまたは複数と交替しない。

【0078】

特定の実施形態において、エピトープは、直鎖状エピトープである、または直鎖状エピトープを含む。例として、第1の領域が、Table3(表3)の配列番号1の下記の配列の1つを含む場合が挙げられる。

【0079】

【表3】

Table3

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

10

20

30

【0080】

これらの実施形態において、エピトープの第2の領域は、Table4(表4)の配列番号1の下記の配列の1つを含んでよい。

【0081】

【表4】

Table4

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

40

【0082】

特定の実施形態において、第1の領域は、第2の領域よりも多くの残基を含有する。他の実施形態において、第2の領域は、第1の領域よりも多くの残基を含有する。

【0083】

50

第1の領域および第2の領域は、それぞれ約4～約10残基、例えば、5残基、6残基、7残基、8残基または9残基を含有する。第2の領域の残基の方が多い場合、第1の領域の残基は少なくなりうる、すなわち4以下、例えば2または3である。その逆も同様である。

#### 【0084】

本明細書に記載の通り、第1の領域および第2の領域は、受容体内で互いに隣接して配置され、それによって抗P2X<sub>7</sub>抗体の抗原結合部位が、エピトープを形成している第1の領域および第2の領域に結合することが可能になる。より詳細には、本発明者らは、別々の単量体上に位置しているにもかかわらず、第1の領域と第2の領域は共同して、抗体の単一の抗原結合部位が結合することができるエピトープを形成することを発見した。一般に、エピトープの第1の領域と第2の領域とは、約40オングストローム以下離れている。この距離がこれよりも大きい場合、抗原結合部位が、受容体内の単量体を横切って長距離をわたる必要があり、その場合結合する残基が少ないので、抗体の結合親和性は減少する傾向にある。一般に、第1の領域と第2の領域は約10オングストローム離れているが、15オングストローム、20オングストローム、25オングストローム、30オングストローム、35オングストロームなど、40オングストローム未満の長距離も可能である。10

#### 【0085】

本明細書に記載のエピトープは、実質的に精製または単離された形で、例えば、天然のP2X<sub>7</sub>受容体の断片として、または合成P2X<sub>7</sub>受容体として提供することができる。

#### 【0086】

他の実施形態において、上記のエピトープを含むP2X<sub>7</sub>受容体が提供される。一般には、受容体の少なくとも1つの単量体は、実質的に配列番号1に示したようなアミノ酸配列を有する。受容体は、P2X<sub>7</sub>受容体の自然に発生する変異体、例えば、P2X<sub>7</sub>単量体が、自然に発生する、P2X<sub>7</sub>受容体を形成する単量体の切断型または分泌型(例えば、細胞外ドメイン配列からなる型またはその切断型)、自然に発生する変異型(例えば、二者択一的にスプライスされた型)および天然に発生する対立遺伝子変異体を含めたスプライス変異体、対立遺伝子変異体およびアイソフォームであるものであってよい。本発明の特定の実施形態において、天然配列のP2X<sub>7</sub>単量体ポリペプチドは、配列番号1に示したアミノ酸配列全長を含む成熟または全長の天然配列ポリペプチドである。特定の実施形態において、P2X<sub>7</sub>受容体は、改変されたアミノ酸配列を有してよく、例えば、配列番号1に示した配列内の種々のアミノ酸が置換、削除されてよく、または残基が挿入されてよい。2030

#### 【0087】

一般には、受容体は、上記のエピトープを含む非機能性P2X<sub>7</sub>受容体である。シス異性化は、例えば、単量体の一次配列の突然変異または異常な転写後プロセシングを含めた単量体のミスフォールディングを導く任意の分子事象から生じうる。特定の実施形態において、受容体の一部の単量体は、単量体の210位の残基にシス異性化を有し、例えば、受容体の1つまたは2つの単量体が配列番号1の210位の残基にシス異性化を有してよい。

#### 【0088】

受容体は、実質的に精製または単離された形で提供することができる、すなわち、受容体は、細胞から単離することができ、固相または他の状態のいずれで提供されようと、受容体の均一試料の形であってよい。40

#### 【0089】

以下に詳細を記載する通り、本発明者らは、上記のエピトープに結合するための抗原結合部位を有する抗体を生成した。したがって、特定の実施形態において、上記のエピトープに結合する抗体が提供される。

#### 【0090】

一般には、抗原結合部位(または可変ドメイン)の少なくとも1つの相補性決定領域((CDR)(または超可変領域))がエピトープの第1の領域に結合し、少なくとも1つの他の抗原結合部位のCDRがエピトープの第2の領域に結合する。一部の実施形態において、2つのCDRが第1の領域に結合し、他のCDRが第2の領域に結合する。他の実施形態において、2つのCDRが第2の領域に結合し、他のCDRが第1の領域に結合する。一部の実施形態において、1つのCD50

Rが第1の領域に結合し、別のCDRが第2の領域に結合し、残りのCDRはエピトープの第1の領域と第2の領域のいずれにも結合しない。

**【0091】**

特定の実施形態において、抗非機能性P2X<sub>7</sub>受容体抗体であって、その抗原結合部位が上記のTable1(表1)からの残基対の少なくとも1つ、および上記Table2(表2)からの残基対の少なくとも1つに結合する、抗体が提供される。

**【0092】**

他の実施形態において、抗非機能性P2X<sub>7</sub>受容体抗体であって、その抗原結合部位が上記のTable3(表3)からの配列の少なくとも1つ、および上記のTable4(表4)からの配列の少なくとも1つに結合する、抗体が提供される。

10

**【0093】**

他の実施形態において、上記エピトープが抗体に結合した形の免疫複合体が提供される。一般には、エピトープはP2X<sub>7</sub>受容体上にもたらされる。受容体の全てのエピトープに抗体が結合してよく、または受容体の一部の、例えば3つ未満のエピトープのみに抗体が結合する。複合体は、受容体よりも多くの抗体分子または受容体よりも少ない抗体分子を含有してよい。

**【0094】**

本明細書に記載の通り、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の3次元モデルを使用して、本発明者らは、本発明のエピトープに結合する抗体を産生させるために使用することができるペプチドの範囲を決定した。したがって、特定の実施形態において、それぞれN末端残基およびC末端残基によって画定されているN末端領域およびC末端領域を含むペプチドであって、N末端領域が、下記の配列：

20

- ・ HNYTTRNIL(配列番号2);
- ・ GHNYTTRNIL(配列番号3);
- ・ DFPGHNYTTRNIL(配列番号4);
- ・ 配列番号2～4の少なくとも4残基の断片；
- ・ 配列番号2～4のいずれか1つの配列(D残基は、E残基、N残基またはQ残基で保存的に置換されていてもよく、F残基は、Y残基またはW残基で保存的に置換されていてもよく、G残基は、A残基、V残基、L残基またはI残基で保存的に置換されていてもよく、H残基は、K残基またはR残基で保存的に置換されていてもよく、N残基は、D残基、E残基またはQ残基で保存的に置換されていてもよく、Y残基は、F残基またはW残基で保存的に置換されていてもよく、T残基は、C残基、S残基またはM残基で保存的に置換されていてもよく、R残基は、H残基またはK残基で保存的に置換されていてもよく、I残基は、G残基、A残基、V残基またはL残基で保存的に置換されていてもよく、L残基は、G残基、A残基、V残基またはI残基で保存的に置換されていてもよい);

30

- ・ MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIFSYVCFALVSDKLYQRKEPVISSVHTKVKGIAEVKEEIENGVKKLVHSVFDTADYTFPLQNSFFVMTNFLKTEGQEQRLLCPEYPTRRTLCSSDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRCVVHEGNQKTCEVSAWCPIEAVEEAPRALLNSAENFTVLIKNNIDFPG

HNYTTRNIL(配列番号5);または

40

・ C末端にHNYTTRNILを含む配列番号5の配列内の配列の1つを含み、

C末端領域が、プロリン、アラニンまたはグリシンであるC末端残基を含み、N末端領域のC末端残基がC末端領域のN末端残基に共有結合している、ペプチドが提供される。

**【0095】**

C末端領域は、シスの立体構造のプロリンの形の单一のアミノ酸残基からなる。あるいは、C末端領域は、プロリンのN末端に位置する他の残基を含んでよい。

**【0096】**

一般には、C末端領域のC末端残基は、長さが約10～40オングストロームのリンクアーカーによっ

50

て、別のペプチドに連結される。一実施形態において、別のペプチドは配列番号6の配列またはその4残基以上の断片からなる。一実施形態において、C末端領域は、シスの立体構造のプロリンであるC末端残基を含む。

#### 【 0 0 9 7 】

一実施形態において、別のペプチドは、P2X<sub>7</sub>受容体配列由来であり、配列番号1のP2X<sub>7</sub>受容体のわずか594残基を有する。特に、別のペプチドは、配列番号6の配列または配列番号6内の配列からなってよい。これらの配列番号6内のペプチドの例として、Table5(表5)に記載の配列を有するペプチドが挙げられる(図1による番号付け)。

#### 【 0 0 9 8 】

【表5】

10

Table5

K281～K297	Y298～G314	
T282～Y298	Y299～I315	
T283～Y299	K300～R316	
N284～K300	E301～F317	
V285～E301	N302～D318	20
S286～N302	N303～I319	
L287～N303	V304～L320	
Y288～V304	E305～V321	
P289～E305	K306～F322	
G290～K306	R307～G323	30
Y291～R307	T308～T324	
N292～T308	L309～G325	
F293～L309	I310～G326	
R294～I310	K311～K327	
Y295～K311	V312～F328	
A296～V312	F313～D329	40
K297～F313		

#### 【 0 0 9 9 】

Table5(表5)に示したペプチドの長さは、6～17残基であってよい。一実施形態において、ペプチド断片は、配列KYKKENNVEKRTLIKVF(配列番号7)からなるK297～F313である。

#### 【 0 1 0 0 】

C末端領域は、任意の適切なリンカーと一緒に使用することができる任意の適切なコンジュゲート反応によって別のペプチドに結合または連結することができる。リンカーは、

50

免疫原性を補助し、空間的な干渉を最小限にする特定の長さであってよい。例えば、リンカーニーの長さは10～40の間であってよい。リンカーニーの長さは10または20であることが好ましい。

#### 【0101】

リンカーニーは、1つまたは複数のアミノ酸残基のアミノ酸リンカーニーであってよい。しかし、「アミノ酸リンカーニー」という用語は、そのようなリンカーニーが独占的にアミノ酸残基からなることを意味するものではない。アミノ酸リンカーニーは、本発明のペプチドを実質的に妨げない任意のアミノ酸配列であってよい。

#### 【0102】

アミノ酸リンカーニーのアミノ酸残基は、天然アミノ酸または人工アミノ酸であり、全てがL型または全てがD型またはその混合物であることが好ましい。例えば、アミノ酸は、グリシン、アラニン、ロイシン、セリン、バリンおよびスレオニンから選択することができる。リンカーニーは、グリシンおよびアラニンから選択される1つまたは2つのアミノ酸からなることが好ましい。

#### 【0103】

特定の実施形態において、式(A)(Xn)(B)で定義されるペプチドであって、  
(A)が、アミノ酸配列GHNYTTRNILP(配列番号8)または少なくとも4アミノ酸のその断片であり、  
(Xn)が、1つまたは複数のアミノ酸残基からなる長さ10～40オングストロームのリンカーニーであり、  
(B)が、アミノ酸配列AKYYKENNVEK(配列番号9)または少なくとも4アミノ酸のその断片である、  
ペプチドが提供される。

#### 【0104】

他の実施形態において、下記の配列:GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK(配列番号10)を有するものが提供される。

#### 【0105】

本発明のペプチドは、固相合成および組換えDNA技術を含めた、任意の数の当技術分野で公知の技法によって作製することができる。

#### 【0106】

当技術分野で公知の通り、担体は、免疫原性を増強するために、エピトープを形成しているペプチドにコンジュゲートする物質である。一部の担体は、免疫応答を発生させる宿主に、分子量が増加した抗原を提供するために多数の担体に結合させることによってこれをを行う。

#### 【0107】

好ましい担体としては、細菌性の毒素またはトキソイドが挙げられる。他の適切な担体としては、髄膜炎菌(*N. meningitidis*)の外膜タンパク質、ウシ血清アルブミンなどのアルブミン、合成ペプチド、熱ショックタンパク質、百日咳タンパク質、インフルエンザ菌(*H. influenza*)からのプロテインDおよびクロストリジウム・ディフィシル(*C. difficile*)からの毒素A、毒素Bまたは毒素Cが挙げられる。

#### 【0108】

担体が細菌性の毒素またはトキソイドの場合、ジフェリアトキソイドまたは破傷風トキソイドが好ましい。

#### 【0109】

担体は、本発明のペプチドと反応することができる、または本発明のペプチドと反応できるように改変することができる官能基を含有することが好ましい。

#### 【0110】

上記の通り、本発明のペプチドは、生細胞の非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、生細胞の機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しないモノクローナル抗体を生成するために有用である。別の利点は、これらのペプチドが、生細胞の機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、生細胞の非機

10

20

30

40

50

能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しないモノクローナル抗体を生成するためにも使用できることである。

#### 【0111】

後者の抗体は、抗体療法を全身的に適用することができる個体を選択するために使用できるため、特に重要である。より詳細には、集団の大多数がリンパ組織などの組織の機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現を調節する対立遺伝子を含有する。これらの組織区画における受容体の発現は、完全に正常な生理機能であると理解される。対照的に、集団のごく少数は、これらの組織区画に非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現を調節する1つまたは複数の対立遺伝子を有する。後者の集団に、癌を治療するために、生細胞で発現している非機能性受容体に結合する抗体を与えた場合、この治療は、非機能性受容体が発現しているリンパ系細胞を排除すると思われるため、免疫系に影響を与える危険性がある。10

#### 【0112】

したがって、生細胞の機能性受容体に結合するが、非機能性受容体には結合しない、本明細書に記載の本発明の抗体は、抗体療法を与えないか、そうでなければ適切に改変した形で与えるかするべきである個体を選択するのを助けるために特に有用である。そのようなアッセイは、非機能性受容体に対する抗体を使用した同ースクリーニングと併せて使用することができる。このようにして、リンパ組織に機能性受容体を持つ患者およびリンパ組織に非機能性受容体を持つ患者を、機能性または非機能性いずれかの受容体の発現レベルが低い患者から分離することができる。各抗体を併せて使用することにより、非機能性受容体に対する治療用抗体を用いた患者の状態の治療に付随するその患者の免疫細胞が欠乏した結果、少なくとも密接なモニタリングを必要とする患者を区別することが可能になる。20

#### 【0113】

特定の実施形態において、生細胞で発現している機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しない抗体が提供される。他の実施形態において、生細胞で発現している非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しない抗体が提供される。一般には、これらの抗体は、本発明のペプチドに対して生じさせたものである。

#### 【0114】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、抗体分子全体として $10^{-7}M \sim 10^{-13}M$ の範囲の親和性を有するが、好ましくはIgMとしてハイブリドーマ経路を使用する場合、産生される抗体によってハイブリドーマの増殖が阻害されるのを避けるために、 $10^{-7}M$ を必要とする傾向がある。これらの親和性は、抗体成熟を含めた当業者に公知の標準技法を使用して増加または減少させることができる。30

#### 【0115】

抗体は、モノクローナル抗血清またはポリクローナル抗血清から得られるものであってよい。抗体は、ハイブリドーマまたはファージ提示ライブラリーから産生させることができる。モノクローナル抗血清およびポリクローナル抗血清は、標準技法に従って、本発明のペプチドをアジュバントと一緒に用いて宿主を免疫することによって得ることができる。得られた血清は、生細胞で発現している受容体に血清を暴露させる、いくつもの血清学的技法のいずれを使用してもスクリーニングすることができる。40

#### 【0116】

本発明を使用することで、組換え発現を使用した抗体を提供することが可能になる。例えば、本発明のペプチドで免疫することによって生成した抗体のCDRについて配列決定し、コードするヌクレオチド配列を決定し、次に抗体を組換え合成するための発現ベクターにサブクローニングする。次にキメラ抗体、すなわち、ヒト可変ドメインおよび非ヒト定常ドメインを含有する抗体、ヒト化抗体、すなわち、ヒト抗体フレームワーク上に非ヒトCDRを移植することによって形成した抗体、ならびに完全ヒト抗体を開発する機会がもたらされる。

#### 【0117】

本発明の抗体は、例えば、癌の治療における抗体の有効性を増強するために、エフェク50

ター機能に関して改変することができる。例えば、抗体重鎖の定常領域を、マウス IgG2a アイソタイプ、マウス IgG2b アイソタイプまたはヒト IgG1 アイソタイプに変更することができる。このように生成した抗体は、改善された細胞障害性(ADCC)または補体媒介細胞障害性(CMC)を有しうる。別の改変では、Fc 領域からフコースを削除することができ、または、Fc 領域にシアル酸残基を導入することができる。このように生成した抗体も、増強されたADCC活性または増強されたCMC活性を有しうる。さらに別の改変では、Fc 領域にシスティン残基(1つまたは複数)を導入することができ、それによって、この領域における鎖内ジスルフィド結合の形成が可能になる。このように生成したホモ二量体抗体は、改善された内部移行能ならびに/または増加した補体媒介細胞死滅およびADCCを有しうる。増強された抗腫瘍活性を持つホモ二量体抗体は、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは、抗体は、改変Fc領域または混合Fc領域を有し、それによって増強された補体の溶解能およびADCC能を有しうるよう操作することができる。

## 【0118】

抗体は、任意のアイソタイプの抗体全体であってよい。抗体が抗体断片である場合、その抗体断片は、dAb、Fab、Fd、Fv、 $F(ab')_2$ 、scFv および CDR からなる群から選択される。

## 【0119】

抗体または断片は、ビーズ、表面または組織培養容器などの固相上に提供することができる。

## 【0120】

抗体またはその断片は、生細胞で発現している受容体への抗体またはその断片の結合を検出するための標識と一緒に提供することができる。

## 【0121】

抗体および断片は、医用イメージングにおいて使用するために標識することができる。そのような方法は、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$  を含めた放射線同位元素などの標識剤または造影剤の化学的付着、許容できる担体中の標識された抗体または断片の対象への投与、および標的部位における *in vivo* での標識された抗体または断片のイメージングを伴う。放射線標識された抗体またはその断片は、本明細書に記載の癌の *in vivo* イメージングにおいて特に有用でありうる。

## 【0122】

抗体は、当業者に公知の方法によって精製することができる。精製方法としては、とりわけ、選択的沈殿、液体クロマトグラフィー、HPLC、電気泳動、等電点電気泳動、および種々の親和性技法が挙げられる。

## 【0123】

一部の実施形態において、本明細書に記載の抗体は、多量体の形の抗体も含んでよい。例えば、本発明の抗体は、単量体免疫グロブリン分子の二量体、三量体、または高次多量体の抗体の形をとってよい。

## 【0124】

抗体の架橋結合は、当技術分野で公知の種々の方法によって成すことができる。例えば、抗体の架橋結合は、抗体の自然凝集によって、化学的もしくは組換えによる結合技法または当技術分野で公知の他の方法によって実現することができる。例えば、精製された抗体調製物は、抗体ホモ二量体、および他の高次抗体多量体を含有するタンパク質凝集体を自然に形成しうる。特定の実施形態において、対象の抗体に結合させるための第2の抗体を使用することによる抗体の架橋結合を使用してホモ二量体を形成することができる。架橋結合した抗体は、対象の抗体と比べて異なる動物由来のものであってよい。例えば、ヤギ抗マウス抗体(Fab特異的)をマウスモノクローナル抗体に加えてホモ二量体を形成することができる。この二価架橋結合抗体は、ホモ二量体を形成している対象の2つの抗体のFab領域またはFc領域を認識する。

## 【0125】

あるいは、抗体ホモ二量体は、当技術分野で公知の化学的結合技法によって形成することができる。化学的架橋結合は、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性であってよく、ホモ

10

20

30

40

50

二量体を形成している2つの抗体と共有結合する。一部の実施形態において、化学的架橋剤は、抗体の機能に影響を及ぼす恐れがあるので、抗体の抗原結合領域と相互作用しないことが望ましい。当業者には当然のことながら、抗体は、Fab領域で架橋結合することができる。

【0126】

本発明のさらに別の態様において、上記の抗体またはその断片を、生細胞で発現しているP2X<sub>7</sub>受容体に結合させることから形成した免疫複合体が提供される。受容体は、機能的または非機能的であってよい。

【0127】

別の実施形態において、抗体またはその断片を、上記のペプチドに結合させることから形成した免疫複合体が提供される。

10

【0128】

本発明の免疫複合体は、本発明のエピトープまたはペプチドを含むものを含め、in vitroまたはin vivoで検出されることが、前新生物および新生物を含めた疾患または状態の存在を示している、またはその素因であるので、特に重要である。

【0129】

さらに、上記の通り、上記の抗体またはその断片が生細胞の機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合することから形成される免疫複合体を検出することは、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現を特徴とする疾患または状態を治療するための患者の適合性についての重要な指標である。少数の集団が、胸腺細胞、樹状細胞、リンパ球、マクロファージおよび単球などの造血細胞で、P2X<sub>7</sub>受容体を非機能性の状態で正常に発現する。したがって、例えば、他の、非造血細胞で非機能性P2X<sub>7</sub>受容体が存在することに起因する癌である危険性がある、またはそれを有すると確認された対象において、非機能性受容体についてのこのホモ接合性表現型を同定できることが重要である。

20

【0130】

本発明の免疫複合体を同定することは、ヘテロ接合性の非機能性P2X<sub>7</sub>受容体表現型を有する対象に有益であるとも考えられている。非機能性P2X<sub>7</sub>受容体を標的とする治療を仕立て、用量設定し、その表現型を考慮に入れることができる。

【0131】

これらの検出方法について、以下に詳細に記載する。

30

【0132】

免疫複合体に含まれる抗体または抗体断片は、ビーズまたはプレートなどの固相に付着させ、免疫複合体が形成された際に固相に付着するようにすることができる。あるいは、免疫複合体に含まれるP2X<sub>7</sub>受容体、単量体またはその断片を固相に付着させることができる。

【0133】

抗体は、免疫複合体の形成を検出するために標識することができる。

【0134】

免疫複合体は、免疫複合体を捕獲するための捕獲抗体などの抗体またはその断片をさらに含んでよい。さらなる抗体またはその断片は、抗P2X<sub>7</sub>受容体抗体に結合させることができる。同様に、さらなる抗体またはその断片は、P2X<sub>7</sub>受容体またはその断片に結合させることができる。

40

【0135】

さらなる抗体またはその断片は、上記の相などの固相に結合させることができる。

【0136】

さらなる抗体は、免疫複合体の形成を検出するために標識することができる。標識の例としては、蛍光体、色素、同位元素などが挙げられる。

【0137】

別の実施形態において、本発明のペプチドまたはエピトープを、ペプチドに対する免疫応答を強化するためのアジュvantまたは他の分子と一緒に含む組成物が提供される。ア

50

ジュバントは、体液性免疫応答もしくは細胞性免疫応答、またはその両方を強化するために選択することができる。特定の実施形態において、これらの組成物は、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に関連する疾患に対するワクチン接種のために有用である。

#### 【0138】

他の実施形態において、本発明の抗体を、医薬担体、医薬賦形剤または医薬希釈剤と一緒に含む組成物が提供される。これらの組成物は、癌または非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に関連付けられる他の疾患を治療するための抗体を全身投与するために有用である。好ましい実施形態において、抗体は単一ドメイン抗体である。

#### 【0139】

別の実施形態において、上皮細胞、間葉系細胞、胚細胞、神経細胞、胸膜の細胞または血液細胞での非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の発現を特徴とする疾患または状態を治療、診断またはモニタリングする方法であって、前記治療、診断またはモニタリングを必要としている個体に抗体を投与するステップを含み、前記抗体が、生細胞の非機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、生細胞の機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しないものである、方法が提供される。一実施形態において、この方法は、生細胞の機能性P2X<sub>7</sub>受容体に結合するが、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体には結合しない抗体を使用する第1のステップを含む。

#### 【0140】

特定の実施形態において、癌を有する個体を治療するための、本明細書に記載の抗体の使用が提供される。他の実施形態において、癌を有する個体を治療するための医薬品の製造における、本明細書に記載の抗体の使用が提供される。他の実施形態において、癌を有する個体を治療するための方法であって、その個体の癌を含む組織を、本発明のエピトープまたはペプチドに結合する抗体と接触させるステップを含む方法が提供される。この方法は、in vivoまたはin vitroで操作することができる。

#### 【0141】

一般には、癌は、上皮(乳房、前立腺、腸、肺、皮膚、子宮頸部、子宮、腫)、間葉系、胚、神経、胸膜または血液由来の癌である。

#### 【0142】

抗体は、上記の抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、Fab、dab、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質、またはコンジュゲートまたは医薬組成物であってよい。

#### 【0143】

投薬量、投薬の頻度、投与経路などについて、以下に詳細を記載する。

#### 【0144】

別の実施形態において、本発明のエピトープまたはペプチドに結合する抗原結合部位または抗原結合部位を含む免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、Fab、dab、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質、コンジュゲート、および薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

#### 【0145】

それを必要とする対象に対して抗体を調製し投与する方法は、当業者に周知である、または当業者により容易に決定される。投与経路は、例えば経口、非経口(例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸内または膣内)の、吸入によるものまたは局所的なものであってよい。投与形態の1つは、緩衝液(例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液)、界面活性剤(例えばポリソルベート)、場合によって安定化剤(例えばヒトアルブミン)を含む注射用溶液、特に静脈内または動脈内に注射または点滴するための溶液であってよい。他の方法において、抗体を直接患部に送達し、それによって患部細胞または患部組織の抗体への暴露を増加させることができる。

#### 【0146】

非経口投与用の調製物としては、滅菌した水性(水性の担体としては、生理食塩水および緩衝媒体を含め、水、アルコール溶液/水溶液、エマルションまたは懸濁液が挙げられる)または非水性(非水性溶媒は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリ

10

20

30

40

50

一ブオイルなどの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである)の溶液、懸濁液、およびエマルションが挙げられる。薬学的に許容できる担体としては、0.01~0.1M、好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液または0.8%生理食塩水が挙げられる。他の一般的な非経口ビヒクルとしては、リン酸ナトリウム溶液、リングルのブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸リングル、または固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、例えばリングルのブドウ糖などに基づいた流体、栄養補給液、電解質補給剤が挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガスなどの保存料および他の添加剤も存在してよい。

#### 【0147】

より具体的には、注射用に使用するために適切な医薬組成物としては、滅菌水溶液(水溶性の場合)または滅菌分散液、および滅菌注射用溶液または滅菌注射用分散液を用時調製するための滅菌粉末が挙げられ、そのような場合、組成物は滅菌されていなければならず、容易な注射性が存在する程度流動性であるべきである。組成物は、製造および保管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コンタミネーション作用に対して保護されていることが好ましい。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、プロピレンギリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、および適切なそれらの混合物を含有する溶媒または分散媒であってよい。例えば、レシチン等のコーティング剤を使用することによって、分散液の場合は必要な粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって、適切な流動性を維持することができる。本明細書に記載の治療方法で使用するための適切な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、16版(1980年)に記載されている。

10

#### 【0148】

微生物の作用の防止は、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、チメロサールなどの種々の抗細菌剤および抗真菌剤によって実現することができる。多くの場合、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物に含めることが好ましい。吸収を遅延させる作用剤、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組成物に含めることによって、注射用組成物の持続性吸収をもたらすことができる。

20

#### 【0149】

どんな場合でも、滅菌注射用溶液は、必要量の有効化合物(例えば、抗原結合部位)を適切な溶媒に、本明細書で列挙した成分の1つまたはそれらの組み合わせと一緒に組み込み、必要に応じて、続いてろ過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本の分散媒および上記に列挙したものからの必要な他成分を含有する滅菌ビヒクルに有効成分を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、あらかじめ滅菌ろ過したその溶液から、有効成分に任意の追加の所望の成分を加えた粉末が得られる、真空乾燥および凍結乾燥である。注射用調製物は、当技術分野で公知の方法に従って加工され、アンプル、袋、瓶、注射器またはバイアルなどの容器に充填され、無菌条件下で密閉される。さらに、調製物を包装してキットの形で販売することができる。そのような製造品は、付随する組成物が、障害を患っているまたは障害にかかりやすい対象を治療するために有用であることを示すラベルまたは添付文書を有することが好ましい。

30

#### 【0150】

本明細書に記載の障害を治療するための本発明の組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状態、患者がヒトであるか動物であるか、他の投与医薬品、および治療が予防的であるか治療的であるかを含めた多くの異なる因子に応じて変化する。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック動物を含めたヒトではない哺乳動物も治療することができる。当業者に公知の常法を使用して治療用量を設定して安全性および有効性を最適化することができる。

40

#### 【0151】

50

抗体を用いて特定の障害を治療するために、用量は、宿主の体重の例えは約0.0001～10mg/kg、通常0.01～5mg/kg(例えは、0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kgなど)にわたってよい。例えは、用量は、1mg/体重kgまたは10mg/体重kgまたは1～10mg/kgの範囲内であってよく、少なくとも1mg/kgであることが好ましい。上記の範囲の中間の用量も、本発明の範囲内とする。そのような用量を毎日、隔日に、週に1回または経験的な分析によって決定された他の任意のスケジュールに従って、対象に投与することができる。代表的な治療は、長期にわたって、例えは、少なくとも6ヶ月間、多回用量で投与することを必要とする。追加的な代表的な治療レジメンは、2週間おきに1回または1ヶ月に1回または3～6ヶ月ごとに1回の投与を必要とする。代表的な用量スケジュールとしては、連日1～10mg/kgもしくは15mg/kg、隔日に30mg/kgまたは週に1回60mg/kgが挙げられる。一部の方法において、異なる結合特異性を持つ2つ以上の抗原結合部位が同時に投与され、その場合、投与される各抗原結合部位の用量は、示した範囲内に入る。

#### 【0152】

本発明のエピトープまたはペプチドに結合する抗体は、何度も投与することができる。それぞれの投薬の間隔は、週に1回、月に1回または年に1回とすることができます。間隔は、患者における標的ポリペプチドまたは標的分子の血中レベルを測定することによって示される通りに変則的であってもよい。一部の方法では、血漿ポリペプチド濃度が1～1000μg/ml、一部の方法では25～300μg/mlになるように用量を調整する。あるいは、抗体を徐放性製剤として投与することができ、その場合、低頻度の投与が必要である。用量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変化する。抗体の半減期は、安定なポリペプチドまたは成分、例えは、アルブミンまたはPEGと融合することによって延長することもできる。一般に、ヒト化抗体が最も長い半減期を示し、キメラ抗体および非ヒト抗体がそれに続く。一実施形態において、抗体はコンジュゲートしていない形で投与することができる。別の実施形態において、抗体は、コンジュゲートした形で複数回投与することができる。

#### 【0153】

投与の用量および頻度は、治療が予防的であるか治療的であるかに応じて変化しうる。予防的な適用では、抗体またはそのカクテルを含む組成物は、まだ疾患状態にない、または前疾患状態の患者に、患者の抵抗性を増強するために投与される。そのような量は、「予防的有効用量」と定義される。この使用において、正確な量は、患者の健康状態および全身免疫にさらに左右されるが、一般に用量当たり0.1～25mg、特に用量当たり0.5～2.5mgの範囲である。長期にわたって、比較的まれな間隔で比較的低用量が投与される。一部の患者は、残りの人生の間治療を受け続ける。

#### 【0154】

治療的な適用において、疾患の進行が縮小または終了するまで、好ましくは患者が疾患の症状の部分寛容または完全寛容を示すまで、比較的短い間隔で比較的高用量(例えは、用量当たり約1～400mg/kgの結合分子、例えは抗体であり、通常放射線免疫複合体については5～25mgの用量が使用され、細胞毒-薬物コンジュゲート分子についてはそれよりも高用量が使用される)が時々必要である。

#### 【0155】

治療剤は、予防的かつ/または治療的に治療するために、非経口的、局所的、静脈内的、経口的、皮下的、動脈内的、頭蓋内的、腹腔内的、鼻腔内的または筋肉内的な手段で投与することができ、一部の方法では、作用剤は、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体細胞が蓄積している特定の組織に直接注射、例えは頭蓋内注射される。抗体を投与するためには筋肉内注射または静脈内注入が好ましい。

#### 【0156】

抗体は、場合によって、治療(例えは、予防的または治療的)を必要とする障害または状態を治療するのに有効な他の作用剤と組み合わせて投与することができる。

#### 【0157】

別の実施形態において、上記の抗体結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、Fa

10

20

30

40

50

b、dab、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質、コンジュゲートまたは医薬組成物を含むキットまたは製造品が提供される。

【0158】

他の実施形態において、上記の治療用途で使用するためのキットであって、治療用組成物を抗体結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、Fab、dab、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質、コンジュゲートまたは医薬組成物の1つまたは複数の形で保持する容器と、  
使用説明書が挿入されたラベルまたは包装と  
を含むキットが提供される。

【0159】

特定の実施形態において、キットは、癌を治療するための、または上記の癌に関連する合併症を予防するための、1つまたは複数の別の有効要素または有効成分を含有しうる。

【0160】

キットまたは「製造品」は、容器、および容器に挿入または付随したラベルまたは包装を含んでよい。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、注射器、ブリスター包装などが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、状態を治療するために有効な治療用組成物を保持し、滅菌されたアクセスポートを有してよい(例えば、容器は、皮下注射用の針によって穴を開けることができる栓を有する、静脈内溶液の袋またはバイアルであってよい)。挿入されたラベルまたは包装は、その治療用組成物が、選択された状態を治療するために有用であることを示す。一実施形態において、挿入されたラベルまたは包装は使用説明書を含み、その治療用組成物が、癌を治療するためまたは癌から生じる合併症を予防するために使用できることを示している。

【0161】

キットは、(a)治療用組成物と、(b)第2の有効要素または有効成分を含有する第2の容器とを含んでよい。本発明のこの実施形態では、キットは、この有効要素および他の有効要素が、障害を治療するためまたは癌から生じる合併症を予防するために使用できることを示す添付文書をさらに含んでよい。その代わりにまたはそれに加えて、キットは、注射用静菌水(BWF1)、リン酸緩衝食塩水、リソゲル液およびブドウ糖液などの薬学的に許容できる緩衝液を含む第2(または第3)の容器をさらに含んでよい。キットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針および注射器を含めた、商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでよい。

【0162】

特定の実施形態において、個体が癌を有するかどうかを判定するための、本明細書に記載の抗体の使用が提供される。他の実施形態において、個体が癌を有するかどうかを判定するための手段の製造における、本明細書に記載の抗体の使用が提供される。他の実施形態において、個体が癌を有するかどうかを判定する方法であって、癌について判定される個体の組織を、本発明による免疫複合体が形成される条件下で、本発明による抗体と接触させ、免疫複合体が形成されたかどうかを判定するステップを含み、それによって、免疫複合体の形成によりその個体が癌を有すると判定される方法が提供される。この方法は、in vivoまたはin vitroで操作することができる。

【0163】

一実施形態において、抗体は、上記の抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、Fab、dab、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質、コンジュゲートまたは診断用組成物の形であり、試薬と組織または細胞との結合を検出する。

【0164】

in situ診断のために、抗原結合部位または任意のその有効かつ機能的な部分を、例えば、静脈内注射、鼻腔内注射、腹腔内注射、脳内注射、動脈内注射などの当技術分野で公知の方法によって、診断される組織に投与して、本発明による抗原結合部位と非機能性P2X<sub>7</sub>受容体のエピトープ領域の間で特異的結合が起こりうるようにすることができる。抗体

10

20

30

40

50

/抗原複合体は、抗原結合部位またはその機能性断片に付着させた標識によって、または当技術分野で公知の他の検出方法によって好都合に検出することができる。

#### 【0165】

本発明による、本明細書に記載の診断用途で使用される免疫測定法は、一般的には、標識した抗原、抗体、または検出用二次試薬に依存する。これらのタンパク質または試薬は、酵素、放射線同位元素、ならびに蛍光剤、発光剤、ならびにコロイド金およびラテックスピーズなどの着色粒子を含むがそれらに限定されない発色性物質を含めた当業者に一般的に知られている化合物を用いて標識することができる。そのうち、放射性標識は、ほぼ全種のアッセイのために使用することができ、最もバリエーションがある。放射能を避けなければならぬ場合または迅速に結果が必要とされる場合、酵素コンジュゲート標識が特に有用である。蛍光色素は、その使用に高価な設備が必要であるが、非常に感度の高い検出方法をもたらす。これらのアッセイにおいて有用な抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および親和性精製ポリクローナル抗体が挙げられる。

10

#### 【0166】

あるいは、抗体は、プロテインAまたはプロテインGまたは第2の抗体などの、免疫グロブリンに対して親和性を有する標識物質を用いた反応によって間接的に標識することができる。抗体は、第2の物質とコンジュゲートし、抗原結合部位にコンジュゲートされた第2の物質に対して親和性を有する標識した第3の物質を用いて検出することができる。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートし、標識したアビジンまたはストレプトアビジンを使用して抗原結合部位-ビオチンコンジュゲートを検出することができる。同様に、抗体をハプテンにコンジュゲートし、標識した抗ハプテン抗体を使用して抗体-ハプテンコンジュゲートを検出することができる。

20

#### 【0167】

現行の免疫測定法は、分析物の存在を検出するために二抗体法を利用し、そこで、抗体は検出可能な標識で標識された第2の抗体との反応性によって間接的に標識される。第2の抗体は、その抗体を得た動物の抗体に結合するものであることが好ましい。言い換れば、抗体がマウス抗体である場合、標識された第2の抗体は抗マウス抗体である。本明細書に記載のアッセイで使用される抗体に対して、この標識は抗体でコーティングしたビーズ、特に磁気ビーズであることが好ましい。本明細書に記載の免疫測定法で利用される抗原結合部位に対して、この標識は放射性物質、蛍光物質または電気化学発光物質などの検出可能な分子であることが好ましい。

30

#### 【0168】

分析物の存在を迅速に決定することに適合されているため、高速型システムと称されることも多い代替の二抗体システムも、本発明の範囲内で利用することができる。このシステムは、抗原結合部位と分析物の間に高い親和性を必要とする。本発明の一実施形態によると、非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の存在は、それぞれがP2X<sub>7</sub>受容体タンパク質に特異的な抗原結合部位の対を使用して決定される。前記抗原結合部位の対の片方は、本明細書で「検出抗原結合部位」と称され、前記抗原結合部位の対のもう一方は、本明細書で「捕獲抗原結合部位」と称される。本発明の抗原結合部位は、捕獲抗原結合部位または検出抗原結合部位のいずれかとして使用することができる。本発明の抗原結合部位は、捕獲抗原結合部位および検出抗原結合部位の両方として、単一のアッセイにおいて一緒に使用することもできる。したがって、本発明の一実施形態では、生体液試料中の非特性P2X<sub>7</sub>受容体を検出するための二抗原結合部位サンドイッチ法が使用される。この方法では、分析物(非機能性P2X<sub>7</sub>受容体タンパク質)を検出抗原結合部位と捕獲抗原結合部位の間にサンドイッチし、捕獲抗原結合部位は固体支持体上に不可逆的に固定化されている。検出抗原結合部位は、抗原結合部位-分析物サンドイッチの存在、したがって分析物の存在を同定するために、検出可能な標識を含有することになる。

40

#### 【0169】

代表的な固相物質としては、放射免疫測定法および酵素免疫測定法の分野で周知のマイクロタイヤープレート、ポリスチレンの試験管、磁気ビーズ、プラスチックビーズまたは

50

ガラスピーズおよびスライドが挙げられるが、それらに限定されない。抗原結合部位を固相に連結する方法も当業者に周知である。つい最近、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ガラス纖維および他の多孔質ポリマーなどのいくつもの多孔質材料が固体支持体として利用されている。

#### 【0170】

別の実施形態において、上記の抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、Fa b、dab、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質またはコンジュゲート、希釈剤および場合によって標識を含む診断用組成物が提供される。

#### 【0171】

診断用組成物に利用される抗体は、検出可能なように標識されることが好ましい。生体分子を標識するための種々の技法が利用でき、それは当業者に周知であり、また本発明の範囲内であるとみなされる。多くの異なる標識および標識方法が当業者に公知である。本発明で使用することができる標識の代表的な種類としては、酵素、放射線同位元素、コロイド金属、蛍光性化合物、化学発光化合物、および生物発光化合物が挙げられる。

10

#### 【0172】

通常使用される標識は、とりわけ、蛍光色素(例えばフルオレセイン、ローダミン、Texas Redなど)、酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、放射性同位元素(例えば $^{32}\text{P}$ または $^{125}\text{I}$ )、ビオチン、ジゴキシゲニン、コロイド金属、化学発光化合物または生体発光化合物(例えばジオキセタン、ルミノールまたはアクリジニウム)を含む。標識手順、例えば、酵素またはビオチニル基の共有結合、ヨウ素化、リン酸化、ビオチン化などは当業者に周知である。

20

#### 【0173】

検出方法は、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡法、直接酵素反応および間接酵素反応などを含むが、それらに限定されない。通常使用される検出アッセイは、放射性同位元素法または非放射同位元素法を含む。これらは、とりわけ、ウェスタンプロット法、オーバーレイアッセイ、RIA(放射免疫測定法)およびIRMA(免疫ラジオイムノメトリックアッセイ)、EIA(酵素免疫測定法)、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、FIA(蛍光免疫測定法)、およびCLIA(化学発光免疫測定法)を含む。

#### 【0174】

別の実施形態において、上記の抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、Fa b、dab、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、融合タンパク質、コンジュゲートまたは診断用組成物を含むキットまたは製造品が提供される。

30

#### 【0175】

他の実施形態において、上記の診断用途で使用するためのキットであって、  
本発明による抗体と、場合によって、  
本発明によるペプチドと、  
使用説明書が挿入されたラベルまたは包装と  
を含むキットが提供される。

#### 【0176】

キットまたは「製造品」は、容器、および容器に挿入または付随したラベルまたは包装を含んでよい。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、注射器、ブリスター包装などが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、癌を検出するために有効な診断用組成物を保持し、滅菌されたアクセスポートを有してよい(例えば、容器は、皮下注射用の針によって穴を開けることができる栓を有する、静脈内溶液の袋またはバイアルであってよい)。挿入されたラベルまたは包装は、その診断用組成物が、選択された状態を検出するために使用されることを示す。一実施形態において、挿入されたラベルまたは包装は使用説明書を含み、その診断用組成物が、癌を検出するために使用できることを示している。

40

#### 【0177】

キットは、(a)診断用組成物;および(b)第2の診断用作用剤または第2の標識を含有する

50

第2の容器を含んでよい。キットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルターなどを含めた、商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでよい。

【図面の簡単な説明】

【0178】

- 【図1】図1は、配列番号1の配列を示す。
- 【図2】図2は、配列番号2の配列を示す。
- 【図3】図3は、配列番号3の配列を示す。
- 【図4】図4は、配列番号4の配列を示す。
- 【図5】図5は、配列番号5の配列を示す。
- 【図6】図6は、配列番号6の配列を示す。
- 【図7】図7は、配列番号7の配列を示す。
- 【図7a】図7aは、配列番号8の配列を示す。
- 【図7b】図7bは、配列番号9の配列を示す。
- 【図7c】図7cは、配列番号10の配列を示す。
- 【図8a】図8aは、FACS分析による、PC3細胞へのMAb2F6の結合性を示す。
- 【図8b】図8bは、FACS分析による、MCF7細胞へのMAb2F6の結合性を示す。
- 【図8c】図8cは、FACS分析による、ヒトリンパ球の機能性P2X7へのMAb2F6の非結合性を示す。
- 【図9】図9は、融合クローンのX反応性を示す。

【実施例】

【0179】

(実施例1)

抗体が結合する推定エピトープを同定するための非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の3次元モデルの決定

P2X<sub>7</sub>単量体構造は、P2Xサブタイプ間で構造相同性が決定された、Hansenら、1998年(Hansen, M.A., Barden, J.A., Balcar, V.J., Keay, K.A., Bennett, M.R. (1997年) Biochem. Biophys. Res. Commun. 236巻、670～675頁、Structural motif and characteristics of the extracellular domain of P2X receptors)によって行われたモデリングに基づいた。PDBデータベース内のSerトランスフェラーゼ構造を用いて、Hansen上記に同定された2つの細胞外ドメインの大きい方に適用してさらなる構造相同性を得た。

【0180】

このモデルは、ATP結合のために決定的な残基を同定するための基礎になった。P2X<sub>7</sub>チャネル/孔の機能を測定する目的で、これらの同定された残基を、部位特異的突然変異誘発を使用してAlaに変更し、突然変異した受容体をHEK細胞において発現させた。

【0181】

次に、それぞれが、発現した受容体にATPが結合できないことによる機能喪失に関与することがわかった重大な残基を、大きな細胞外ドメインのモデルの異なる側にマッピングした。例として、(配列番号1の)Arg307およびLys311がECDの片側にあり、一方(配列番号1の)Lys193、Arg294、His201およびPhe275が、ECDの逆側にあり、距離はおよそ30オングストロームであった。

【0182】

この発見により、単量体の組み立てには、異なる必須アミノ酸クラスター間の3次元の密接な関連が必要であることが示唆された。立体構造空間においてその残基が近接する三量体のモデリングによって、隣接する単量体上にエピトープ標的が示唆されるモデルがもたらされた。本発明者らは、非機能性P2X<sub>7</sub>のみが、配列番号1の200～216の領域(ここではE200)に対する抗体に結合することができるので、E200がそれら非機能性受容体に暴露されることを観察した。本発明者らはさらに、非機能性P2X<sub>7</sub>のみが、配列番号1の297～313の領域(ここではE300)に対する抗体に結合することができるので、E300が非機能性受容体に暴露されることも観察した。本発明者らのモデリングによると、これらのエピトープは、組み立てられた三量体モデルの立体構造空間において隣接している。

10

20

30

40

50

## 【0183】

組み立てられた受容体のモデルの正確さを試験するために、NMR分析のX線回折によつては未知であるが、非機能性型の受容体に特異的な抗体に結合可能な暴露残基からなる界面モデルを考案した。隣接する単量体の面に存在するE200領域およびE300領域のエレメントを選択し、モデルに従つて間隔をあけた。この間隔は10オングストロームであることが理想的である。提案された非機能性受容体の接近しやすい界面の配向および間隔を、下記の複合ペプチド標的を構築するための基礎とした。

## 【0184】

E200領域は、(配列番号1)のPro210残基がシスである場合にのみ存在する。この残基をトランスにロックすると、E200領域が暴露されないので抗体が受容体に結合できなくなる。トランスにロックしたPro210は、機能性受容体に関係する構造と一致する。機能性受容体は独特の(单一の)立体構造を有する。機能性残基の表面に暴露された全ての残基は、機能性受容体と交差反応しない、非機能性受容体の治療的ターゲティングを含む適用のために非機能性受容体に結合するために特異的な抗体が生じる場合に理想的に無効になるエピトープに寄与することができる。Pro210がトランスのとき、E200領域内の残基はP2X<sub>7</sub>単量体の正確なパッキングによって形成されるATP結合部位の正確な形成によって、抗体の結合から隠される。シスの残基のみが、機能性三量体と非機能性三量体を識別することができる選択的抗体に暴露される。単量体の界面にターゲティングし、向かい合つた面の両方の残基に結合する、非機能性三量体に対して発生した抗体は、単量体への結合があよそ50分の1縮小するので、三量体特異的結合剤であると説明することができる。

10

20

## 【0185】

## (実施例2)

## ペプチドの設計

非機能性P2X<sub>7</sub>受容体の単量体間で接近しやすい界面を形成している複合ペプチドの特異的な選択は、単量体の面の一方または他方、すなわちE200またはE300に結合させるために選択された抗体を渡つて単量体間で架橋することができる抗体を選択するために、E200領域とE300領域のそれぞれの長さを縮小する必要があった。その理由のために、E200領域を長さ(配列番号1の)200~216から200~211まで縮小し、領域にはなお2つの抗体が同時に結合することができ、E300領域を(配列番号1の)297~313から296~306までさらに縮小して、抗体が、E200またはE300のいずれかに単独で結合するのではなく、E200とE300に架橋するのを助けた。(配列番号1の)残基211および296の存在を、立体構造空間において領域を適切に分離するために必要な間隔あけのために同様に付加される残基AGを補完するために設計した。ガイドモデルから推定された、10年の研究の結果の通り、E200領域およびE300領域の個々の長さの縮小を適切な間隔あけと組み合わせ、歪みおよび比例した親和性の喪失を導く、受容体上であまりに広範囲に分離した残基にまたがる可能性のある抗体の形成を防止した。

30

## 【0186】

配列GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEKの形の複合ペプチドを、標準技法に従つた固相合成によって調製し、マレイミドカプロイル-N-ヒドロキシスクシンイミド(MCS)リンカーを使用してコンジュゲートした。

40

## 【0187】

## (実施例3)

## モノクローナル抗体の生成

## 3.1 方法

種々の上記の複合ペプチドを、ジフテリアトキソイドにコンジュゲートした200/300ペプチドの形でマウスに接種した。1つのペプチドはGHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEKの配列を有した。最終的な追加免疫をする前に、活性について動物をスクリーニングし、最良の動物を追加免疫し、次いで犠牲にし、脾臓を取り出した。脾臓細胞を単離し、Sp2/0融合パートナー細胞系に、使用した型に応じて1:2より大きく1:5よりも少ない比で融合した。使い残した脾臓細胞を培地で3日間培養し、上清をアッセイ系における陽性対照として使用す

50

るために保存した。

**【0188】**

融合1-E200/E300複合体、96ウェルプレートを使用、1プレートはマクロファージ支持細胞層を用いて使用、他の4つは条件培地のみで使用。

**【0189】**

マクロファージプレートを5および10と番号付けした。

**【0190】**

ハイブリダイゼーションの手順

1. チューブ1を、EBSSを用いて最大50mlにし、600rpmで8分回転させ、融合する。

2. チューブ1から上清を取り出し、EBSS10mlを加え、混合し、EBSS15mlを加える。 10

チューブ2を融合する、ステップ1。

チューブ1および2を600rpmで8分回転させる。

3. チューブ2をステップ2と同様に融合し、チューブ3をステップ1と同様に融合する。

チューブ2および3を600rpmで8分回転させる。

4. チューブ1を融合する、上清を取り出し、チューブを軽くたたいてペレットをほぐす。  
。

タイマーを8分に設定する。

1mlのピペットで1分にわたる液滴でPEG混合物0.8mlを加え、穏やかに混合する。

チューブを水浴に移し1分間。

1mlのピペットで1分にわたる液滴で1mlヘペス1mlを加え、穏やかに混合する。 20

10mlのピペットで5分にわたる液滴で1mlヘペス20mlを加え、穏やかに混合する。

5. チューブ3をステップ2と同様にし、次いでチューブ1および3と一緒に回転させる。

6. チューブ2をステップ4と同様にする。

7. チューブ1の上清を取り出し、Isc(+20% FBS)+/-HAT10mlを加える。

再懸濁させ、さらなる30mlを加える。

8. チューブ1および2と一緒に回転させる。

9. チューブ3をステップ4と同様にする。

10. チューブ1;上清を取り出し、Isc(+20% FBS)+HAT10ml中に再懸濁させ、24ウェル型についてはウェル当たり0.05mlを投入する、または40ml中に再懸濁させ、96ウェル型についてはウェル当たり0.1mlを投入する。24ウェルについては最初の8つのトレーにウェル当たり0.05mlを投入し、96ウェルについては最初の4つのトレーにウェル当たり0.1mlを投入する。 30

11. チューブ2をステップ7と同様にし、チューブ3をステップ4と同様にし、全てのチューブがトレー中に投入されるまでプロセスを続ける。

**【0191】**

ELISA

エピトープをPVC(ポリ塩化ビニル)プレートにコーティングし、細胞上清から抗体を捕獲するために使用した。未知のものを既知の陽性対照および陰性対照と比較した。

**【0192】**

試験するために、BSA担体タンパク質を付着させたEP200/EP300を使用してELISAプレートをコーティングした。 40

**【0193】**

上清の試験

- ・ウェルが集密になったら、培地を、0.05mlを除いて全て試験管またはプレートに取り出した。

- ・抗体産生について試験し、陽性のものを増殖させ、陰性のものを廃棄した。

- ・増殖させた+veを、培地2mlを含有する25cmのフラスコ内に入れ、垂直に放置した。

- ・4ml、2×4ml、2×75cmのフラスコ(12ml)に増殖させた。増殖体積を30ml/フラスコにした。集密時にストックを凍結させた。

- ・凍結状態で上清を再試験した。 50

## 【0194】

全てのELISAアッセイを通して使用した標準プロトコル

- ・エピトープを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でコーティングし、PBS、 $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 中に希釈し、RTで一晩振とう機。
- ・ウェルをPBSですすいだ(Ca/Mgなし)。
- ・ウェルを、PBS中0.1%オボアルブミンを用いて、 $200\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で1時間ブロッキングした。
- ・PBSですすいだ。
- ・上清をスクリーニングした(2連)、 $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 、RTで2時間振とう機。
- ・PBSで3回すすいだ。
- ・ウサギ抗マウスHRP、ブロック中1/1000、 $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 、RTで1.5時間振とう機。
- ・PBSで4回すすぐ。
- ・基質Sigma ABTS(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸ニアンモニウム塩)、0.05Mクエン酸中 $1.1\text{mg}/\text{ml}$ +過酸化水素 $2\mu\text{l}$ /活性化するために10ml、新鮮に準備した。
- ・ウェルに、ABTSを30分の間、 $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で加え、 $25\mu\text{l}/\text{ウェル}$ の5%シュウ酸で停止させる。
- ・試験波長405/参照490nmで読み取る。

10

## 【0195】

## 結果

20

収率は、マクロファージを含有するプレートを除く全てのプレートで非常に低かった。3回のELISAスクリーニングで、複合ペプチドに対する特異性を分泌する37個のクローンが同定された。これらのクローンの多くは、死に絶えたまたは分泌を停止した。生存したクローンを発展させ、アンプル5個に凍結させた。E200とE300の交差反応を含めた血清学について、以下の実施例において決定した。

## 【0196】

## (実施例4)

## 抗体の血清学的特徴づけ

複合ペプチドに対して生じた抗体を、E200領域またはE300領域の配列を有するペプチドに対してスクリーニングした。これらの標的に結合することができるが、抗体は複合ペプチドに対して優先的な結合を有すると確認された。

30

## 【0197】

## 4.1 交差反応性についての試験

実施例3から生成した抗体を、上記のELISAを使用して、複合ペプチド(COMP)、U140(機能性受容体と非機能性受容体の両方に見られるエピトープの配列を有するペプチド)、200(E200領域の配列を有するペプチド)、300(E300領域の配列を有するペプチド)およびU80(機能性受容体と非機能性受容体の両方で見られるエピトープの配列を有するペプチド)それぞれに対してスクリーニングした。結果を下記の表および図9に示す。

## 【0198】

U80の公差反応性は、動物をDTタグで免疫し、ELISAで使用したU80がDTタグを有していたので、おそらくDTタグに起因する。

40

## 【0199】

【表6】

20分	T/C supn	BSA	COMP		U140	200		300		U80	
	2A11	0.125	0.137	3.625	3.602	0.17	0.508	0.138	0.194	0.144	0.186
	2F6	0.236	0.26	1.332	1.323	1.615	1.612	1.371	1.402	1.405	1.411
	3D6	0.326	0.335	1.293	1.219	1.563	1.427	1.014	1.037	1.123	1.109
	4F5	0.122	0.121	3.265	3.503	0.141	0.139	0.127	0.124	0.155	0.139
Comp	5C5	0.12	0.122	0.163	0.166	0.155	0.162	0.14	0.145	0.143	0.146
	5C8	0.155	0.157	0.256	0.27	0.315	0.304	0.234	0.214	0.241	0.244
	5D5	0.122	0.121	0.814	0.801	0.136	0.132	0.133	0.137	0.132	0.126
	5F3	0.125	0.123	3.531	3.57	0.165	0.157	0.139	0.175	0.149	0.146
	5F5	0.292	0.283	1.013	1.04	1.155	1.215	0.93	0.832	0.978	0.903
	Isc	0.126	0.122	0.144	0.114	0.142	0.164	0.129	0.128	0.179	0.15
	Comp	0.163	0.165	3.607	3.613	3.62	3.59	2.678	2.501	2.707	2.916
	+ve										
MEANS		BSA	Comp	U140	200	300	U80				
	2A11	0.131	1.881	3.614	1.886	0.339	0.323				
	2F6	0.248	0.796	1.328	1.469	1.614	1.492				
	3D6	0.331	0.814	1.256	1.391	1.495	1.221				
	4F5	0.122	1.693	3.384	1.822	0.140	0.133				
		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
Comp	5C5	0.121	0.143	0.165	0.161	0.159	0.151				
	5C8	0.156	0.207	0.263	0.293	0.310	0.269				
	5D5	0.122	0.468	0.808	0.469	0.134	0.133				
	5F3	0.124	1.827	3.551	1.868	0.161	0.148				
	5F5	0.288	0.648	1.027	1.098	1.185	1.073				
	Isc	0.124	0.133	0.129	0.128	0.153	0.147				
	Comp	0.164	1.886	3.610	3.617	3.605	3.134				
	+ve										

## 【0200】

(実施例5)

生きている腫瘍細胞の非機能性P2X<sub>7</sub>へのモノクローナル抗体2F6の結合

本発明の精製抗体を、非機能性P2X<sub>7</sub>を発現しているヒト腫瘍細胞系および機能性P2X<sub>7</sub>を発現しているヒト造血細胞への結合について、蛍光活性化セルソーター(FACS)分析によって分析した。Table6(表7)に、これらの細胞へのモノクローナル抗体(MAb)の1つ2F6の結合について要約されている。FACS分析によって、前立腺腫瘍細胞系PC3へのMAb2F6の結合が

実証され、平均蛍光強度(MFI)は、陰性対照抗体のMFI27.87に比べ、334.62であった。乳房の腫瘍細胞系MCF-7へのMAb2F6の結合も、弱くはあるが観察された(2F6および対照3D6のMFIはそれぞれ160.3および50.4であった)。しかし、試験したヒトリンパ球への結合はほとんど検出されなかった(Table6(表7))。図8は、続くFACS分析実験からの結果を示し、同様に、MAb2F6がPC3前立腺腫瘍細胞系およびMCF-7乳房腫瘍細胞系に結合するが、ヒトリンパ球試料には結合しないことを実証している。

## 【0201】

## 【表7】

Table6:腫瘍細胞系およびヒトリンパ球へのMAb2F6の結合のFACS分析

MAb	PC3 前立腺腫瘍細胞系		MCF-7 乳房腫瘍細胞系		ヒトリンパ球	
	平均蛍光強度(MFI)	陽性細胞の割合	平均蛍光強度(MFI)	陽性細胞の割合	平均蛍光強度(MFI)	陽性細胞の割合
IgM 陰性対照 (3D6)	27.87	1	50.40	0	17.68	0
HLA(W6/32) 陽性対照	NT*	NT	1667.92	87	3897.33	100
2F6	334.62	47	160.30	5	22.34	1

\*試験せず

## 【0202】

当然のことながら、本明細書に開示し定義した本発明は、本文または図面で言及した、またはそこから明らかである2つ以上の個々の特徴の代替の組み合わせ全てに及ぶ。それらの異なる組み合わせは全て、本発明の種々の代替態様を構成する。

## 【図2】

## 【図5】

**Figure 2****HNYTTRNIL** (配列番号2)

Figure 5

```

1      MPACCSCSV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFSY VCFALVSDLK YQRKEPVSS
61     VHTKVKGIAE VKEEIVENGV KKLVHSVFDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQRLLCP
121    EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAEEAPRPA
181    LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNIL

```

## 【図3】

(配列番号5)

**Figure 3****GHN****NYTTRNIL** (配列番号3)

## 【図6】

Figure 6

KTTNVSLYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTLKVFGIRFDILVFGTGGKFD

## 【図4】

(配列番号6)

**Figure 4****DFPGHNYTTRNIL** (配列番号4)

Figure 7

KYYKENNVEKRTLKVFGIRFDILVFGTGGKFD

(配列番号7)

## 【図7 a】

Figure 7a

GHN

(配列番号8)

【図 7 b】

Figure 7b

AKYYKENNVEK

(配列番号9)

【図 7 c】

Figure 7c

GHNYTTRNILPGAGAKYYKENNVEK

(配列番号10)

【図1】

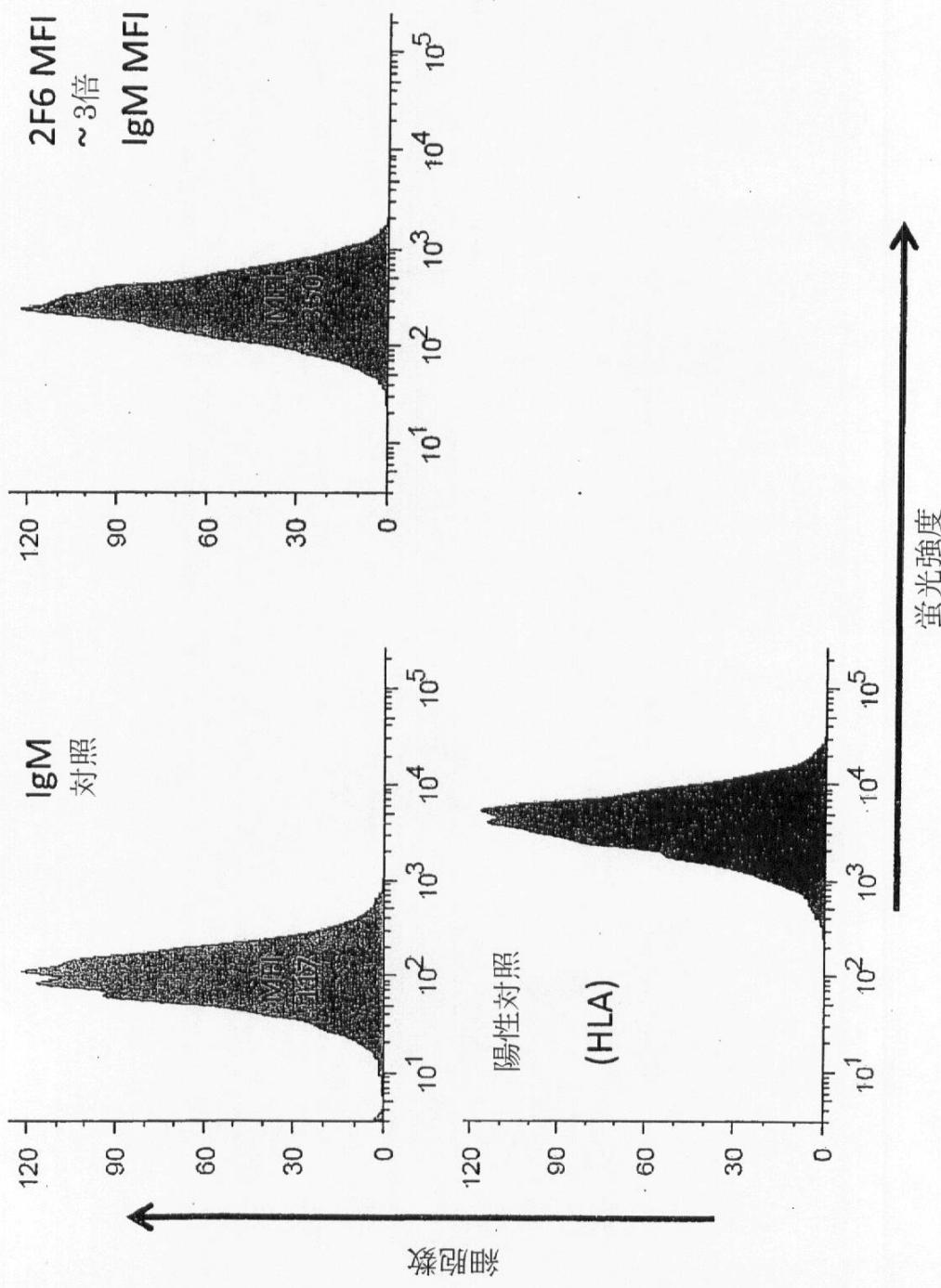
**Figure 1:**

1 MPACCSCSDV FQYETNKVTR IQSMNYGTIK WFFHVIIFSY VCFALVSDLK YQRKEPVSS  
61 VHTKVKGIAE VKEEIVENGV KKLVHSVFDT ADYTFPLQGN SFFVMTNFLK TEGQEQLCP  
121 EYPTRRTLCS SDRGCKKGWM DPQSKGIQTG RCVVHEGNQK TCEVSAWCPI EAVEEAPRPA  
181 LLNSAENFTV LIKNNIDFPG HNYTTRNILP GLNITCTFHK TQNPQCPIFR LGDIFRETGD  
241 NFSDVAIQGG IMGIEIWDC NLDWFHHCR PKYSFRRLDD KTTNVSLYPG YNFRYAKYYK  
301 ENNVEKRTLKVFGIRFDIL VFGTGGKFID IQLVVYIGST LSYFGLAAVF IDFLIDTYSS  
361 NCCRSIHIPW CKCCQPCVNN EYYYRKCES IVEPKPTLKYSFVDESHIR MVNQQLLGRS  
421 LQDVKGQEVP RPAMDFTDLS RLPLALHDTP PIPGQPEEIQLLRKEATPRS RDSPVWCQCG  
481 SCLPSQLPES HRCLEELCCR KKPGACITTS ELFRKLVLSRHVLQFLLYQ EPLLALDVDS  
541 TNSRLRHCAHYCYATWRFGSQDMADFAILP SCCRWIRKE FPKSEGQYSG FKSPY

(配列番号1)

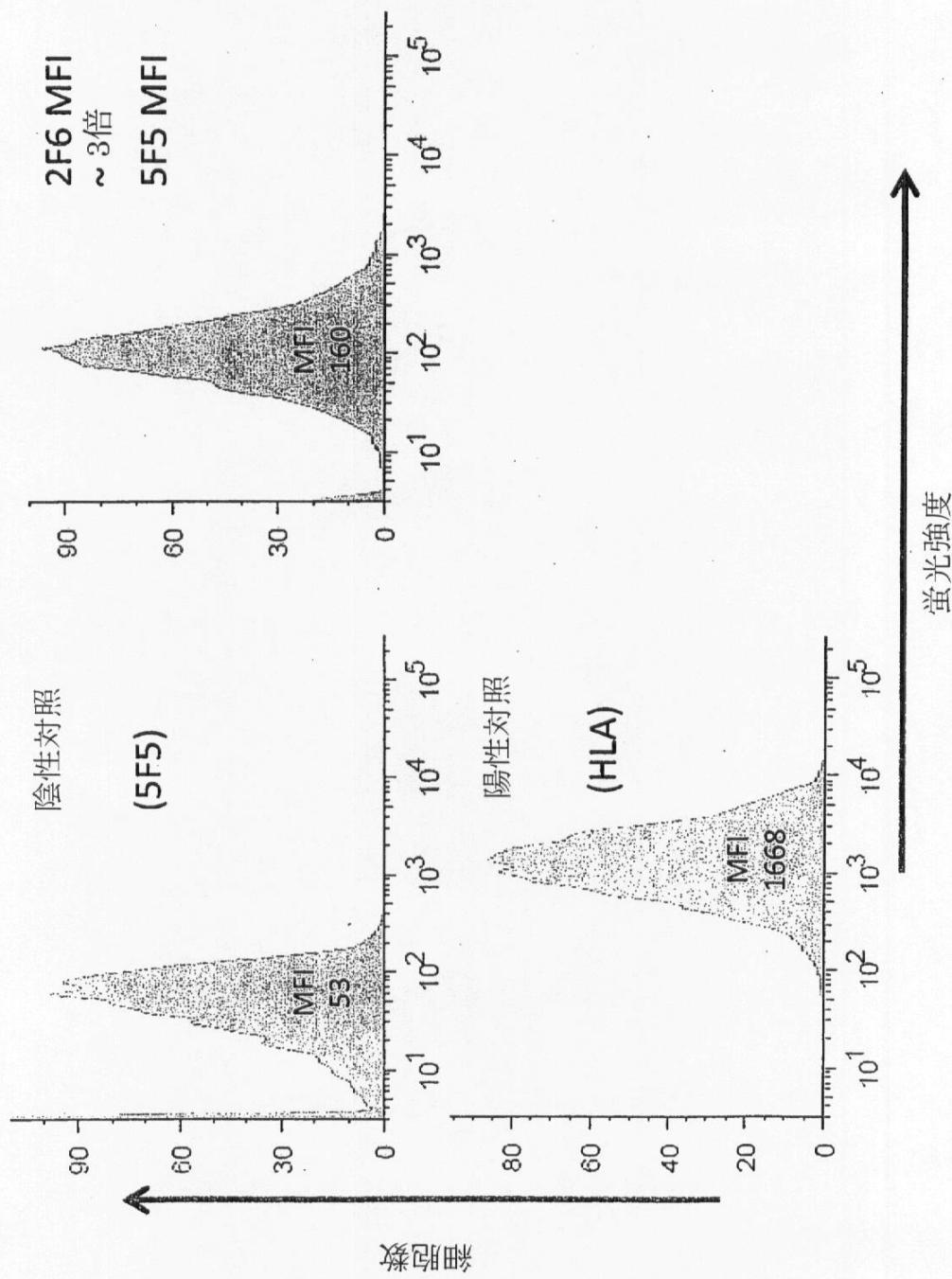
【図 8 a】

Figure 8a: FACS分析による、PC3細胞へのMAb2F6の結合性



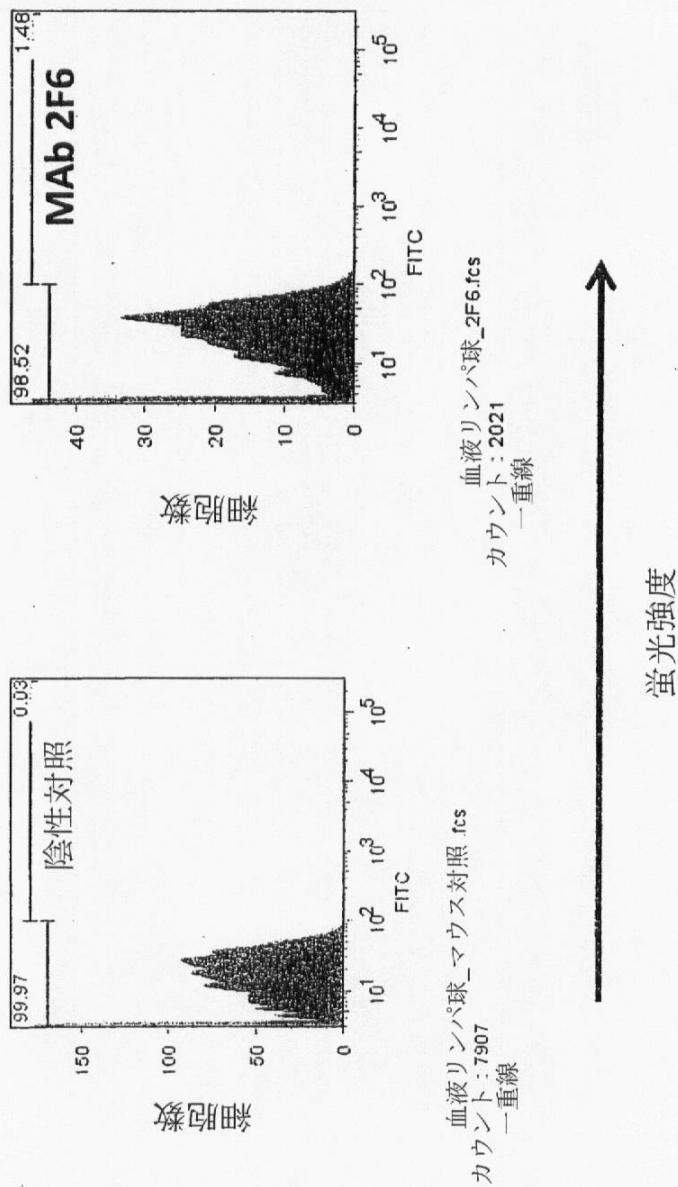
【図 8 b】

**Figure 8b:** FACS分析による、MCF7細胞へ $\mathcal{O}$ MAb2F6の結合性

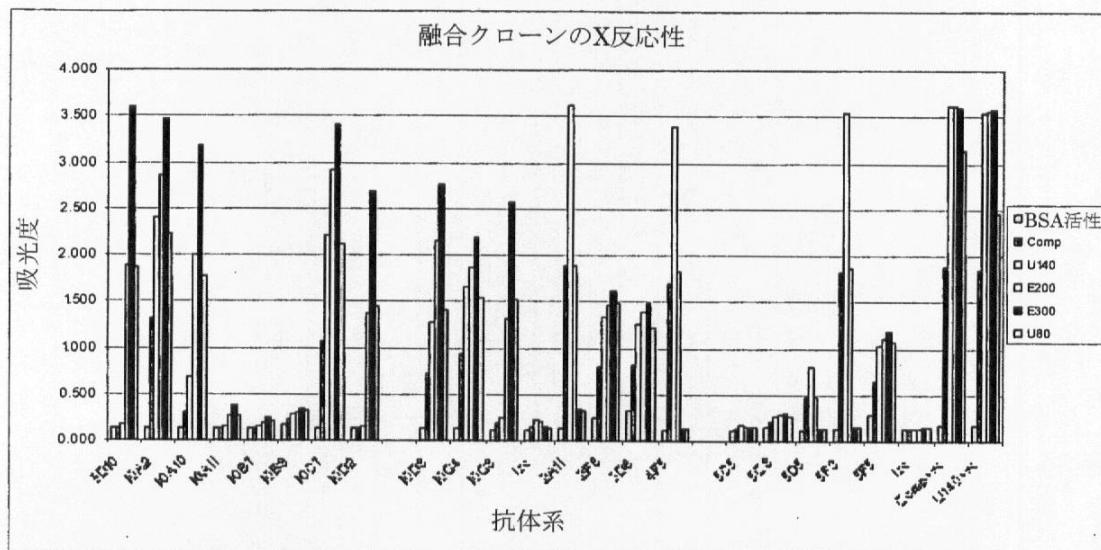


【図 8 c】

**Figure 8c:** FACS分析による、ヒトリンゴ球の機能性P2X7へのMAb2F6の非結合性



【図9】

**Figure 9**

【配列表】

0005701752000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 ジュリアン・アレクサンダー・バーデン

オーストラリア・2113・ニュー・サウス・ウェールズ・ノース・ライド・デリー・ロード・5  
6・スイート・3.08

(72)発明者 アンガス・ギドリー - ベアード

オーストラリア・2113・ニュー・サウス・ウェールズ・ノース・ライド・デリー・ロード・5  
6・スイート・3.08

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 国際公開第2008/043145 (WO, A1)

国際公開第2008/043146 (WO, A1)

特表2004-528286 (JP, A)

FEBS Letters, 2003年, Vol.538, p.159-162

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/28

C07K 14/705

G01N 33/574

UniProt/GenSeq

PubMed