

(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2005-513416

(P2005-513416A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/569	L 2 G O 5 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 2 G O 8 8
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 4
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 39/395	S 4 B O 6 5
A 6 1 P 31/12	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-525032 (P2003-525032)	(71) 出願人	503081852
(86) (22) 出願日	平成14年9月3日 (2002.9.3)		イントリート ピーティーワイ リミテッ ド
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月26日 (2004.4.26)		オーストラリア, ニューサウスウェール ズ州 2000, シドニー, オコンネ ル ストリート 26, レベル 10
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/001204	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開番号	W02003/020762		弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003.3.13)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	PR 7430		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成13年9月3日 (2001.9.3)	(74) 代理人	100101465
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 青山 正和
(31) 優先権主張番号	PR 7431	(74) 代理人	100108453
(32) 優先日	平成13年9月3日 (2001.9.3)		弁理士 村山 靖彦
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		
(31) 優先権主張番号	PCT/AU02/00061		
(32) 優先日	平成14年1月17日 (2002.1.17)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非機能性 P 2 X 7 リセプターに対応する抗体、癌及びその他の症状の診断及び治療

(57) 【要約】

本発明は、癌を含め、幅広い病気や症状にかかわるものである。本発明は、それらの病気や症状を発見するプローブを提供する。本発明のプローブは、機能的 P 2 X ₇ リセプターと非機能的 P 2 X ₇ リセプターとを識別することが可能である。本発明のプローブは、様々な方法によってこれをできるが、その一つとしては、アデノシントリフォスフェート (ATP) の P 2 X ₇ リセプターへの結合に関する変化を検知する方法である。本発明はまた、前記プローブを用いての病気や症状を発見する方法も提供する。本発明は、抗体、又は抗体を生成することのできるエピトープを使用した病気又は症状の治療にも及ぶ。前記抗体は、機能性と非機能性 P 2 X ₇ リセプターとを識別することができ、非機能性 P 2 X ₇ リセプターに結合する。治療方法、薬学的組成物及び前記プローブや抗体の使用もまた本発明に含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

病気や症状を発見するためのプローブであって、前記プローブが機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とするプローブ。

【請求項 2】

アデノシントリフォスフェート(ATP)の P 2 X₇ リセプターへの結合に関する変化を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ。

【請求項 3】

P 2 X₇ リセプターにおける細孔形成に必要な 1 つ又は複数のタンパク質の結合に関する変化を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ。

【請求項 4】

結合した ATP が存在しない時に露わな P 2 X₇ リセプターの 1 部分又は複数部分を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 3 に記載のプローブ。

【請求項 5】

前記 (P 2 X₇ リセプターの) 部分が P 2 X₇ モノマーを含むことを特徴とする請求項 4 に記載のプローブ。

【請求項 6】

プローブが、天然又は人工物であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 7】

プローブが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、人体に適應させた抗体、ヒト抗体、及びこれらの断片からなる群から選ばれることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 8】

前記抗体が、各 P 2 X₇ リセプターの ATP 結合箇所に隣接する細胞外の領域に位置するエピトープに対応するものであることを特徴とする請求項 7 に記載のプローブ。

【請求項 9】

リセプターが哺乳類の P 2 X₇ リセプターであって、プローブが、アミノ酸 210 におけるプロリンがトランス (trans) コンフォメーションである配列を有する機能性リセプターと、アミノ酸 210 におけるプロリンがシス (cis) コンフォメーションであって局所的なタンパク質構造を変異させている配列を有する非機能性リセプターとを識別することを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 10】

リセプターが哺乳類の P 2 X₇ リセプターであって、プローブが、アミノ酸 199 におけるプロリンがトランス (trans) コンフォメーションである配列を有する機能性リセプターと、アミノ酸 199 におけるプロリンがシス (cis) コンフォメーションであって局所的なタンパク質構造を変異させている配列を有する非機能性リセプターとを識別することを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 11】

プローブが、P 2 X₇ リセプターのエピトープ配列の Gly 200 から Cys 216 までの範囲に対して生成された抗体である、又はそのような抗体を含むことを特徴とする請求項 9 に記載のプローブ。

【請求項 12】

前記病気又は症状が、前立腺、乳、皮膚、肺、頸部、子宮、胃、食道、膀胱、結腸及び膣癌、その他の上皮細胞癌、悪性リンパ腫、その他の血液癌、過敏性腸症候群及びウィルス又はその他の病原性生物による感染からなる群から選択されることを特徴とする請求項

10

20

30

40

50

1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 1 3】

前記ウイルス又は（病原性）生物が、H I V 又はヒト型結核菌であることを特徴とする請求項 1 2 に記載のプロープ。

【請求項 1 4】

前記症状が過敏性腸症候群であり、抗体が、機能性及び非機能性コンフォメーションに共通するエピトープを検知することによって、P 2 X₇ リセプターにおいて機能状態によって変化しないその他の部位を検知することが可能であることを特徴とする請求項 7 に記載のプロープ。

【請求項 1 5】

前記症状が過敏性腸症候群であり、抗体が、全ての P 2 X₇ の発現を検知することが可能な 2 つ目の抗体と共に使用されることを特徴とする請求項 7 又は 1 4 に記載のプロープ。

10

【請求項 1 6】

請求項 1 乃至 1 0 のいずれか一項に記載のプロープを使用して機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別する工程、

リセプターの発現プロファイルを得る工程、そして

前記リセプターの発現プロファイルを正常なプロファイルと比較する工程を含むことを特徴とする病気又は症状を発見する方法。

【請求項 1 7】

前記リセプターの発現プロファイルが、非機能性リセプターのものであることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記プロープが、アデノシントリフォスフェート (ATP) の P 2 X₇ リセプターへの結合に関する変化を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記プロープが、P 2 X₇ リセプターにおける細孔形成に必要な 1 つ又は複数のタンパク質の結合に関する変化を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

30

【請求項 2 0】

前記プロープが、結合した A T P が存在しない時に露わな P 2 X₇ リセプターの 1 部分又は複数部分を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記（P 2 X₇ リセプターの）部分が、P 2 X₇ モノマーを含むことを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 2】

リセプターの発現プロファイルが、in situ イメージ技術を用いて得られることを特徴とする請求項 1 6 乃至 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

リセプターの発現プロファイルが、顕微鏡、共焦点顕微鏡、又は蛍光活性細胞分別を用いて得られることを特徴とする請求項 1 6 乃至 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

病気又は症状を発見するための請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に記載のプロープの使用。

【請求項 2 5】

単離された細胞又は組織であって、請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に記載のプロープと錯化された細胞又は組織。

50

【請求項 26】

過敏性腸症候群を診断する方法であって、細胞及び／又は組織の P2X₇ の発現プロファイルを検知し、検知されたプロファイルと正常な細胞及び／又は組織の既定の発現プロファイルと比較することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

P2X₇ の発現プロファイルの検知が、1つ又は複数の抗体の使用を含むことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

過敏性腸症候群を診断するための 1つ又は複数の抗体の使用。

【請求項 29】

過敏性腸症候群を診断する方法であって、P2X₇ リセプターの機能を回復させるよう適合された組成物を投与することを含む方法。

10

【請求項 30】

病気又は症状を治療又は予防するための抗体であって、機能性 P2X₇ リセプターと非機能性 P2X₇ リセプターとを識別するよう適合されていて、かつ非機能性リセプターのみに結合することを特徴とする抗体。

【請求項 31】

アデノシントリフォスフェート(ATP)の P2X₇ リセプターへの結合に関する変化を検知することによって機能性 P2X₇ リセプターと非機能性 P2X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 30 に記載の抗体。

20

【請求項 32】

P2X₇ リセプターにおける細孔形成に必要な 1つ又は複数のタンパク質の結合に関する変化を検知することによって機能性 P2X₇ リセプターと非機能性 P2X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 30 に記載の抗体。

【請求項 33】

前記プローブが、結合した ATP が存在しない時に露わな P2X₇ リセプターの 1 部分又は複数部分を検知することによって機能性 P2X₇ リセプターと非機能性 P2X₇ リセプターとを識別するよう適合されていることを特徴とする請求項 30 に記載の抗体。

【請求項 34】

前記(P2X₇ リセプターの)部分が、P2X₇ モノマーを含むことを特徴とする請求項 30 に記載の抗体。

30

【請求項 35】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、人体に適応させた抗体、ヒト抗体、又はこれらの適切な断片であることを特徴とする請求項 30 乃至 34 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 36】

リセプターが哺乳類の P2X₇ リセプターであって、抗体が、アミノ酸 210 におけるプロリンがトランス(trans)コンフォメーションである配列を有する機能性リセプターと、アミノ酸 210 におけるプロリンがシス(cis)コンフォメーションである配列を有する非機能性リセプターとを識別することを特徴とする請求項 30 乃至 34 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 37】

抗体が、P2X₇ リセプターのエピトープ配列の Gly 200 から Cys 216 までの範囲に対して生成された抗体であることを特徴とする請求項 36 に記載の抗体。

【請求項 38】

リセプターが哺乳類の P2X₇ リセプターであって、抗体が、アミノ酸 199 におけるプロリンがトランス(trans)コンフォメーションである配列を有する機能性リセプターと、アミノ酸 199 におけるプロリンがシス(cis)コンフォメーションである配列を有する非機能性リセプターとを識別することを特徴とする請求項 30 乃至 34 のいずれか一項に記載の抗体。

50

【請求項 39】

前記病気又は症状が、前立腺、乳、皮膚、肺、頸部、子宮、胃、食道、膀胱、結腸及び
 膣癌、その他の上皮細胞癌、悪性リンパ腫、その他の血液癌、過敏性腸症候群及びウィル
 ス又はその他の病原性生物による感染からなる群から選択されることを特徴とする請求項
 30乃至37のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 40】

前記ウイルス又は（病原性）生物が、HIV又はヒト型結核菌であることを特徴とする
 請求項39に記載の抗体。

【請求項 41】

請求項30乃至40のいずれか一項に記載の抗体を生成するよう適合されたエピトープ 10
 。

【請求項 42】

エピトープが、ケミカルクロスリンカー、マレイミドカプロイル-N-ヒドロキシサク
 シニミド(MCS)によってジフテリアトキシニンにC-ターミナルCys残基を介して連結
 されていて、このことによって連結されたエピトープペプチドによって適合されるコンフ
 ォメーションが安定したシス(cis)プロリンの立体配置を占めることを特徴とする請求項
 41に記載のエピトープ。

【請求項 43】

患者の病気や症状を治療するための治療剤としての抗体の使用であって、正常な（機能
 性）リセプターを発現している細胞には影響を及ぼさずに、細胞の表面に発現されている 20
 異常な又は非機能性P2X₇リセプターをターゲットとすることによって、プログラムさ
 れた細胞死を規制することを特徴とする、請求項30乃至40のいずれか一項に記載の抗
 体の使用。

【請求項 44】

請求項30乃至40のいずれか一項に記載の抗体を生成させるような、請求項41又は
 42に記載のエピトープの使用。

【請求項 45】

患者の病気又は症状の治療又は予防のための薬学的組成物であって、薬学的に効果的な
 量の請求項30乃至40のいずれか一項に記載の抗体、又はそのような量（の抗体）を生
 成させるエピトープを含み、異常な又は非機能性P2X₇リセプターを表面上に発現して 30
 いる細胞のプログラムされた細胞死を規制することができることを特徴とする薬学的組成
 物。

【請求項 46】

患者の病気又は症状の治療又は予防のための調剤であって、患者の細胞又は組織におい
 てATPのP2X₇リセプターへの供給を制御するATPエーゼ又はATPDエーゼの発
 現を規制するよう適合された1つ又は複数の物質を含むことを特徴とする調剤。

【請求項 47】

患者の細胞又は組織においてATPのP2X₇リセプターへの供給を制御するATPエ
 ーゼ又はATPDエーゼの発現を規制するよう適合された1つ又は複数の物質を含む調剤
 を投与する工程を含むことを特徴とする、患者の病気又は症状の治療又は予防方法。 40

【請求項 48】

病気又は症状が前立腺、乳、皮膚、肺、頸部、子宮、胃、食道、膀胱、結腸及び膣癌、
 その他の上皮細胞癌、悪性リンパ腫、その他の血液癌、過敏性腸症候群及びウィルス又は
 その他の病原性生物による感染からなる群から選択されることを特徴とする請求項46に
 記載の調剤。

【請求項 49】

病気又は症状が前立腺、乳、皮膚、肺、頸部、子宮、胃、食道、膀胱、結腸及び膣癌、
 その他の上皮細胞癌、悪性リンパ腫、その他の血液癌、過敏性腸症候群、及びウィルス又
 はその他の病原性生物による感染からなる群から選択されることを特徴とする請求項47
 に記載の方法。

【請求項 50】

生体内での (in vivo) 診断又は治療に使用され、抗体が人体に適應された、又はヒト抗体、又はその断片であることを特徴とする請求項 35 乃至 40 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 51】

スキャン技術を使用する検知に適した放射性ラベルと錯化された請求項 50 に記載の抗体。

【請求項 52】

前記スキャン技術が、陽電子放射断層撮影 (法) であることを特徴とする請求項 51 に記載の抗体。

10

【請求項 53】

フローサイトメトリーの使用に適した蛍光ラベルと錯化された請求項 50 に記載の抗体。

【請求項 54】

比色分析法に適したマトリックスと錯化された請求項 50 に記載の抗体。

【請求項 55】

請求項 1 乃至 15 のいずれか一項に記載のプロープと、正常な P2X₇ リセプターの発現プロファイルを含んだ非機能性 P2X₇ リセプターを検知するためのキット。

【請求項 56】

請求項 30 乃至 40 のいずれか一項に記載の抗体と、正常な P2X₇ リセプターの発現プロファイルを含んだ非機能性 P2X₇ リセプターを検知するためのキット。

20

【請求項 57】

請求項 50 乃至 54 のいずれか一項に記載の抗体と、正常な P2X₇ リセプターの発現プロファイルを含んだ非機能性 P2X₇ リセプターを検知するためのキット。

【請求項 58】

血液サンプル中の非機能性 P2X₇ リセプターを検知するよう適合された請求項 56 又は 57 に記載のキット。

【請求項 59】

ATP エーゼ及び ATPD エーゼが CD39 及び CD73 から選ばれることを特徴とする請求項 46 又は 48 に記載の調剤。

30

【請求項 60】

1 つ又は複数の物質が、1 つ又は複数の ATP 類似体であることを特徴とする請求項 46、48、又は 59 に記載の調剤。

【請求項 61】

病気又は症状を治療又は予防する方法であって、請求項 30 乃至 40 のいずれか一項に記載の抗体の使用を含むことを特徴とする方法。

【請求項 62】

病気又は症状を治療又は予防する方法であって、請求項 41 又は 42 に記載のエピトープの使用を含むことを特徴とする方法。

【請求項 63】

病気又は症状を治療又は予防する方法であって、請求項 45 に記載の薬学的組成物の使用を含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 64】

病気又は症状を治療又は予防する方法であって、請求項 46 又は 48 に記載の調剤の使用を含むことを特徴とする方法。

【請求項 65】

エピトープが Val65 - Lys81 であることを特徴とする請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 66】

本願明細書中の実施例 1 乃至 3 のいずれかの実施例を参照に詳しく説明されていること

50

を特徴とする請求項 30 に記載の抗体。

【請求項 67】

本願明細書中の実施例 10 又は 11 を参照に詳しく説明されていることを特徴とする、患者の病気又は症状の治療又は予防方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌を含めた病気の診断及び治療に関する。本発明に関連する病気の種類としては、上皮細胞及び悪性リンパ腫に由来する癌を含む。本発明はまた、その他の症状、例えば、異常な組織生成／成長、過敏性腸症候群及びウィルスやその他の感染にも関する。本発明はまた、上記以外の病気や症状に適用され得る可能性も大いにある。

【背景技術】

【0002】

アデノシントリフォスフェート (ATP) は、 $P2X$ リセプターとして知られているリガンド - ゲートドブリン活性リセプターを活性化することができる。リセプターのサブタイプとして $P2X_1$ から $P2X_7$ が同定されている。上皮細胞や白血球、リンパ球、胸腺細胞、マクロファージ及びデンドリチック細胞等を含め、多くの細胞において異なる種類の $P2X$ リセプターのサブタイプが存在することが知られている。

【0003】

$P2X$ リセプターは、カルシウムやその他、例えばリンやナトリウムなどいくつかのカチオンに対して透過性を有している。 $P2X$ リセプターを介したカルシウムの細胞内への流入は、細胞死と関連することもある。

【0004】

$P2X_7$ サブタイプが種々の細胞においてアポトーシス、又はプログラムされた細胞死に関連していると思われる。ATP が存在していると、細胞表面に発現された $P2X_7$ リセプターは、一秒以内に、細胞膜を通るカルシウムチャンネルを開けることが可能である。ATP への継続的露出は、大きな孔の形成につながり、数秒から数十秒以内に、細胞を過剰のカルシウムで飽和させ、アポトーシスを引き起こすこともあり得る。

【0005】

ヒト及びラットの $P2X_7$ リセプターのアミノ酸配列は、例えば、図 1 にも参照されているように知られている (例えば、特許文献 1 参照。)。

【0006】

例えば、上皮癌細胞においては、ATP への露出は通常アポトーシスという結果にならない。このような細胞では細孔を形成することができない $P2X_7$ リセプターを発現することが見つかっている。これらは非機能性リセプターとみなされる。

【0007】

げっ歯類のハイブリドーマを含む動物細胞株同様、ヒトの癌細胞株、例えば前立腺 PC3 及び乳 MCF7 などでは、細胞表面において $P2X_7$ リセプターが非機能性のコンフォメーションで見つかっている。

【0008】

悪性リンパ腫の患者の B - セルは非機能性 $P2X_7$ リセプターを発現している。リンパ腫は、細胞融解破壊を逃れる悪性なクローンから発達するものである。このプロセスが、さらに進行して悪性 B - リンパ球の蓄積、すなわちリンパ節障害及び / 又は巨脾症につながる。

【特許文献 1】米国特許 6133434 明細書

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

第一に、本発明は病気や症状を発見するためのプローブであって、前記プローブは機能

10

20

30

40

50

性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別するよう適合されている。好ましくは、前記プローブは、アデノシントリフォスフェート (ATP) の P 2 X₇ リセプターへの結合に関する変化を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別する、又は P 2 X₇ リセプターにおける細孔形成に必要な 1 つ又は複数のタンパク質の結合に関する変化を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別する。また別の実施態様においては、前記プローブは、結合した ATP が存在しない時に露わな P 2 X₇ リセプターの 1 部分又は複数部分を検知することによって機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別する。そのような前記 (P 2 X₇ リセプターの) 部分は、 P 2 X₇ モノマーを含んでいてもよい。

10

【 0 0 1 0 】

本発明はまた、上述したプローブを使用して機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別する工程、リセプターの発現プロファイルを提供する工程、及び前記工程で得たリセプターの発現プロファイルを正常なプロファイルと比較する工程、を含む病気又は症状を発見する方法をも提供する。(比較した結果の) 差異は、例えば、上段で示唆されているようにプローブ自体に関連して検知されてもよい。

【 0 0 1 1 】

プローブは、天然又は人工物であってもよい。プローブは、好ましくは抗体であり、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、人体に適応させた抗体、ヒト抗体、及びこれらの適切な断片でもよい。抗体は、(P 2 X₇ リセプターの) ATP 結合箇所 20 に隣接する細胞外の領域に位置するエピトープに対応するものであることが好ましい。リセプターがヒトの P 2 X₇ リセプターである場合、プローブは、アミノ酸 2 1 0 におけるプロリンがトランス (trans) コンフォメーションである配列を有する機能性リセプターと、アミノ酸 2 1 0 がシス (cis) コンフォメーションであって局所的なタンパク質構造を大いに変異させている配列を有する非機能性リセプターとを識別するように適合されていることが好ましい。

20

【 0 0 1 2 】

プローブは、当業者にとって自明な如何なる適当な技術を用いて調製されてもよい。

【 0 0 1 3 】

本発明の範囲は、プローブが ATP 結合位置において上述した以外のコンフォメーション変化を検知することによって、機能性 P 2 X₇ リセプターと非機能性 P 2 X₇ リセプターとを識別することを含む。例えば、検知される変化は上述したプロリン以外のアミノ酸 30 におけるものでもよい。そのようなアミノ酸の一例としては、P r o 1 9 9 が挙げられ、このアミノ酸は、シス (cis) コンフォメーションにあっては局所的なタンパク質構造を大いに変異させる。その他の例としては、検知される変化は別の観点においてでもよい。

30

【 0 0 1 4 】

プローブは、P 2 X₇ リセプターの機能状態によって変化しない領域を検知するよう適合されていてもよい。結合した ATP を欠いたモノマーサブユニットのコンフォメーションは、選択されたエピトープが ATP が結合していない時のみアクセスできるリセプターの表面領域の形を特異的に検知するなどして、プローブを用いて検知可能である。プローブは、例えば補助的又はその他のタンパク質など、細孔形成に必要な 1 つ又は複数のタン 40 パク質の結合の変化を検知してもよい。そのようなタンパク質の例としては、以下に限定されないが、ラミニン、インテグリン、β - アクチン、α - アクチン及びスーパーピリンなどがある。

40

【 0 0 1 5 】

本発明において、前腫瘍性細胞、極初期の腫瘍性組織、進行した腫瘍性組織上又は中に、又は、非機能性 P 2 X₇ リセプターを任意に発現している任意の腫瘍性細胞上に発現している非機能性 P 2 X₇ リセプターに結合又はこれを特異的に検知するために、P 2 X₇ サブタイプに特異的な抗体を使用することができる。すなわち、P 2 X₇ リセプターは、正常に細胞膜に発現されていて、部分的にチャンネルとして機能することが状態によって 50

50

は可能であっても、ゲートが閉じた、又は非機能性コンフォメーションの時のみ検知又は結合される。

【0016】

さらに、結合したATPを欠いたモノマーサブユニットのコンフォメーションもまた抗体によって検知可能である。なぜなら、選択されたエピトープは、ATPが結合していない時のみアクセス可能である表面領域の形を特異的に検知するからである。

【0017】

本発明において、非機能性P2X₇リセプターは、機能性リセプターに存在する構造からコンフォメーションの変化を起こすエピトープに対応する抗体を使用することによって検知又は結合できる。非機能性リセプターのアミノ酸配列は、機能性リセプターのアミノ酸配列と同一であり得ることが知られており、したがってリセプターにおけるコンフォメーションの変化は、リセプターとATPとの相互関係に関連するものである。前述したように、ATP分子は、リセプターのアゴニストであるから、ATPがリセプターに結合している時、リセプターは、カルシウムイオンの流入のための細胞膜を通るチャンネルを開けることが可能となる。すなわち、非機能性は、ATPアゴニストのリセプターへの適当な結合が欠如しているために起こり、その原因としては、不十分な生産又は分解率の増加による局所的な利用可能なATPの不足を含む現象が考えられる。もしATPのリセプターへの結合が妨げられれば、リセプターのコンフォメーションは変化される。これはATPの結合によって影響を受けるタンパク質の領域に結合するよう特別に設計された抗体を用いることによって検知することができる。

10

20

【0018】

ヒトのP2X₇リセプターの場合、コンフォメーションの変化に関わる特定の配列はPro210を含み、これは結合したATPがないとトランス(trans)フォームからシス(cis)フォームへとコンフォメーションが変化する。したがって、ヒトのリセプターの場合、抗体を生成する適切なエピトープの配列はPro210を含み、抗体反応を引き起こすのに必要な適切な範囲で、この残基の両側に延びていてもよい。限定的な例ではないが、Gly200からCys216に及ぶ部分を含んでいてもよい。さらに、ラットなどその他の哺乳類のホモログな部分であって、ヒトの組織と交差反応するものを使用することもできる。例えば、ヒトの配列と比較して2つのアミノ酸の置換があるが、ラットの同じGly200からCys216部分を使用することもできる(例えば、特許文献2参照)。

30

【特許文献2】米国特許6133434明細書

【0019】

非ヒトリセプターの場合、特定の配列は適切な実験によって確認することができる。

【0020】

本発明による非機能性P2X₇リセプターの検知は、機能性P2X₇リセプター(すなわち正常な細胞)がラベルされないままの分布パターンを示すこともある。しかしながら、P2X₇リセプターの非機能性コンフォメーションは、最初は細胞核及び細胞質において、プレ腫瘍形成の初期段階において検知することができる。例えば、上皮細胞癌の例においては、本発明による方法の使用によって、生体組織検査のヘマトキシリン及びイオシン(「H&E」)染色スライドによる通常の癌の病理学的な症状の検知より数年先立ってプレ腫瘍形成を検知することも可能である。すなわち、前立腺、皮膚、乳癌などを現在より格段早く検知し、早期に治療を開始するという利益をもたらすことが可能である。

40

【0021】

本発明のプロープ及び方法によって検知される病気や症状の完全なる範囲はまだ確認されていない。しかしながら、前立腺、乳、皮膚、肺、頸部、子宮、胃、食道、膀胱、結腸、及び膈などの上皮細胞癌、悪性リンパ腫を含む血液の癌、過敏性腸症候群、及びHIV又はその他、ヒト型結核菌などの病原性のウィルスによる感染を含むと確信できる。感染は、機能性に必要とされるコファクターを阻害することによって直接に、もしくは上皮又はその他の細胞上のP2X₇機能を阻害するようなコファクターをアップレギュレーション

50

ンすることによって、非機能性リセプターを発現させ、感染した細胞をアポトーシスによる破壊をより受けにくくすることもある。

【0022】

特に記載がない場合は、「病気又は症状」という語句は、ここでは前段で述べられた全ての特定の病気及び症状を含むものとする。

【0023】

過敏性腸症候群（「IBS」）という特定のケースにおいては、この症状を持つ患者においては、上皮の下の上皮に、広く分布して存在するリンパ球において通常P2X₇リセプターを発現させる消化管の粘膜がアップレギュレートされることが見つっている。感染した患者において、この発現の増加は十二指腸から直腸の間の粘膜において観察することができる。発現の増加は、単離された領域において見られることもあり、もしくは、より極端なケースでは腸管の全長に渡って全体的に増加していることもある。

10

【0024】

最も軽症なケースでは、全体的なP2X₇リセプターはアップレギュレートされているが、これらはすべて機能性リセプターであり、かつ上皮に侵入することはない。より深刻なケースでは、全体的なP2X₇リセプターの発現はさらに高く、そして消化管の最も影響を受けている箇所においては非機能性リセプターを呈している。これらは、例えば、盲腸の粘膜に集中していることもあり、上皮に侵入していることもある。最も深刻なケースは、全体的なP2X₇リセプターの発現がより一層増加していて、かつリセプターの大部分は非機能性で上皮細胞により多く侵入している場合である。

20

【0025】

前述したように、P2X₇リセプターの非機能性は、ATPアゴニストのリセプターへの適切な結合が欠如していることに起因する。その原因は、生産不足又はエクト-ATPエーゼのATPの酵素分解率の増加による、局所的な利用可能なATPの不足を含むこともある。もしATPのリセプターへの結合が妨げられれば、先に述べたようにリセプターのコンフォメーションは変わり、そしてこのことを本発明のプローブを用いて検知することができる。しかし、全P2X₇リセプターの分布を検知するには、ATP結合に影響を受けないP2X₇リセプターの細胞外領域のその他のエピトープを使用する方法が最も好適である。プローブが、Val65-Lys81などの機能性及び非機能性コンフォメーションに共通するエピトープを検知することによって、機能状態によって変化しないP2X₇リセプターの領域を検知できてよい。

30

【0026】

本発明の範疇には、全P2X₇の分布と、消化管の粘膜において発現された非機能性リセプターの割合とを特に区別するために、P2X₇サブタイプに特異的な1つ又は2つの抗体を使用することにも含まれる。よって、2つの抗体は共に使用されることで、リセプターの全体数とゲートが閉じた又は非機能性コンフォメーションにおいてのみ存在するリセプターチャンネルとの両方を検知することができる。1つ目の抗体は、P2X₇リセプターの全体数を検知するよう適合されている。本発明の抗体を含む、又は抗体に連結されたプローブは、IBSを検知する2つ目の抗体を提供することができ、機能性と非機能性P2X₇リセプターとを識別するのみではなく、機能性によって変化しないリセプターのその他の領域を検知することもできる。これらの抗体は別々に、又は同時に使用されてもよい。好ましくは、組み合わせて使用することである。

40

【0027】

非機能性P2X₇リセプターとは別に、全P2X₇リセプターを検知することが症状の深刻度を決定する。胃腸部の粘膜における非機能性P2X₇リセプターの発現は、正常な細胞がラベルされない状態でパターンとして現われる。その後、非機能性のP2X₇（リセプター）のコンフォメーションが、最初に、上皮下のストロマにおいて、症状が軽症なケースの部分的パッチから、上皮に侵入しているパッチを部分的に伴い、かつ胃腸管の全長に渡る広範囲における非機能性P2X₇リセプターの発現という程度の間で検知される。

50

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、過敏性腸症候群の診断方法を提供し、この方法は、細胞及び／又は組織の P 2 X₇ 発現プロファイルを検知し、そして正常な細胞及び／又は組織の既定の発現プロファイルと比較することを含む。P 2 X₇ 発現プロファイルの検知は 1 つ又は複数の抗体の使用を含むことが好ましい。さらに、この抗体は本発明のプロープと異なり、A T P の P 2 X₇ リセプターへの結合に関する変化を検知しないようなものであることが好ましい。このような抗体の調製は、当業者にとって自明のものである。

【 0 0 2 9 】

本発明は、過敏性腸症候群を診断するための 1 つ又は複数の抗体の使用を含む。

【 0 0 3 0 】

この症状の治療養法は、本発明の第 3 の側面と関連して以下に述べられる。

【 0 0 3 1 】

診断法は、標準的な顕微鏡を用いた通常の免疫組織化学技術において使用できる。診断法は、生体内 (in vivo) で使用されることもできる。

【 0 0 3 2 】

本発明のプロープ及び方法を用いた診断は、体内組織内の分布を検知する in situ イメージ技術を用いて実行されることもできる。これに加えて、標準的顕微鏡、共焦点顕微鏡及び蛍光活性細胞分類法を使用してもよい。リンパ、前立腺、乳、皮膚、肺、子宮、膀胱、膣、胃、食道を検査するための通常の免疫組織化学技術、及び類似の生体組織検査、また胸やその他の組織の細針吸引法、及び腫瘍の発見のために採取されるような細胞塗抹 (標本) も使用できる。

【 0 0 3 3 】

生体内診断には、プロープはヒト抗体又はドメインであり、動物成分を含まず製造されたものが好ましい。抗体は、好ましくは短命の放射性ラベルでラベルされており、陽電子放射断層撮影法 (P E T スキャナー) などのスキャン技術によって検知できることが好ましい。このようなイメージ法は、体中のあらゆる箇所にあるラベルされた抗体の集合体を検知することが可能であり、よって腫瘍の存在と関連した非機能性 (P 2 X₇) リセプターの存在を知らせる。理想的には、このような検査は、第 1 の癌の発見の後に第 2 の癌の有無をチェックするためにのみ行われるべきであり、もしくは、血液検査 (下記参照) による一般的なスクリーンによって 1 つ又は複数の腫瘍の存在の可能性を発見してから行われるべきである。

【 0 0 3 4 】

本発明のプロープ及び方法は、非機能性 P 2 X₇ リセプター、すなわち癌又は癌の前兆症状を検知するための血液検査を提供するために適用されてもよい。例えば、蛍光ラベルされた抗体 (モノクローナル又はポリクローナル) のプロープを、T リンパ球、B リンパ球、又はマクロファージなどの多種多様のゲートを備えた (gated) 白血球における非機能性リセプターの結合を検知するために、患者の血液細胞の一部をフローサイトメトリーにかけて使用することができる。

【 0 0 3 5 】

別の血液検査の方式では、プロープは、キット中に用意されたマトリックスに連結したラベルされた抗体という形態を取ることが好ましい。このようにすることによって、陽性の白血球に結合した抗体の色反応の有無によって検知することを可能となる。このようなキットは、医療行為を行う者によっての使用に適しているであろう。

【 0 0 3 6 】

類似した血液検査において、本発明の抗体プロープは、癌はなくても 1 つ又は複数の白血球において P 2 X₇ の機能が欠如していて通常の細胞破壊道程が阻害されているような患者をスクリーンするための診断道具として使用することもできる。このような患者は、マクロファージが非機能性 P 2 X₇ リセプターを発現していて、そのようなマクロファージは、例えばヒト型結核菌、又はマラリアや H I V を含むその他の感染性の生物によって感染した細胞を破壊する機能が阻害されていることを示唆している。これらの (感染性)

10

20

30

40

50

生物は、1つ又は複数の白血球においてP2X₇の機能が欠如していて、通常の細胞破壊過程が阻害されているような患者において好適に増殖する。

【0037】

本発明によるプローブ及び方法は、他の技術と共に使用してもよい。

【0038】

本発明は、病気又は症状を治療するための抗体を提供し、この抗体は、機能性P2X₇リセプターと非機能性P2X₇リセプターとを識別し、非機能性P2X₇リセプターにのみ結合するよう適合されている。好ましくは、抗体はアデノシントリフォスフェート(ATP)のリセプターへの結合に関連した変化を検知することによって、もしくは、P2X₇リセプターにおける細孔を形成するために必要な1つ又は複数のタンパク質の結合の変化を検知することによって機能性P2X₇リセプターと非機能性P2X₇リセプターとを識別し、そして非機能性P2X₇リセプターにのみ結合するよう適合されていることが好ましい。別の実施態様では、抗体は、結合したATPが存在しない時に露になるリセプターの部分を検知することによって機能性と非機能性P2X₇リセプターとを識別する。

10

【0039】

病気や症状を治療するための抗体は、それらの病気や症状を診断するための抗体と同じであってもよい。そのような抗体は、例えば、局所的な皮膚癌の治療に用いることができ得る。癌の計画的な治療には、抗体又はその活性部分は、免疫反応の望ましくない副作用を最小に抑えるべく、ヒトの又はヒトのドメインのものであるべきである。

【0040】

20

本発明の抗体は、ヒトを含めた哺乳類における病気や症状を治療するために使用することが可能である。適用できる病気や症状の例は、本発明のプローブと関連して上述した通りである。

【0041】

本発明はまた、本発明の第2の側面の抗体を生成することが可能なエピトープを提供する。このエピトープは、Pro210を含み、かつGly200からCys216の部分を含むことが好ましい(ヒトリセプターのP2X₇配列における)。エピトープは、Cys残基(Cys216)のC-ターミナルに連結されていることが好ましく、このCys残基はマレイミドカプロイル-N-ヒドロキシサクシニミド(MCS)というケミカルクロス-リンカーを介してジフテリアトキシンにクロスリンクされている。このようにすることによって、連結されたエピトープペプチドのコンフォメーションが安定したシス(cis)プロリン立体配置を占めるようになる。

30

【0042】

この特定のペプチドのコンフォメーションは、1つ又は複数の病気や症状を抱えたヒト又は動物に対して与えられるように意図されている。前記病気や症状とは、特に、前立腺、胸、皮膚、肺、頸部、子宮、胃、食道、膀胱、結腸及び膣癌などの上皮癌や、悪性リンパ腫、過敏性腸症候群及びHIVなどのウィルスやヒト型結核菌などその他の病原性生物による感染のことである。患者は、(上述の)複合エピトープの投与によって免疫反応を引き起こし、そうすることによって感染した細胞上に存在する非機能性P2X₇リセプターを認識する抗体を生成し、すなわちこれら感染した細胞に結合して適切な免疫細胞を喚起し錯体細胞を破壊させるようになることが好ましい。予め細胞死を遂げるようなその他の細胞も影響を受けることもある。

40

【0043】

上記で参照された配列は、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明は代わりとなる配列やキャリアーやクロス-リンカーなど類似の特定の免疫反応を作り出すものを含む。好ましくは、免疫反応は非機能性P2X₇リセプターにのみ反応し、望ましくは全ての機能性P2X₇リセプターに反応せず、すなわち副作用を避けるものである。

【0044】

本発明は第2の側面において、細胞表面に発現されている異常な又は非機能性P2X₇リセプターをターゲットとすることによってプログラムされた細胞死を規制し、かつ正常

50

な（機能性）リセプターを発現している細胞には触れず、本発明の抗体を患者の病気や症状を治療するための治療用媒体として使用する方法をも提供する。本発明はまた、上述したように、抗体を生成する本発明のエピトープを使用することを含む。

【0045】

本発明はまた、患者の病気や症状を治療又は予防するための薬学的組成物を提供する。この組成物は、薬学的に有効量の抗体、又はそのような量（の抗体）を生成するようなエピトープを含み、異常な又は非機能性 $P2X_7$ リセプターを表面に発現している細胞のプログラムされた細胞死を規制することが可能なものである。

【0046】

薬学的に有効量の抗体又はエピトープは、患者によって及び病気又は症状の性質によって変化する。これらの変化する値は、当業者によって確認することが可能である。

【0047】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容可能なキャリアーと共に適用されてもよく、そのようなキャリアーはこの分野において周知のもの又は今後出来てくるものであって、使用用途に適切なもののいずれでもよい。キャリアー同様、本発明の薬学的組成物は、顔料、防腐剤、緩衝剤及び抗酸化剤等その他の成分を含有していても良い。

【0048】

本発明の薬学的組成物は如何なる形態でもよく、例えば、塗布剤、クリーム、液体、懸濁液、パウダー、タブレット、カプセル、坐薬又は腔坐薬等の形態で投与されてもよい。

【0049】

本発明の薬学的組成物は如何なる適当な方法で投与されてもよく、例えば経口、非経口、静脈、筋肉、皮下又は局所的投与を含んでもよい。

【0050】

本発明はまた、患者の病気又は症状を治療又は予防する方法をも提供する。この方法は、本発明の薬学的組成物を患者に投与することを含むものである。

【0051】

本発明はまた、患者の病気又は症状の治療又は予防において、本発明の薬学的組成物を使用することを提供する。

【0052】

当業者にとっては、本発明の薬学的組成物の使用方法は、最大の効果を得るために調整される必要もあることは自明のことである。病気又は症状の深刻度や性質を考慮することが必要であるだろう。

【0053】

本発明の第3の側面は、例えば悪性リンパ腫を持つ患者のB-セルなどにおける、ATPの $P2X_7$ リセプターへの供給を制御しているATPエーゼ（酵素）の発現に焦点を当てる。白血球の $P2X_7$ リセプターのチャンネルの開放は、エクト-ATPエーゼ及びエクト-ATPジフォスフォハイドロラーゼ（エクト-ATPDエーゼ）によるすばやいATPアゴニストの加水分解によって完了する。これらの酵素はATPに依存する数多くの生体的プロセスを規制するものである。エクト-ATPエーゼ及びエクト-ATPDエーゼの基質特異的な活動は、白血球細胞表面に、CD39を含めた複数型の存在を示唆している。これらエクト-ATPエーゼ及びエクト-ATPDエーゼの増殖は、 $P2X_7$ の細孔形成を制御するのに必要なATPの供給、それに続くB-セル数を規制するのに必要なプログラムされた細胞死に制限を設けることもある。

【0054】

同様に、IBSのケースにおいても、ATPエーゼの増殖がATPアゴニストの $P2X_7$ リセプターへの適切な結合の欠如に関与しているかもしれないと考えられている。

【0055】

したがって、この第3の側面において、本発明は患者の病気又は症状の治療又は予防のための調剤を提供する。この調剤は、患者の細胞又は組織の $P2X_7$ リセプターへのATPの供給を制御するATPエーゼの発現を規制するよう適合された1つ又は複数の物質を

10

20

30

40

50

含んでいる。本発明はまた、患者の病気又は症状の治療又は予防方法を提供し、この方法は、患者の細胞又は組織の $P2X_7$ リセプターへの ATP の供給を制御する ATP エーゼの発現を規制するよう適合された 1 つ又は複数の物質を含んでいる調剤を投与する工程を含んでいる。

【0056】

そのような ATP エーゼの例としては CD 39 又は CD 73 でもよい。

【0057】

そのような物質は ATP の類似体という形態であってもよく、好ましくは加水分解不可で、かつ $P2X_7$ に特異的であり、又は $P2X_7$ の結合サイトへの ATP の供給率を低減させる ATP エーゼの局所的な活動を阻害する他の物質でもよい。調剤は、非機能性 $P2X_7$ リセプターに特異的に対応するヒト抗体の形態でもよい。

10

【0058】

ATP 類似体のような物質は、 $P2X_7$ に結合し、 $P2X_7$ を細孔が開いたコンフォメーションに維持し、すなわち細孔を機能性の有する状態に強制する。この状態においては、($P2X_7$ は) 大小両方のカチオン透過酵素を摂取することができる。このような方法で、前述の合成アゴニストの使用がリセプターの機能を回復させ、同時に、細胞に対する $P2X_7$ のカルシウムチャンネルとしての役割によってもたらす成長を制御することもできる。

【0059】

(本発明を適用する) 病気や症状は、好ましくは悪性リンパ腫又は IBS であるが、その他の上皮細胞又は血液癌又はウィルス及びその他の病原性の感染を含めたその他の病気や症状でもよい。

20

【0060】

悪性リンパ腫のケースにおいては、ATP エーゼは $P2X_7$ リセプターへの ATP の局所的な供給を制御し、このことによって $P2X_7$ リセプターに結合可能な ATP の量を減らし、これらのリセプターを不活性化する。これはプログラムされた B - セル死を激減させることにつながる。これらの ATP エーゼは、B - セル表面に特異的に発現されていて、悪性リンパ腫においてはさらにより多く発現されているようである。特定の ATP エーゼ阻害物質の適用が、プログラムされた B - セルを規制するように $P2X_7$ リセプター上の ATP の供給率を規制するために使用されるのが好ましい。

30

【0061】

悪性リンパ腫の治療のためには、上述の物質は、加水分解不可な形態の $P2X_7$ アゴニストであって、ATP エーゼ又は ATP D エーゼを妨害することが可能な合成アゴニストを含んでいても良い。

【0062】

過敏性腸症候群と関連して、本発明の調剤の投与は、粘膜の症状を表している領域の下筋の過剰活動によって低減されているかもしれないリセプターの機能を回復させるように意図されている。本発明の調剤は、粘膜に直接働きかけて非機能性リセプターを除去し、これによって局所的に正常な消化管の分泌メカニズムを回復させてもよい。治療方法は、局所的な ATP の非機能性リセプターへの供給を回復させ、それによって正常なリセプター機能が回復されることを目的とする。リセプター機能の制御の結果としては、消化器官の分泌及び蠕動(ぜんどう)運動の正常な制御が回復されることを含む。これは、 $P2X_7$ に特異的な合成アゴニスト、好ましくは、ATP エーゼによって加水分解されないアゴニストの腸溶又は全身的な供給を適用する、もしくは、非機能性 $P2X_7$ リセプターに対応する抗体、好ましくは、非機能性リセプターを除去し、機能性リセプターのみを残すような、小さな特異的ヒト抗体を全身的に投与することによって達成され得る。

40

【0063】

仮に平滑筋の下筋の異常な蠕動運動が正常な機能性 $P2X_7$ リセプターに結合する ATP の局所的な供給率を低減されているとすれば、治療法は、消化管の運動を制限することによって平滑筋による ATP の摂取又は使用を制限するという方法を用いて、この天然なア

50

ゴニストの供給を回復することを含むものでもよい。

【0064】

本発明はまた、病気又は症状の治療のための薬学的組成物を提供し、この組成物は、 $P2X_7$ リセプターへの ATP の供給を制御する ATP エーゼ（酵素）の発現を規制するよう適合された薬学的に有効量の 1 つ又は複数の物質を含む。

【0065】

本発明は全ての側面において、ウィルスに感染した細胞内で非機能性 $P2X_7$ リセプターがより多く発現されているためにウィルスが保護されている、もしくは正常な細胞状態であってもそのような（非機能性）リセプターが増加発現されているような、ウィルス感染がもたらす異常な $P2X_7$ リセプターが関与するその他の病的症状に対して同様に適用することにまで及ぶ。

10

【0066】

本発明は、過敏性腸症候群を治療する方法をも提供し、この方法は、上段で定義された薬学的組成物を患者に投与することを含む。

【0067】

本発明はまた、そのような薬学的組成物を過敏性腸症候群の治療において使用することを提供する。

【0068】

上記の 1 つ又は複数の薬学的に有効な組成物を使用するパターンについては、最良の効果をj得るために適宜変更されなければならないこともある。

20

【0069】

別の形で表現するならば、本発明は過敏性腸症候群の治療方法を提供し、その方法は $P2X_7$ リセプター機能を回復させるよう適合された組成物を投与することを含んでいる。リセプターの機能は、過敏になっている粘膜の領域の下にある筋肉の過剰活動によって消耗していることもある。前記組成物は、上段で述べた本発明の調剤に含まれる物質と同じであってもよい。

【0070】

さらなる側面から、本発明はタンパク質の異なるコンフォメーションを識別する方法を提供する。この方法は、抗体を生成させることができるエピトープ、又は抗体そのものを用い、選択されたコンフォメーションを有するタンパク質の全ての集合体に結合することにより特定の薬学的な成果（アクティブ/パッシブ免疫化）を挙げることによってなされる。この一例として、 $VCJD$ の症状につながるプリオンタンパク質のコンフォメーションが挙げられる。タンパク質の異常な形態は、特定の抗体又は抗体を生成させるようなエピトープによってターゲットできる。（エピトープは）最良な薬学的効果を得るためにヒトの、かつ小さなサイズのものであることが好ましい。

30

【0071】

（図の簡略な説明）

図 1 は、ヒトの $P2X_7$ リセプターのアミノ酸配列を示す（先行技術）。配列 65 から 81 及び 200 から 216 はハイライトされており、以下において参照される。

【実施例】

40

【0072】

（本発明の詳細な説明）

非機能性の $P2X_7$ リセプターに対応する抗体を生成するため、図 1 に示す、配列 216 にある Cys を含んだ配列 200 から 216 のエピトープが使用された。

【0073】

無差別的な $P2X_7$ リセプターに対応する抗体を生成するため、図 1 に示す、配列 65 から 81 のエピトープが使用され、これに N -ターミナル Cys が付け加えられた。この抗体は、リセプターが非機能性であるかどうか識別することができないが、全ての（ $P2X_7$ ）リセプターを検知するように設計されており、2 種類の抗体を別々に使用して得られる染色を比較することによって機能性であるリセプターの割合を決定できるようになっ

50

ている。

【0074】

エピトープのCys残基は、コンフォメーションの安定性を維持し、かつより大きな抗原性構造を提供するために、10ペプチドエピトープがそれぞれのDTキャリアに付いたジフテリアトキシン(DT)キャリアに、マレイミドカプロイル-N-ヒドロキシサクシニミド(MCS)クロスリンカーを介して結合された。これらの複合エピトープは、通常の方法で、エピトープに特異的な抗体を生成するため、抗原として幾つかの動物(羊、ラビット及びマウス)に注入された。

【0075】

特定時に動物に注入された抗原/アジュバントの混合物の使用によって抗体を生成する工程は、周知技術に述べられている。抗体を生成するより具体的な例を下記に示す。

【0076】

(実施例1)

<羊の抗P2X₇抗体>

500μgの複合体(約100μgのP2X₇エピトープ)がリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で0.8mLまで薄められ、そして1.2mLのフロイントの完全アジュバントで乳化された。羊達は皮下及び筋肉の両方の複数箇所(約10箇所)に抗原/アジュバントエマルジョンを注入された。8週間後、同じ羊達に同量の乳化された複合体がフロイントの不完全アジュバントと一緒に複数箇所注入された。この作業は4週間後に繰り返され、そして頸静脈より採血された。集められた血清は、抗体の特異性について検査された。特定の抗体を含む血清の蓄えを提供するため、それらの羊達は8週間間隔で定期的に注入及び採血された。

【0077】

他の羊達は、上記のスケジュールと類似して同量の複合抗体を注入されたが、異なるアジュバントが使用された。これらの動物たちには、0.7mLの薄められた抗原が、0.1mLのクイルA(Quill A)/DEAEデクストラン(Dextran)溶液(1mLのPBSにつき2.5mgのクイルA(Quill A)+2.5mgのDEAEデクストラン(Dextran))及び1.2mLのISA50Vモンタニド(Montanide)と混ぜられた。このエマルジョンは、皮下及び筋肉の両方に複数箇所注入された。このアジュバントを使用して得られた抗体は、フロイントのアジュバントを使用して作られた抗体と同じ特異性を生み出した。

【0078】

(実施例2)

<ラビットの抗P2X₇抗体>

ラビットにおいて、羊同様の2種類のアジュバント及び注入スケジュールを用い抗体を生成させた。唯一の違いは、300μgの複合体が注入されたことであった。生成された抗体は羊においてできたものと同じ特異性を有しており、対応するエピトープを確実に識別することができた。

【0079】

(実施例3)

<マウスの抗P2X₇抗体>

マウスにおいて、複合エピトープに対する抗体と、非機能性P2X₇エピトープの複合していないエピトープに対する抗体が生成された(これは細孔を形成することのできない、すなわちアポトーシスを起こすことができないリセプターを識別することが可能である)。

【0080】

これらの実験においては、免疫促進製品CpG DNA(Coley Pharmaceutical Group Inc.登録商標)を含んでいるQAIGEN Pty Ltdの製品である、ImmuneasyTMが使用された。

【0081】

10

20

30

40

50

5 μ g のエピトープ又は複合エピトープが 70 μ L の PBS 及び 30 μ L の Immune EasyTM アジュバントで薄められた。マウスは皮下及び筋肉に複数箇所注入された。これが 2 週間後再度行われ、そしてさらに 2 週間後また繰り返し行われた。マウスは 3 回目の注入から 8 週間後に採血された。この方法によってマウスに生成された抗体は、異なる P2X₇ エピトープを識別することができ、そして P2X₇ 非機能性エピトープに対応する抗体もまた羊及びラビットにおいて生成された抗体と同じ結果を出した。

【0082】

上記の実施例が示すように、P2X₇ リセプターの種々のエピトープに対する抗体は、異なる種及び異なるアジュバントを用いても一貫して生成することができる。特に、通常の生理的状态において細孔を形成することができず、アポトーシスにおける機能を果たせない非機能性の状態にある P2X₇ リセプターを識別する P2X₇ リセプターのエピトープに対する抗体も常套的に生成することができる。

10

【0083】

(実施例 4)

非機能性 P2X₇ を検知する抗体は、P2X₇ がエチジウム又はルビジウムを搾取する能力によって表される公知の機能を有した P2X₇ (ヒト) を発現している細胞に抗体を結合させることによってテストされた。これらの P2X₇ タンパク質チャンネルは、塩基ペア 1513 において変異しているかもしれない、それならばチャンネルがアポトーシスを引き起こす細孔を形成しない。悪性 B 白血球に発現されたこれら及び類似した非機能性 P2X₇ リセプターもフローシメトリー及び通常の免疫組織化学において抗体と結合する一方、正常な機能性 P2X₇ (カルシウム、エチジウム及びルビジウムを大量に搾取することが可能) はこの抗体と結合することができなかった。なぜならば、機能性リセプターには非機能性リセプターを検知するために選ばれたエピトープがなかったからである。Pro210 は非機能性リセプターにおいてシス (cis) コンフォメーションを採っており、抗体を生成するために使用した複合エピトープにおいて固定されたのは、特にこのコンフォメーションであった。機能性で見られるリセプターにおいては、Pro210 はトランス (trans) コンフォメーションであった。これは、ATP (アデノシントリフォスフェート) の P2X₇ リセプターへの結合による結果であった。ATP が結合すると、ATP 結合箇所に直接隣接する部分の Pro210 はトランス (trans) 立体配置を採った。

20

【0084】

これは、Pro210 をトランス (trans) 立体配置に固定された Ala (アラニン) に変えさせるようなサイト対象の突然変異生成を用いて確認された。この変異したタンパク質は完全に機能性であると分かり、そして非機能性リセプターを検知するために生成された抗体と結合することができなかった。

30

【0085】

(実施例 5)

非機能性リセプターを検知する抗体の特異性についてのさらなる証拠は、P2X₇ を発現しているマクロファージをラベルした実験において得られた。マクロファージは全 P2X₇ に共通な抗体を使用したら抗体に結合したが、非機能性 P2X₇ に対応する抗体には、マウスハイブリドーマ細胞のように癌細胞に接するまで結合しなかった。マクロファージとハイブリドーマ細胞の接触が、マクロファージ上の非機能性 P2X₇ の発現を引き起こし、これが全 P2X₇ に共通な抗体同様、非機能性 P2X₇ に対する抗体によって検知された。

40

【0086】

悪性リンパ腫を持つ患者より抽出されたマクロファージ及び B - セル白血球がテストされ、これらの細胞全てが全 P2X₇ に共通な抗体同様、非機能性 P2X₇ に対する抗体に結合した。このことは、P2X₇ が検知された癌細胞全てにおいて非機能性であり、機能性 P2X₇ によって形成されるアポトーシスにつながる細孔は形成することができず、したがって癌細胞においてアポトーシスを引き起こすことができないということを立証している。

50

【 0 0 8 7 】

前立腺、乳、膀胱、皮膚、胃、頸部及びその他の部位などヒトにおける上皮細胞癌全て、そして悪性リンパ腫、慢性リンパ球白血病及び脳腫瘍、またテストされた犬の乳及び前立腺、猫の皮膚、マウスのハイブリドーマ細胞及びマウスの繊維肉腫細胞を含む他の哺乳類における同様の腫瘍全てが同じ非機能性 P 2 X₇ を発現する。ヒト、ラット、猫、犬及びマウスについて選択されたエピトープの配列の類似性は、上記のケース全てにおいて否定しがたい同定をするに充分足るものである。これは、これらの哺乳類動物における癌のメカニズムは同じで、全ての癌細胞は、活性化された時には通常細胞を死に追いやるアポトーシスにつながる細孔を形成することができない非機能性 P 2 X₇ リセプターを発現しているということである。このようにして、アポトーシスはスイッチがオフになった状態にあり、癌細胞は不死となる。

10

【 0 0 8 8 】

(実施例 6)

感染した B - セルリンパ球などの癌細胞が P 2 X₇ 機能によってアポトーシスを引き起こすことができないということのさらなる証拠として、非機能性 P 2 X₇ リセプターを有している白血病患者の B セルが培養物中で 2 時間の間 5 m M の A T P と共にインキュベートされた。その結果は、全ての非機能性リセプターが過剰量の A T P によって開き、アポトーシスを引き起こし、感染した細胞を死に至らせた。

【 0 0 8 9 】

(実施例 7)

抗体が選択的に癌細胞に結合するということのさらなる証拠として、基底細胞癌 (B C C) を持つ患者の皮膚が、不活性なクリーム地中に懸濁された非機能性 P 2 X₇ リセプターに対する抗体によって処理され、病変部及びその周辺に塗布された (下記の実施例 1 0 を参照) 。局所的抗体を毎日塗布して一週間以内に、B C C の全ての症状は消え、正常な皮膚は (非機能性) リセプターを有していないため、周辺の皮膚は全く影響を受けなかった。

20

【 0 0 9 0 】

(診断への適用)

動物に特異的非機能性 P 2 X₇ 抗体を用い、そしてヒト及びその他の哺乳類における大半の癌の診断への本発明のプロープ及び方法の共通した適用の説明を、例を挙げて述べる。

30

【 0 0 9 1 】

猫及び犬などの哺乳類及びヒトの前立腺組織では、本発明の抗体を診断のために使用すると、癌又は前癌性の障害がなければラベルを得ることはない。しかし、本発明の診断方法では、H & E 染色によって検知できる腫瘍に伴う形態的变化が現われなくとも、腫瘍性の変化の最初の徴候を明らかにすることができる。

【 0 0 9 2 】

この時点では、上皮細胞核において現われる最初のリセプターユニットを染色する必要がある。これらは病気の後のステージには細胞質に移動し、前立腺全体に渡ってフィールド効果を及ぼし、したがって腫瘍が確実に存在すると判断するにもより少量の組織を生体検査すれば足りる。病気の後半には、染色は上皮頂上に一層制限される。

40

【 0 0 9 3 】

同様に、ヒト及び猫や犬などその他の哺乳類における乳、肺、結腸及び皮膚などの上記以外の上皮細胞癌も、これらの他の組織においてはもはや明確なフィールド効果はないので余裕を持って検知することができる。

【 0 0 9 4 】

上記と同じステージの進行が乳や膣などのこれらその他の組織において見られ、細胞質の染色に先立って細胞核の染色があり、正常な組織は染色されない。感染した乳組織の管や小葉は、正常な形態が癌はないと示す場合にすら、感染した各管システム内の局所的なフィールド効果のため、容易に検知される。隣接する感染していない管は染色されない。

50

同様に、腫瘍を含む組織を直接排出する感染したリンパ腺も感染したリンパ球のフィールド効果によって腫瘍のサインを示す。したがって、センチネルリンパ節を（リンパ）節への細胞への癌の転移が全くなく検知することができる。

【0095】

基底細胞癌、扁平上皮細胞癌、形成異常班、悪性黒色腫などの皮膚癌は、非機能性リセプター、及び、表皮と真皮の深部との両方において正常な皮膚はラベルされない範囲をはるかに越えてケラチン生成細胞及びメラニン生成細胞中のチャンネル構成部（モノマー）の染色に対して陽性を示す。

【0096】

ヒト前立腺（PC3）及び乳（MCF7）及びげっ歯類のハイブリドーマなどのテストされた全ての哺乳類の癌細胞株は、細胞表面の非機能性リセプターが陽性であり、したがってこれらの癌細胞においてアポトーシスは抑制されている。この診断の一般的な応用は、マウスハイブリドーマ細胞における同じラベルを通して、ヒト以外の他の動物の種類においてもこのリセプターの普遍的な性質を示していると同えることである。ヒトの正常なB-セルリンパ球は機能性P2X₇リセプターを細胞表面に発現していることを示しており、したがって必要なときにはアポトーシスが起るが、悪性リンパ腫を持つ患者のヒトB-セルリンパ球は非機能性P2X₇リセプターを細胞表面に発現しており、したがってアポトーシスが妨げられていることを示している。

【0097】

（治療への適用）

癌細胞表面に発現された、この明らかに普遍的なP2X₇非機能性型をターゲットとしてアポトーシスを起こす試みは、ヒト及び他の哺乳類における大抵の癌を治療するために使用できる。実施例は以下に挙げる：

【0098】

（実施例8）

マウスハイブリドーマ細胞がマクロファージをベースに、非機能性P2X₇に対する結合力が強化された抗体が存在する条件と存在しない条件下で増殖された。4日間の間に、細胞数は、精製された通常のIgGと一緒にインキュベートされた細胞は 1×10^4 から 7×10^4 に増え、非機能性P2X₇抗体と一緒にインキュベートしたことによって細胞数は 1.5×10^4 に留まった。

【0099】

（実施例9）

この実施例は、P2X₇リセプターの非機能性エピトープに対応して生成された抗体がインビボ（in vivo）で腫瘍形成を抑制することが可能であるということを示す。

【0100】

上記に示すように、羊において生成された非機能性P2X₇エピトープに対応する抗体は、このマウスハイブリドーマ細胞の表面の非機能性P2X₇アポトーシスリセプターを認識した。この抗体をハイブリドーマ細胞培養物に加えると細胞の増殖を遅らせた。マウスハイブリドーマ細胞は、用意された同系交配されたマウス系統に注入すると腫瘍を形成する。

【0101】

この実験では、3つのグループの各グループ10匹のBalb-c雌マウスがそれぞれ以下の処置を受けた：

グループ1：1日目に、10匹のマウスがそれぞれ 1×10^6 ハイブリドーマ細胞が存在する0.5mLの細胞培養媒体中を腹膜組織に（IP）注入された。2日目、3日目には、それらのマウスは0.5mLの細胞培養媒体を腹膜組織に注入された。

グループ2：1日目に、10匹のマウスがそれぞれ1mgの羊のIgGを含み、 1×10^6 ハイブリドーマ細胞が存在する0.5mLの細胞培養媒体中を腹膜組織に（IP）注入された。2日目、3日目には、それらのマウスは1mgの精製された羊のIgGを含んだ0.5mLの細胞培養媒体を腹膜組織に注入された。

10

20

30

40

50

グループ 3 : 1 日目に、1 0 匹のマウスがそれぞれ 1 m g の精製された羊の抗 P 2 X₇ 非機能性エピトープ I g G を含み、 1×10^6 ハイブリドーマ細胞が存在する 0 . 5 m L の細胞培養媒体中を腹膜組織に (I P) 注入された。2 日目、3 日目には、それらのマウスは 1 m g の精製された羊の抗 P 2 X₇ I g G を含んだ 0 . 5 m L の細胞培養媒体を腹膜組織に注入された。

全てのグループのマウスは 1 1 日目に殺され、腫瘍の有無について検査が行われた。腫瘍は摘出されそして測量された。

結果は以下の通りである :

【 0 1 0 2 】

【 表 1 】

グループ	観察結果	1 匹当たりの腫瘍の平均重量 (± S D) (g)
1 : コントロール 1	1 0 匹中 9 匹に腫瘍	3.98±1.1
2 : コントロール 2	1 0 匹中 1 0 匹に腫瘍	2.93±0.9
3 : 実験用	1 0 匹中 9 匹に腫瘍	1.13±0.4

10

20

【 0 1 0 3 】

変量分析は、グループ間に腫瘍の重量についての有意差を示した (確率 $P < 0 . 0 1$) 。抗 P 2 X₇ 非機能性抗体の処置を受けた実験グループは、2 つのコントロールグループに比べて有意に異なっていた ($P < 0 . 0 1$) 。つまり、P 2 X₇ 非機能性エピトープに対する抗体を用いた処置は、実験動物において腫瘍の量を有意に低減したということである。

30

【 0 1 0 4 】

(実施例 1 0)

特異的親和性を有する精製抗体 (特異性を大いに向上させるため) が、3 つのヒト基底細胞癌 (「 B C C 」) に 7 日間液状態で、又はジメチコンクリームベース中に浮かせるかのどちらかで投与された。処置後、B C C 病状の痕跡は全く見られず、コントロール用皮膚はターゲットとするタンパク質が存在しないため全く影響を受けなかった。

40

【 0 1 0 5 】

(実施例 1 1)

再発した腫瘍及び形成異常班を含め、基底細胞癌 (B C C) 及び扁平上皮細胞癌 (S C C) という形の皮膚損傷 (両方とも一次腫瘍及び 2 次腫瘍) が、更なる試験において、精製された抗体と、精製又は通常の I g G のどちらか一方とが、ジメチコンクリームベース又は浸透性クリームベース中で混合されたものを使用して処置された。非機能性リセプターは正常な皮膚において存在しないため、如何なる正常な皮膚においても副作用は検知されなかった。全てのタイプの癌が抗体の存在に反応し、一日 2 回の処置で 3 6 時間から 1 週間の期間に消えた。その後 1 2 ヶ月間再発は起きなかった。処置された腫瘍のサイズは、直径 3 m m で周辺が盛り上がっていないものから、直径 5 c m そして厚さ 4 m m のもの

50

まで及んだ。全部で34の病理学的に認定された腫瘍が一週間以内の処置期間内にうまく除去された。

【0106】

患者への処置は、一般にヒトモノクローナル抗体（ハーセプチン(herceptin)のような）の形成が関係しており、したがって内部の癌も局所的な処置で得られた効能同様に治療することが可能であると考えられる。副作用を避けるために、リンパ球などの細胞表面上に発現されている正常な機能性P2X₇はすべてなんら作用を受けない必要がある。したがって、試みてはいるがアポトーシスを始めることができない細胞表面に発現されたタンパク質にのみ、抗体が結合するべきである。つまり、ターゲットとなる細胞は全て、癌細胞を含め、プログラムされた細胞死によって自滅しようとして試みている細胞のみである。これらの細胞のP2X₇リセプターは、特に癌細胞は、非機能性であるか又はATPが欠如した状態にあるであろう。

10

【0107】

（アクティブ免疫化）

アクティブ免疫化もまた、治療目的のために使用することができる。この場合、ヒト又はその他の哺乳類が、細胞表面において非機能性（ATP欠如）の形のリセプターにのみが採るコンフォメーションに類似したコンフォメーションに特定のエピトープ（1つ又は複数）に対して免疫化をされる必要がある。機能性リセプターに存在するエピトープの形の部分的な露出を含むコンフォメーションの柔軟性は避けるべきである。例えば、エピトープGly200-Cys216のシス(cis)立体配置は、適切な方法によって使用される前に固定されるべきである。この考え方に根拠があるという追加的な証拠として、抗体を生成するために使用されたマウス、ラビット及び羊を含む数多くの動物は免疫システムが損なわれていないという観察がある。これら多くの動物は1匹も如何なる腫瘍をも発達させることはなかった。

20

【0108】

下記の具体的な実施例がこれを説明する：

（実施例12）

プロトコール：実験はマウスの腫瘍モデルをベースにして行われた。40匹の生後10週間目の雌の同系交配させたBalb/Cマウスが使われ、20匹ずつの2つのグループに分けられた。グループ1は実験用であり、グループ2はコントロール用グループである。

30

【0109】

一日目：グループ1の20匹の実験用動物は、MCSクロスリンカーを介してジフテリアトキシニンに接合された0.1mgのペプチドエピトープ(hP2X₇配列200-216)を注入された。これは約0.02mgのペプチドエピトープを含んでいた。ペプチド接合体は、クイルA(QUILL A)/DEAEデクストラン(Dextran)/モンタニド(Montanide)ISA50Vアジュバントミックスと乳化され、これを0.1mL皮下及び筋肉の複数箇所に入力された。

【0110】

コントロールグループであるグループ2の20匹のマウスは、ペプチド接合体を含まないアジュバントミックスを0.1mL皮下及び筋肉の複数箇所に入力された。

40

【0111】

8日目：グループ1の20匹のマウスは、MCSクロスリンカーを介してジフテリアトキシニンに接合された0.01mgのペプチドエピトープ(hP2X₇配列200-216)を注入された(約0.002mgのペプチドエピトープを含む)。ペプチドはリン酸緩衝食塩水溶液に含まれており、商業的に入手可能なCpG DNAアジュバントImmuneasy(Qiagenより販売されている)と、プロトコールに沿って混合された。各マウスに、0.1mLのペプチド接合体/アジュバント溶液が皮下及び筋肉の複数箇所に入力された。

【0112】

50

20匹のグループ2のマウスに、リン酸緩衝食塩水/CpG DNA アジュバントミックスに相当するものが注入された。これが、各マウスに0.1mL皮下及び筋肉の複数箇所注入された。

【0113】

26日目：グループ1の20匹のマウスは、MCSクロスリンカーを介してジフテリアトキシンに接合された0.025mgのペプチドエピトープ(hP2X₇配列200-216)を注入された(約0.005mgのペプチドエピトープを含む)。これはリン酸緩衝食塩水溶液中に含まれており、そしてQiagen CpG DNA アジュバントImmuneEasyと混合された。またしても、0.1mLのこの混合物が各マウスに皮下及び筋肉の複数箇所注入された。コントロールグループは、8日目と同様に注入された。

10

【0114】

29日目：全てのマウスが首の後ろに位置する1箇所の皮下サイトに、0.1mLの組織培養媒体に含まれた腫瘍細胞を注入された。使用された腫瘍細胞は、細胞株WEHI 164と指定され、オーストラリアのメルボルンにあるWalter and Eliza Hall Instituteで作られたマウスハイブリドーマ細胞株であった。

【0115】

(腫瘍)細胞は、2種類の濃度で実験用及びコントロールグループのマウス両方ともに注入された。各グループは2つにさらに分けられた。実験用及びコントロールグループのそれぞれ10匹のマウスが各マウスにつき160,000個の細胞を注入され、各グループ10匹のマウスは320,000個の細胞を注入された。

20

【0116】

この細胞株の細胞は、事前に細胞表面の非機能性のP2X₇エピトープの存在についてテストされていた。これは、羊によって生成された、リセプターの非機能性の形を特異的に認識する抗体を使用して行われた。

【0117】

38日目：全てのマウスは殺され、非機能性P2X₇エピトープに対する抗体の分析のため血が集められた。全てのマウスが測量され、腫瘍は摘出されて測量された。

【0118】

【表2】

30

結果

グループ	コントロール 160,000 細胞	実験用 160,000 細胞	コントロール 320,000 細胞	実験用 320,000 細胞
n	10	10	10	10
腫瘍の平均 重量(mg)	599	270	1147	750
SD	307	108	633	363
SEM	97	34	200	115

40

【0119】

50

この結果の変量分析は、コントロールと処置を受けた（実験用）グループとの間、及び低量投与と高量投与グループとの間の統計学的な有意差を示した（ $P = 0.0003$ ）。低量投与グループは、少ない量の腫瘍がマウスの免疫システムの対抗能力により少ない影響を与えたため、より大きな違いを示した。

【0120】

（ATP類似体）

合成のアゴニストを使用して、 $P2X_7$ 細孔のATP結合サイトに効率よく結合し、細孔を機能性の状態にし、それによってリセプターの機能を回復させ、同時に $P2X_7$ が細胞に与える成長に関するアドバンテージを規制するという効用は、以下の培養実験において示される。腫瘍性のB-セルがCLLを持つ患者から集められ、正常な患者からの同等数の同類の細胞と混合され、4時間2.5mMのATPで処理された。腫瘍細胞は1つも残らず、正常な細胞のみが残った。生体内（in vivo）では、ATP又はより選択的な $P2X_7$ アゴニストであるベンゾール、ベンゾールATPの使用は適切ではない。したがって、ATP又は $BzATP$ より格段強い結合力で $P2X_7$ に選択的に結合できる選択的ATP類似体を、感染した腫瘍細胞タイプの範囲内でアポトーシスのプロセスを元に戻すために設計してもよい。

【0121】

（工業的適用性）

本発明はすべての側面においてヒト及び動物医療及び保健の分野へ適用でき、病気の早期及び正確な診断を可能にする潜在力があり、多くのケースにおいて従来技術よりはるかに侵襲性が低い又はトラウマにならないものである。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】ヒト $P2X_7$ リセプターの配列を示している。

【図1】

```

1  MET-PRO-ALA-CYS-CYS-SER-CYS-SER-ASP-VAL-PHE-GLN-TYR-GLU-THR-ASN-LYS-VAL-
  THR-ARG
21ILE-GLN-SER-MET-ASN-TYR-GLY-THR-ILE-LYS-TRP-PHE-PHE-HIS-VAL-ILE-ILE-PHE-SER-TYR
41VAL-CYS-PHE-ALA-LEU-VAL-SER-ASP-LYS-LEU-TYR-GLN-ARO-LYS-GLU-PRO-VAL-ILE-SER-SER
61VAL-HIS-THR-LYS-LEU-VAL-SER-VAL-PHE-ASP-THR-ALA-ASP-TYR-THR-PHE-PRO-LEU-GLN-GLY-ASN
81SER-PHE-PHE-VAL-MET-THR-ASN-PHE-LEU-LYS-THR-GLU-GLY-GLN-GLN-ARO-LEU-CYS-PRO
101SER-PHE-PHE-VAL-MET-THR-ASN-PHE-LEU-LYS-THR-GLU-GLY-GLN-GLN-ARO-LEU-CYS-PRO
121  GLU-TYR-PRO-THR-ARG-ARG-THR-LEU-CYS-SER-SER-ASP-ARG-GLY-CYS-LYS-LYS-GLY-TRP-MET
141  ASP-PRO-GLN-SER-LYS-GLY-ILE-GLN-THR-GLY-ARG-CYS-VAL-VAL-HIS-GLU-GLY-ASN-GLN-LYS
161THR-CYS-GLU-VAL-SER-ALA-TRP-CYS-PRO-ILE-GLU-ALA-VAL-GLU-GLU-ALA-PRO-ARG-PRO-ALA
181  LEU-LEU-ASN-SER-ALA-GLU-ASN-PHE-THR-VAL-LEU-ILE-LYS-ASN-ASN-ILE-ASP-PHE-PRO-GLU-
  THR-PHE-HIS-LYS
201THR-GLN-ASN-PRO-GLN-CYS-PRO-ILE-PHE-ARG-LEU-GLY-ASP-ILE-PHE-ARG-GLU-THR-GLY-ASP
221  ASN-PHE-SER-ASP-VAL-ALA-ILE-GLN-GLY-GLY-ILE-MET-GLY-ILE-GLU-ILE-TYR-TRP-ASP-CYS
241  ASN-LEU-ASP-ARG-TRP-PHE-HIS-HIS-CYS-HIS-PRO-LYS-TYR-SER-PHE-ARG-ARO-LEU-ASP-ASP
261  LYS-THR-THR-ASN-VAL-SER-LEU-TYR-PRO-GLY-TYR-ASN-PHE-ARG-TYR-ALA-LYS-TYR-TYR-LYS
281  GLU-ASN-ASN-VAL-GLU-LYS-ARG-THR-LEU-ILE-LYS-VAL-PHE-GLY-ILE-ARG-PHE-ASP-ILE-LEU
301  VAL-PHE-GLY-THR-GLY-GLY-LYS-PHE-ASP-ILE-ILE-GLN-LEU-VAL-VAL-TYR-ILE-GLY-SER-THR
321  LEU-SER-TYR-PHE-GLY-LEU-ALA-ALA-VAL-PHE-ILE-ASP-PHE-LEU-ILE-ASP-THR-TYR-SER-SER
341  ASN-CYS-CYS-ARG-HIS-HIS-ILE-TYR-PRO-TRP-CYS-LYS-CYS-CYS-GLN-PRO-CYS-VAL-VAL-ASN
361  GLU-TYR-TYR-TYR-ARG-LYS-LYS-CYS-GLU-SER-ILE-VAL-GLU-PRO-LYS-PRO-THR-LEU-LYS-TYR
381  VAL-SER-PHE-VAL-ASP-GLU-SER-HIS-ILE-ARG-MET-VAL-ASN-GLN-GLN-LEU-GLY-ARG-SER
401  LEU-GLN-ASP-VAL-LYS-GLY-GLN-GLU-VAL-PRO-ARG-PRO-ALA-MET-ASP-PHE-THR-ASP-LEU-SER
421  ARG-LEU-PRO-LEU-ALA-LEU-HIS-ASP-THR-PRO-PRO-ILE-PRO-GLY-GLN-PRO-GLU-GLU-ILE-GLN
441  LEU-LEU-ARG-LYS-GLU-ALA-THR-PRO-ARG-SER-ARG-ASP-SER-PRO-VAL-TRP-CYS-GLN-CYS-GLY
461  SER-CYS-LEU-PRO-SER-GLN-LEU-PRO-GLU-SER-HIS-ARG-CYS-LEU-GLU-GLU-LEU-CYS-CYS-ARG
481  LYS-LYS-PRO-GLY-ALA-CYS-ILE-THR-THR-SER-GLU-LEU-PHE-ARG-LYS-LEU-VAL-LEU-SER-ARG
501  HIS-VAL-LEU-GLN-PHE-LEU-LEU-TYR-GLN-GLU-PRO-LEU-LEU-ALA-LEU-ASP-VAL-ASP-SER
521  THR-ASN-SER-ARG-LEU-ARG-HIS-CYS-ALA-TYR-ARG-CYS-TYR-ALA-THR-TRP-ARG-PHE-GLY-SER
541  GLN-ASP-MET-ALA-ASP-PHE-ALA-ILE-LEU-PRO-SER-CYS-CYS-ARG-TRP-ARG-ILE-ARO-LYS-GLU
561  PHE-PRO-LYS-SER-GLU-GLY-GLN-TYR-SER-GLY-PHE-LYS-SER-PRO-TYR

```

ヒト $P2X_7$ リセプターの配列

【配列表】

2005513416000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01204
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. 7: C07K14/705,16/28; A61K 39/395; A61P 35/00, 1/00		
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)		
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) CA, MEDLINE, BIOSIS, WPIDS, BIOTECHABS (KEYWORDS: P2X7, ANTIBODY, IMMUNOGLOBIN, CONFORMATION, ATP ANALOGUE, ATPASE, EPITOPE)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Groschel-Stewart U et al, "Localisation of P2X ₃ and P2X ₇ receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia", Cell Tissue Research 1999 vol 296 (3), pages 599-605 See whole document especially page 604 2 nd col last para.	1-8, 12-35, 39-64
X	Buell G et al, "Blockade of human P2X ₇ receptor function with a monoclonal antibody", Blood vol 92 No 10, 1998, pages 3521-3528 See whole document especially page 3526 col 2 last para to page 3527 col 2 last para.	1-8, 12-35, 39-64
X	Wiley et al, "A single nucleotide polymorphism is associated with loss of function of the monocyte P2X ₇ receptor", Blood vol 96 (11 pt 1) Nov 2000 page 17a (Abstract)	1-8, 12-35, 39-64
☒ 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 14 October 2002		Date of mailing of the international search report 22 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer  O.L. CHAI Telephone No : (02) 6283 2482

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU02/01204

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Peng L et al, "P2Z purinoceptor, a special receptor for apoptosis induced by ATP in human leukemic lymphocytes", Chinese Medical Journal 1999, 112 (4) pages 356-362 See whole document especially page 361 col 1 para 3.	46-49, 60, 64
P, X	Chessell IP et al, "Dynamics of P2X ₇ receptor pore dilation: pharmacological and functional consequences", Drug Development Research 2001 vol 53 (2/3) pages 60-65 See whole document especially page 63 col 1 last para to page 64 col 1 2 nd para.	1-67
P, X	Wiley JS et al, "Genetic polymorphisms of the human P2X ₇ receptor and relationship to function", Drug Development Research 2001 vol 53 (2/3) pages 72-76 See whole document especially page 74 col 1 para 2 to page 75 col 1 para 1.	1-67
P, X	WO 02/057306 A1 (INTREAT PTY LTD) 25 July 2002 See whole document	1-67
A	Virgilio F et al, "Purinergic P2X ₇ receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation", Drug Development Research 1998 vol 45 (3/4) pages 207-213 See whole document especially page 209 col 1 para 3 to page 210 col 1 para 1.	
A	Ferrari D et al, "ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells", Neuropharmacology 1997 vol 36 (9) pages 1295-1301 See whole document.	
A	US 6133434 (G N Buell et al) 17 October 2000 See whole document.	
P, A	Gu B et al, "A Glu-496 to Ala Polymorphism leads to loss of function of the human P2X ₇ receptor", J. Biol. Chem. 2001 vol 276 (14) pages 11135-11142 See whole document.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU02/01204

Box I	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 : 1-8, 12-35, 39-64 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: Claims 1-8, 12-35, 39-58, 61-63 It is known that the P2X₇ receptors are present in many cell types and that the non-functionality of the receptors is caused by lack of appropriate binding of the ATP agonist to the receptor (see specification (continue in supplemental box)) 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 II	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: There are two different groups of inventions as follows: Group 1. Claims 1-45, 50-58, 61-63 and 66-67 are directed to a probe that distinguishes between functional P2X₇ receptors and non-functional P2X₇ receptors, method of using the probe in diagnosis and treatment of disease and pharmaceutical composition. (continue in supplement box) 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 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.: 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. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU02/01204

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: I

page 2 paragraphs 2-3). These claims are mere desiderata and do not contain any technical features to allow for a meaningful search.

Claims 46-49, 60 and 64

It is known that P2X₇ receptors are activated by ATP. A preparation that regulates ATPases to control the supply of ATP to P2X₇ could include any ATP analogue. No meaningful search can be carried out based on the claims as drafted.

Nonetheless, two searches have been carried out in an attempt to cover the claims.

Continuation of Box No: II

Group 2. Claims 46-49, 60 and 64 are directed to a preparation and method for treatment or prevention of disease that uses one or more substances to regulate the expression of ATPases that control the supply of ATP to P2X₇ receptors.

These groups of invention are not so linked to form a single general inventive concept. There are no special technical features that are common to these two groups of claims. Thus the international application does not relate to one invention only or to a single general inventive concept, a priori.

The search result of PCT/AU2002/000061 was considered and therefore this Authority did not invite payment of any additional fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU02/01204

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member
WO	2002057306	NONE
US	6133434	NONE
		END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 31/12	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 K 16/28	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 N 5/06	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 21/78	C 0 7 K 16/28	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 T 1/161	G 0 1 N 33/53	Y
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 T 1/161	A
	G 0 1 T 1/161	D
	C 1 2 N 5/00	Z N A E
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 アンガス・ギドレイ・バード

オーストラリア・ニューサウスウェールズ・2 1 1 3・ノース・ライド・デリー・ロード・2 2

(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・ニューサウスウェールズ・2 1 2 2・マースフィールド・マラワラ・クレセント
・4 8

F ターム(参考) 2G054 AA07 AA08 AB05 CA23 CE02 EA03 GA04 GB02
2G088 EE01 EE02 FF04 FF07
4B064 AG26 CA01 DA01
4B065 AA90X AA91X AC20 BD39 CA24
4C084 AA17 NA14 ZB072 ZB212 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352
4C085 AA13 AA14 BB23 CC02 CC04 CC05 DD22 DD23 EE01 GG03
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71

专利名称(译)	诊断和治疗对应于非功能性P2X7受体，癌症和其他症状的抗体		
公开(公告)号	JP2005513416A	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2003525032	申请日	2002-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	英瑞特私人有限公司		
申请(专利权)人(译)	酒店对待私人有限公司		
[标]发明人	アンガスギドレイバード ジュリアンアレクサンダーバーデン		
发明人	アンガス・ギドレイ・バード ジュリアン・アレクサンダー・バーデン		
IPC分类号	G01N33/569 A61K A61K39/395 A61K45/00 A61P A61P1/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43/00 C07K C07K14/705 C07K16/28 C12N5/06 C12P21/08 G01N21/78 G01N33/53 G01T1/161		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 C07K16/28 C07K2317/34		
FI分类号	G01N33/569.L A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.S A61K45/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43/00.105 C07K16/28 G01N21/78.C G01N33/53.Y G01T1/161. A G01T1/161.D C12N5/00.ZNA.E C12P21/08		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054 /GB02 2G088/EE01 2G088/EE02 2G088/FF04 2G088/FF07 4B064/AG26 4B064/CA01 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AC20 4B065/BD39 4B065/CA24 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084 /ZB072 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/BB23 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/GG03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	2001PR7430 2001-09-03 AU 2001PR7431 2001-09-03 AU PCT/AU2002/000061 2002-01-17 WO		
其他公开文献	JP2005513416A5 JP4467973B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包括癌症在内的多种疾病和病症。 本发明提供了用于发现那些疾病和状况的探针。 本发明的探针能够区分功能性P2X7受体和非功能性P2X7受体。 本发明的探针可以通过各种方法来做到这一点，其中之一是检测三磷酸腺苷 (ATP) 与P2X7受体结合的变化方法。 本发明还提供了使用该探针检测疾病或症状的方法。 本发明还涉及使用能够产生抗体的抗体或表位来治疗疾病或病症。 该抗体可以区分功能性和非功能性P2X7受体，并与非功能性P2X7受体结合。 治疗方法，药物组合物以及所述探针和抗体的用途也包括在本发明中。

グループ	観察結果	1匹当たりの腫瘍の平均重量 (±SD) (g)
1:コントロール1	10匹中9匹に腫瘍	3.98±1.1
2:コントロール2	10匹中10匹に腫瘍	2.93±0.9
3:実験用	10匹中9匹に腫瘍	1.13±0.4