



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103459595 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201180046998. 3

(22) 申请日 2011. 09. 28

(30) 优先权数据
2010-218158 2010. 09. 29 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013. 03. 28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2011/072190 2011. 09. 28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02012/043634 JA 2012. 04. 05

(83) 生物保藏信息
FERM BP-11402 2011. 08. 03
FERM BP-11403 2011. 08. 03

(73) 专利权人 株式会社 NB 健康研究所
地址 日本北海道

(72) 发明人 高山喜好 清水朋子 漆畑祐司
杉本幸彦

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 金世煜 苗莖

(51) Int. Cl.
C12N 15/09(2006. 01)
A61K 39/395(2006. 01)
A61P 29/00(2006. 01)
A61P 35/00(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)
C07K 16/28(2006. 01)
C07K 17/00(2006. 01)
C12N 1/15(2006. 01)
C12N 1/19(2006. 01)
C12N 1/21(2006. 01)
C12N 5/10(2006. 01)
G01N 33/53(2006. 01)
C12P 21/08(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004210040 A1, 2004. 10. 21,
WO 2004073589 A2, 2004. 09. 02,
I. Fortier 等. Immunolocalization of
the prostaglandin E2 receptor subtypes in
human bone tissue: differences in foetal,
adult normal, osteoporotic and pagetic
bone. 《Prostaglandins, Leukotrienes and
Essential Fatty Acids》. 2004, 第 70 卷
431-439.

审查员 郝佳

权利要求书2页 说明书26页
序列表25页 附图8页

(54) 发明名称

针对人前列腺素 E₂ 受体 EP4 的抗体

(57) 摘要

本发明的目的在于提供与人 PGE₂受体亚型 EP4 结合来抑制 EP4 的功能的抗体或其功能片段。另外, 目的在于提供包含该抗体或其功能片段的医药。使小鼠对人 PGE₂受体亚型 EP4 免疫, 筛选出抑制 EP4 所致的细胞内 cAMP 上升的单克隆抗体。另外, 对取得的单克隆抗体的 CDR 进行序列测定。

CN 103459595 B

1. 一种抗体或其功能片段, 其与 PGE₂受体亚型 EP4 的胞外域特异性地结合, 且不与 EP1、EP2、EP3 结合, 抑制 PGE₂受体亚型 EP4 的功能,

所述 PGE₂受体亚型 EP4 的功能是使细胞内 cAMP 浓度上升,

所述抗体为单克隆抗体,

所述抗体或其功能片段的互补性决定区域 1 ~ 3 即 CDR1 ~ 3 的氨基酸序列满足下述 (A)、(B) 或 (C) 中的任一个,

(A) :

作为序列编号 5 表示的氨基酸序列的重链 CDR1、

作为序列编号 6 表示的氨基酸序列的重链 CDR2、

作为序列编号 7 表示的氨基酸序列的重链 CDR3、

作为序列编号 8 表示的氨基酸序列的轻链 CDR1、

作为序列编号 9 表示的氨基酸序列的轻链 CDR2、和

作为序列编号 10 表示的氨基酸序列的轻链 CDR3,

(B) :

作为序列编号 15 表示的氨基酸序列的重链 CDR1、

作为序列编号 16 表示的氨基酸序列的重链 CDR2、

作为序列编号 17 表示的氨基酸序列的重链 CDR3、

作为序列编号 18 表示的氨基酸序列的轻链 CDR1、

作为序列编号 19 表示的氨基酸序列的轻链 CDR2、和

作为序列编号 20 表示的氨基酸序列的轻链 CDR3,

(C) :

作为序列编号 45 表示的氨基酸序列的重链 CDR1、

作为序列编号 46 表示的氨基酸序列的重链 CDR2、

作为序列编号 47 表示的氨基酸序列的重链 CDR3、

作为序列编号 48 表示的氨基酸序列的轻链 CDR1、

作为序列编号 49 表示的氨基酸序列的轻链 CDR2、和

作为序列编号 50 表示的氨基酸序列的轻链 CDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其功能片段, 其特征在于, 所述抗体由国际保藏编号 FERM BP-11402 即 NBG016-mAb14、保藏编号 FERM BP-11403 即 NBG016-mAb21 的杂交瘤产生。

3. 根据权利要求 1 所述的抗体或其功能片段, 其特征在于, 与 PGE₂受体亚型 EP4 的胞外域特异性地结合, 其重链可变区域和轻链可变区域的氨基酸序列满足下述 (a)、(b) 或 (c) 中的任一项,

(a) 作为序列编号 2 表示的氨基酸序列的重链可变区域、和作为序列编号 4 表示的氨基酸序列的轻链可变区域,

(b) 作为序列编号 12 表示的氨基酸序列的重链可变区域、和作为序列编号 14 表示的氨基酸序列的轻链可变区域,

(c) 作为序列编号 43 表示的氨基酸序列的重链可变区域、和作为序列编号 44 表示的氨基酸序列的轻链可变区域。

4. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的抗体或其功能片段, 其特征在于, 是人源化抗体

或嵌合抗体。

5. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的抗体或其功能片段,其特征在於,是人抗体。

6. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的抗体或其功能片段,其特征在於,所述功能片段是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体、scFv、scFv 二聚体或 dsFv。

7. 根据权利要求 4 所述的抗体或其功能片段,其特征在於,所述功能片段是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体、scFv、scFv 二聚体或 dsFv。

8. 根据权利要求 5 所述的抗体或其功能片段,其特征在於,所述功能片段是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体、scFv、scFv 二聚体或 dsFv。

9. 一种医药组合物,其包含权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗体或其功能片段。

10. 根据权利要求 9 所述的医药组合物,用于预防或治疗因 PGE₂受体亚型 EP4 的功能异常而发病和 / 或进展的疾病。

11. 根据权利要求 10 所述的医药组合物,其特征在於,治疗对象疾病为免疫疾病。

12. 根据权利要求 10 所述的医药组合物,其特征在於,治疗对象疾病为肿瘤。

13. 根据权利要求 10 所述的医药组合物,其特征在於,治疗对象疾病为疼痛。

14. 一种抗体固定化担载体,是权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗 EP4 抗体或其功能片段被固定化于担载体而形成的。

15. 根据权利要求 14 所述的抗体固定化担载体,其特征在於,用于与含有 PGE₂受体亚型 EP4 表达细胞的血液接触而从所述血液中除去 EP4 表达细胞。

16. 一种试剂盒,含有权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗体,测定细胞表面上的 PGE₂受体亚型 EP4 表达量。

17. 一种核酸,其编码权利要求 1 或 3 所述的抗体的重链可变区域或轻链可变区域,由序列编号 1、序列编号 3、序列编号 11、序列编号 13、序列编号 41、序列编号 42 表示。

18. 一种载体,其包含权利要求 17 所述的核酸。

19. 一种细胞,其导入了权利要求 18 所述的载体。

针对人前列腺素 E₂受体 EP4 的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及对人前列腺素 E₂受体亚型 EP4 的单克隆抗体。

背景技术

[0002] 前列腺素(PG)是与血栓素一起被称为前列腺素类的生理活性物质,是具有前列腺烷酸骨架的脂质。前列腺素等前列腺素类是利用磷脂酶 A2 由从膜脂质游离的花生四烯酸生物合成的。前列腺素根据附于其五元环的氧原子和双键的不同被区分为 A ~ J 各组。另外,根据前列腺烷酸骨架侧链的双键数,被区分为 1 ~ 3 组。例如,前列腺素 E (PGE)中,存在有前列腺烷酸骨架侧链中存在的双键数不同的 PGE₁、PGE₂、PGE₃各组。

[0003] 对于 PG,由利用环氧合酶 I (COX-I)或环氧合酶 II (COX-II)从花生四烯酸生物合成的 PGG₂而产生 PGH₂,其后,根据氧原子间键的断裂的不同,产生 PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}等。进而,由 PGE₂产生 PGA₂、PGC₂等。认为各 PG 的生成反应根据特异性酶的作用而产生,这些酶中存在组织特异性,产生与各组织的功能相适应的 PG。

[0004] PG 中 PGE 具有各种重要的生物活性,认为介由其特异性的受体与血管扩张、血压下降、子宫收缩以及免疫系统的调节等相关。PGE₂的受体与其它的 PG 受体同样地是 7 次膜贯通 G 蛋白质偶联受体。PGE₂受体简称为 EP,已知存在 4 种亚型(EP1、EP2、EP3、EP4)。各亚型在生物体内,EP1 与细胞内 Ca²⁺的上升相关,EP2 和 EP4 与 cAMP 的上升相关,EP3 与 cAMP 的减少相关(非专利文献 1)。4 种亚型在蛋白质构造上具有很高的相同性。

[0005] 报道了将对 EP4 选择性高的低分子化合物拮抗剂向诱导了实验性自身免疫性脑脊髓炎或接触过敏症的小鼠给药时,所属淋巴节内的 TH1 和 TH17 细胞两者的蓄积减少,抑制了疾病的发展(非专利文献 2)。示出了树状细胞中,PGE₂由于 EP4 的活化所致的 cAMP 上升而使 IL-23 的产生亢进。另外,示出了在 TH17 细胞中,PGE₂与 IL-23 协调地导致 TH17 细胞的增殖。示出了在 TH17 细胞中,EP4 的活化所致的 cAMP 上升对细胞内信息传递发挥重要的作用(非专利文献 3)。从这样的报告可知,PGE₂受体、特别是 EP4 选择性拮抗剂对治疗因 TH1 或 TH17 涉及的免疫异常而导致的疾病有效果,该疾病例如有多发性硬化症、类风湿性关节炎、炎症性肠病以及接触性皮肤病等(非专利文献 2)。

[0006] 报道了大多癌细胞与正常细胞相比,COX-II 过量表达。进而显示 PGE₂对癌组织或周边组织起作用,与癌的发展有关。例如,示出了 PGE₂与难治性的炎症性乳腺癌细胞或肺癌细胞对转移组织的浸润相关(非专利文献 4、5)。另外可知,PGE₂介由 EP4 与非小细胞肺癌细胞、大肠癌细胞、炎症性乳腺癌细胞、B 淋巴细胞、前列腺癌细胞、黑色素瘤的增殖相关。

[0007] 已知 NK 细胞具有直接攻击癌细胞的作用,但 PGE₂抑制该作用。作为 PGE₂抑制 NK 细胞活性的机制,显示有 EP4 的活化所致的细胞内的 cAMP 上升(非专利文献 6)。另外,已知被认为抑制癌免疫的 Treg 细胞介由 EP4 而活化,有可能使生物体内对癌细胞的免疫机制降低(非专利文献 7)。从这样的报告可知,PGE₂对癌的发展很重要。因此,尝试了与 PGE₂的产生相关的 COX 的非选择性抑制剂的临床研究,但由于副作用无法得到充分的治疗成绩。PGE₂受体、特别是 EP4 选择性拮抗剂能够直接抑制癌细胞的增殖,并且能够激活自身的癌免

疫机制,所以期待与 EP4 受体选择性地结合的抗体对各种癌的治疗有效果,所述的癌例如有乳腺癌、大肠癌、肺癌、前列腺癌、皮肤癌、B 淋巴瘤。

[0008] 以往,非特异性的 COX 抑制剂用于减少疼痛。然而,已知非特异性的抑制剂会产生胃灼热、消化不良、恶心、腹胀、腹泻、胃痛、消化性溃疡、消化道出血之类的副作用。近年来,以疼痛治疗为目的开发了 COX-II 选择性抑制剂(例如塞来昔布、罗非昔布)。但是,COX-II 选择性抑制剂在特定的患者中可能引发严重的心血管系统障碍,寻求利用不同的作用机制来减少疼痛的药剂。由 COX 产生的 PG 中,已知 PGE₂会使痛觉的过敏性增强。特别是利用多个动物试验证明了 PGE₂受体中 EP4 与痛觉的过敏性的增强有关。例如已知对于大鼠脊髓后根神经节(DRG)而言,在炎症性疼痛模板中,EP4 的表达增强,EP4 的比较选择性拮抗剂(AH23848)可减少同模板中的疼痛的感受性(非专利文献 8)。另外,在使用 EP4 基因敲除小鼠的解析中也得到相同的结果(非专利文献 9)。从这样的报告可知,选择性地阻断 EP4 的功能的医药品对伴随免疫异常的疾病、癌、疼痛的治疗有效,并且副作用少。

[0009] 作为选择性地阻断 EP4 的功能的方法,报道了多个利用了低分子化合物的拮抗剂,但作为医药品还没有成功地开发。对于低分子化合物的拮抗剂,在对 PGE₂受体亚型(EP1 ~ 4)的结合选择性、对血栓素或其它的前列腺素类受体的结合亲和性的减少方面有改良的余地。如果没有充分的受体选择性则可能产生与 COX 抑制剂相同的副作用。

[0010] 期待与 EP4 受体选择性结合的抗体比低分子化合物受体选择性高。另外,抗体医药与低分子化合物相比,一般血中半衰期长,所以期待一次给药就长期保持药效,对慢性疾病(例如类风湿性关节炎、大肠炎、癌等)有用。

[0011] 抗体医药对膜蛋白质(受体)的主要作用机制通常是抗体识别表达该蛋白质的细胞后,基于补体依赖性细胞溶解作用(CDC)和抗体依赖性细胞媒介性细胞障碍作用(ADCC)而除去。然而,CDC、ADCC 伴随着巨噬细胞等炎症细胞的活化,不能说一定适合因免疫异常引起的疾病、疼痛治疗。因此,将可选择性地抑制 EP4 的单克隆抗体应用于因免疫异常引起的疾病、疼痛治疗的情况下,优选不基于 CDC、ADCC 的功能性抗体。即,优选选择性地阻断 EP4 依赖的细胞内信息传递。

[0012] 目前,在专利第 3118460 号(专利文献 1)中已有针对 EP4 的抗体的取得方法的记载,但还没有报告以低用量 EP4 特异性地抑制其功能的且不与 EP1、EP2、EP3 结合的具体的抗体。另外,专利第 3118460 号中记载的一般的单克隆抗体的取得方法中,已知通常难以取得针对 7 次膜贯通型受体的功能性抗体。

[0013] 现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献 1: 日本专利第 3118460 号

[0016] 非专利文献

[0017] 非专利文献 1: Sugimoto 等, J. Biol. Chem., 282, 11613-11617 2007

[0018] 非专利文献 2: Yao 等, Nat. Med., 15, 633-640 2009

[0019] 非专利文献 3: Sakata 等, J Pharmacol Sci., 112 (1): 1?5. 2010

[0020] 非专利文献 4: Robertson FM Cancer. 2010Jun1; 116 (11Suppl): 2806-14.

[0021] 非专利文献 5: Martinet L. Biochem Pharmacol. 2010Sep15; 80 (6): 838-45.

[0022] 非专利文献 6: Sharma SD, Mol Cancer Ther. 2010Mar; 9 (3): 569-80.

- [0023] 非专利文献 7:Sharma S 等 Cancer Res. 2005 Jun 15; 65 (12): 5211-20
- [0024] 非专利文献 8:Lin C.-R. 等 J Pharmacology and Experimental Therapeutics 2006 319:3 (1096-1103)
- [0025] 非专利文献 9:Popp L. 等 European Journal of Pain. 2009 13:7 (691-703)

发明内容

[0026] 本发明的目的在于提供作为因免疫异常而引起的疾病、肿瘤、疼痛的治疗药而有用的针对人 PGE₂受体的 EP4 亚型的抗体和包含该抗人 EP4 抗体的医药组合物等。

[0027] 本发明人等尝试了针对人 PGE₂受体的 EP4 亚型的单克隆抗体的制作,其结果成功地取得了与 EP4 亚型的胞外域特异性地结合并且抑制 EP4 的功能(例如,使细胞内 cAMP 浓度上升的功能)的抗体,从而完成本发明。

[0028] 即,本发明是以下的(1)~(21)。

[0029] (1)一种抗体或其功能片段,其与 PGE₂受体亚型 EP4 的胞外域结合,抑制 EP4 的功能。

[0030] (2)根据上述(1)所述的抗体或其功能片段,其特征在于,上述抗体为单克隆抗体。

[0031] (3)根据上述(2)所述的抗体或其功能片段,其特征在于,上述抗体由国际保藏编号 FERM BP-11402、保藏编号 FERM BP-11403 的杂交瘤产生。

[0032] (4)根据上述(1)~(3)中任一项所述的抗体或其功能片段,其中,上述 EP4 的功能是使细胞内 cAMP 浓度上升。

[0033] (5)根据上述(1)~(3)中任一项所述的抗体或其功能片段,其特征在于,与 EP4 的胞外域特异性结合,其互补性决定区域 1~3 (CDR1~3)的氨基酸序列满足下述(A)、(B)或(C)中的任一个。

[0034] (A)具有:

[0035] 包含序列编号 5 表示的氨基酸序列的重链 CDR1,

[0036] 包含序列编号 6 表示的氨基酸序列的重链 CDR2,

[0037] 包含序列编号 7 表示的氨基酸序列的重链 CDR3,

[0038] 包含序列编号 8 表示的氨基酸序列的轻链 CDR1,

[0039] 包含序列编号 9 表示的氨基酸序列的轻链 CDR2,以及

[0040] 包含序列编号 10 表示的氨基酸序列的轻链 CDR3,

[0041] (B)具有:

[0042] 包含序列编号 15 表示的氨基酸序列的重链 CDR1,

[0043] 包含序列编号 16 表示的氨基酸序列的重链 CDR2,

[0044] 包含序列编号 17 表示的氨基酸序列的重链 CDR3,

[0045] 包含序列编号 18 表示的氨基酸序列的轻链 CDR1,

[0046] 包含序列编号 19 表示的氨基酸序列的轻链 CDR2,以及

[0047] 包含序列编号 20 表示的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0048] (C)具有:

[0049] 包含序列编号 45 表示的氨基酸序列的重链 CDR1,

[0050] 包含序列编号 46 表示的氨基酸序列的重链 CDR2,

- [0051] 包含序列编号 47 表示的氨基酸序列的重链 CDR3，
- [0052] 包含序列编号 48 表示的氨基酸序列的轻链 CDR1，
- [0053] 包含序列编号 49 表示的氨基酸序列的轻链 CDR2，以及
- [0054] 包含序列编号 50 表示的氨基酸序列的轻链 CDR3。
- [0055] (6) 根据上述(1)～(5)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在於，与 EP4 的胞外域特异性地结合，其重链可变区域和轻链可变区域的氨基酸序列满足下述(a)、(b)或(c)中的任一项。
- [0056] (a)具有包含序列编号 2 表示的氨基酸序列的重链可变区域、和包含序列编号 4 表示的氨基酸序列的轻链可变区域，
- [0057] (b)具有包含序列编号 12 表示的氨基酸序列的重链可变区域、和包含序列编号 14 表示的氨基酸序列的轻链可变区域。
- [0058] (c)具有包含序列编号 43 表示的氨基酸序列的重链可变区域、和包含序列编号 44 表示的氨基酸序列的轻链可变区域。
- [0059] (7)一种抗体或其功能片段，是与 EP4 的胞外域结合而抑制 EP4 的功能的抗体或其功能片段，结合于与上述(3)～(6)中任一项所述的抗体相同的抗原表位。
- [0060] (8)根据上述(1)～(7)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在於，是人源化抗体或嵌合抗体。
- [0061] (9)根据上述(1)～(7)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在於，是人抗体。
- [0062] (10)根据上述(1)～(9)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在於，是抗体片段、单链抗体、或双体抗体。
- [0063] (11)一种核酸，其编码序列编号 1、序列编号 3、序列编号 11、序列编号 13、序列编号 41、序列编号 42 表示的上述(5)或(6)所述的抗体的重链可变区域或轻链可变区域。
- [0064] (12)一种载体，其包含上述(11)所述的核酸。
- [0065] (13)一种细胞，其导入了上述(12)所述的载体。
- [0066] (14)一种医药组合物，其包含上述(1)～(10)中任一项所述的抗体或其功能片段。
- [0067] (15)根据(14)所述的医药组合物，其中，用于预防或治疗因 EP4 的功能异常而发病和 / 或发展的疾病。
- [0068] (16)根据上述(15)所述的医药组合物，其特征在於，治疗对象疾病为免疫疾病。
- [0069] (17)根据上述(15)所述的医药组合物，其特征在於，治疗对象疾病为肿瘤。
- [0070] (18)根据上述(15)所述的医药组合物，其特征在於，治疗对象疾病为疼痛。
- [0071] (19)一种抗体固定化担载体，是上述(1)～(10)中任一项所述的抗 EP4 抗体或其功能片段固定化于载体而形成的。
- [0072] (20)根据上述(19)所述的抗体固定化担载体，其特征在於，用于与含有 EP4 表达细胞的血液接触，从上述体液中除去 EP4 表达细胞。
- [0073] (21)一种试剂盒，测定含有上述(1)～(10)中任一项所述的抗 EP4 抗体的细胞表面上的 EP4 表达量。
- [0074] 根据本发明，首先提供特异性抑制 EP4 的功能的抗体。

[0075] 根据本发明,与 EP4 相关的本发明的医药能够治疗或预防与 EP4 相关的免疫疾病、肿瘤以及疼痛。特别是与低分子化合物相比,使用对 EP4 亚型结合选择性高的本发明的抗体,能够提供副作用等少的治疗效果。

[0076] 利用本发明的抗体固定化担载体,能够从患有癌、自身免疫疾病等的患者的血液中选择性地除去 EP4 表达细胞。

[0077] 利用试剂盒测定本发明的 EP4 表达量,从患有癌、自身免疫疾病等的患者的血液检测 EP4 表达细胞,可评价疾病的状态。

附图说明

[0078] 图 1 是解析小鼠同型对照抗体和 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 对母株 Flp-In-CHO 细胞和人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合的流式细胞仪的结果。

[0079] 图 2 是解析小鼠同型对照抗体和 NBG016-mAb9 对母株 Flp-In-CHO 细胞和人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合的流式细胞仪的结果。

[0080] 图 3 是解析小鼠同型对照抗体和 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 对 PGE₂ 诱发的 cAMP 上升的抑制效果的结果。

[0081] 图 4 是解析小鼠同型对照抗体和 NBG016-mAb9 对 PGE₂ 诱发的 cAMP 上升的抑制效果的结果。

[0082] 图 5 是解析 NBG016-mAb14 对导入人 EP1 ~ 4、小鼠 EP1 ~ 4 基因的 293FT 细胞的结合的流式细胞仪的结果。

[0083] 图 6 是解析 NBG016-mAb9 对导入人 EP1 ~ 4、小鼠 EP1 ~ 4 基因的 293FT 细胞的结合的流式细胞仪的结果。

[0084] 图 7 是解析小鼠同型对照抗体和 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 对人末梢血液的淋巴细胞部分的结合的流式细胞仪的结果。

[0085] 图 8 是解析小鼠同型对照抗体和 NBG016-mAb9 对人末梢血液的淋巴细胞部分的结合的流式细胞仪的结果。

[0086] 图 9 是用 PMA 处理人单核细胞系 THP1 细胞株后,用抗 EP4 抗体进行免疫染色的结果。

[0087] 图 10 是解析抗体基因未导入细胞的培养上清和重组抗体 NBG016-mAb9 基因表达细胞的培养上清对母株 Flp-In-CHO 细胞和人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合的流式细胞仪的结果。

[0088] 图 11 是解析小鼠同型对照抗体和重组抗体 NBG016-mAb14、重组抗体 NBG016-mAb21 对母株 Flp-In-CHO 细胞和人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合的流式细胞仪的结果。

[0089] 图 12 (A) 是解析小鼠同型对照抗体和小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 对母株 Flp-In-CHO 细胞和人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合的流式细胞仪的结果。另外,图 12 (B) 是解析小鼠同型对照抗体和小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 对 PGE₂ 诱发的 cAMP 上升的抑制效果的结果。

[0090] 图 13 是解析抗体基因未导入细胞的培养上清和人嵌合型抗体 NBG016-mAb14 基因表达细胞的培养上清、人嵌合型抗体 NBG016-mAb21 基因表达细胞的培养上清对母株

Flp-In-CHO 细胞和人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合的流式细胞仪的结果。

具体实施方式

[0091] 本发明是与人 PGE₂受体亚型 EP4 的胞外域结合、抑制 EP4 的功能的抗体或其功能片段,以及包含这些抗体或其功能片段的医药品。

[0092] EP4 蛋白质的定义

[0093] 作为成为本发明的抗原的 EP4 蛋白质,可以使用由编码 EP4 蛋白质的 cDNA 等制备的重组蛋白质等。或可以将细胞表面表达 EP4 的适当的细胞等作为抗原使用。编码人 EP4 蛋白质的核酸序列可以从 GenBank 等公开的数据库等中检索(例如,登录编号:NM_000958)。使用基于该基因序列等而制成的探针或 PCR 扩增用的引物对等,可以从适当的 DNA 库制备编码 EP4 的 DNA(cDNA 等)。或利用人工 DNA 合成法,可以制备全部 cDNA。作为其中的一个例子,序列编号 21 表示与人 EP4 对应的氨基酸序列。人 EP4 中,除了序列编号 21 所示的以外,还已知有氨基酸置换体等各种变异体。本发明中的“人 EP4”只要具有作为 EP4 的功能,可含有上述变异体。

[0094] 认为人 EP4 的胞内域和胞外域与序列编号 21 所示的氨基酸序列中的以下部分相当。左侧为氨基酸编号,右侧为各结构域。应予说明,对于各结构域间的边界,可产生或多或少的前后差别(1~5 氨基酸残基,优选为 1~3 氨基酸残基,更优选为 1~2 氨基酸残基)。

[0095] 1~19 :N 末端结构域

[0096] 44~54 :细胞内第 1 环状结构域

[0097] 80~96 :细胞外第 1 环状结构域

[0098] 116~135 :细胞内第 2 环状结构域

[0099] 161~184 :细胞外第 2 环状结构域

[0100] 212~267 :细胞内第 3 环状结构域

[0101] 296~312 :细胞外第 3 环状结构域

[0102] 333~488 :C 末端结构域

[0103] 抗体或功能性抗体的定义

[0104] 本发明的抑制 EP4 的功能的抗体中,包含单克隆抗体、多克隆抗体等,该抗体的功能片段中,包含 Fab 或 F(ab')₂等抗体片段、或单链抗体等,只要是作为抗体的一部分的多肽(或多肽复合体)且抑制 EP4 的功能的片段,任何都包含在本发明的范围中。

[0105] 对 EP4 的特异性功能性抗体的定义和评价方法

[0106] 作为 EP4 的功能,例如可举出细胞内的 cAMP 的上升、Phosphoinositide3-kinase (PI3K) 的活化等功能。已知这些细胞内的变化控制癌细胞的增殖、T 淋巴细胞的细胞增殖、细胞因子产生。本发明的抗体与人 PGE₂受体亚型 EP4 的胞外域特异性地结合可如下所示。将编码人 EP4 蛋白质的核酸序列插入到表达载体,将载体导入到适当的宿主细胞(例如,CHO 细胞等哺乳类细胞、酵母细胞、昆虫细胞等)。使非破坏状态的不具有氨基酸的插入、缺失、置换等的 EP4 表达宿主细胞或 EP4 非表达宿主细胞与本发明的抗体接触,反应一定时间。清洗过量的抗体后,对细胞利用 ELISA 法、RIA 法或流式细胞术测定与细胞结合的抗体量。与非表达宿主细胞相比,本发明的抗体与 EP4 表达宿主细胞更多地结合,从而能够显

示与 EP4 的胞外域的结合。另外,构建插入了编码来自人或小鼠的 EP1、EP2、EP3 或 EP4 蛋白质的核酸序列的表达载体,与上述同样地解析受体表达宿主细胞。本发明的抗体对人 EP4 表达宿主细胞的结合多于其它的受体细胞表达细胞,优选能够显示不与人 EP4 以外的受体表达细胞结合。

[0107] 本发明的抗体为抑制 EP4 的功能的抗体,可如下所示。将编码人 EP4 蛋白质的核酸序列插入到表达载体,将该载体导入适当的宿主细胞(例如,CHO 细胞等哺乳类细胞、酵母细胞、昆虫细胞等)。使抗体以 $0.01 \sim 30 \mu\text{g/mL}$ 与人 EP4 表达宿主细胞接触后,进一步以 $10^{-12} \sim 10^{-6}\text{M}$ 的浓度使 PGE_2 接触。其后,用适当的方法测定细胞内的 cAMP 的上升。添加本发明的抗体时,能够用量依赖地抑制因 PGE_2 而诱发的 cAMP 的上升。

[0108] 另外,使抗体以 $0.01 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 与天然表达人 EP4 的细胞株(例如人巨噬细胞)接触后,使 PGE_2 以 $10^{-12} \sim 10^{-6}\text{M}$ 的浓度进一步接触。其后研究炎症刺激(例如脂多糖(LPS))时的细胞因子、趋化因子产生。已知 PGE_2 介由 EP4 或 EP2 抑制 LPS 刺激所致的细胞因子产生。本发明的抗体可以通过以恢复介由 EP4 的 PGE_2 所致的细胞因子产生抑制为指标来评价 EP4 的功能抑制。同样地,可以以来自人末梢血树状细胞的 PGE_2 所致的 IL-23 产生增强作用的抑制效果为指标来评价本抗体的 EP4 功能抑制。

[0109] 另外,通过使来自人膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、头颈部癌、皮肤癌、肺癌、口腔癌、前列腺癌、以及多发性骨髓瘤的癌细胞株(例如 MDA-MB-231 细胞、HCA-7 细胞或 HT-29 细胞等)与 PGE_2 接触,从而细胞的增殖性变高。以使本发明的抗体与这些细胞预先接触后而降低 PGE_2 所致的细胞的增殖性的增加为指标可评价功能抑制。

[0110] 本发明的抗体仅与人 EP4 结合,对小鼠 EP4 不反应。因此,难以评价动物试验中的与免疫异常、疼痛相关的药效。另一方面,对于抗肿瘤效果,将从上述的人癌组织建立的高表达 EP4 的细胞对免疫缺陷小鼠以每只 $10^6 \sim 10^7$ 个的细胞数进行接种。接种之后立刻将本发明的抗体以 $0.1 \sim 0.5\text{mg/只}$ 对小鼠腹腔内给药或皮下给药。与同型对照抗体给药组相比,本发明的抗体给药组可有意地减少肿瘤形成、转移频率而显示抗肿瘤效果。

[0111] 本发明的抗体的详细定义

[0112] 作为本发明的抗体及其功能片段的例子,例如可举出由国际保藏中的保藏编号 FERM BP-11402 (NBG016-mAb14)、FERM BP-11403 (NBG016-mAb21) 的杂交瘤产生的单克隆抗体,除此之外,可举出利用后述的实施例所示的方法制备的单克隆抗体。

[0113] 另外,作为本发明的抗体及其功能片段,可举出具有包含序列编号 2 表示的氨基酸序列的重链可变区域和包含序列编号 4 表示的氨基酸序列的轻链可变区域的抗体、具有包含序列编号 12 表示的氨基酸序列的重链可变区域和包含序列编号 14 表示的氨基酸序列的轻链可变区域的抗体、具有包含序列编号 43 表示的氨基酸序列的重链可变区域和包含序列编号 44 表示的氨基酸序列的轻链可变区域的抗体、具有包含序列编号 23 表示的氨基酸序列的重链和包含序列编号 25 表示的氨基酸序列的轻链的抗体、具有包含序列编号 27 表示的氨基酸序列的重链和包含序列编号 29 表示的氨基酸序列的轻链的抗体、具有包含序列编号 56 表示的氨基酸序列的重链和包含序列编号 57 表示的氨基酸序列的轻链的抗体、以及这些抗体的功能片段,以及由构成这些抗体的重链和 / 或轻链的各氨基酸序列中具有 1 或多个氨基酸缺失、置换或附加的氨基酸序列的重链和 / 或轻链构成的抗体、以及这些抗体的功能片段且抑制 EP4 的功能的抗体。

[0114] 与本发明的抗体相同的抗原表位的定义

[0115] 另外,作为本发明的抗体及其功能片段,特别优选在实施例中分离的任一单克隆抗体和抗原表位重复的(或相同的)抗体。在本发明中将这样的抗体称为与实际上相同的部位结合的抗体。2个抗体是否与抗原蛋白质结合于实际上相同的部位,例如可利用竞争实验来决定。具体而言,实施例的抗 EP4 抗体与 EP4 的结合被第二抗 EP4 抗体竞争抑制时,判定第一抗体和第二抗体与实际上相同的抗原部位结合。这样,本发明中包含了与实施例中分离的抗体的 EP4 结合部位实际上相同的部位结合的抗体且具有抑制 EP4 的功能的作用的抗体。

[0116] 本发明的抗体的取得方法

[0117] 本发明的抗 EP4 抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、或它们功能片段。从作为医药组合物能够稳定地生产均质的抗体的观点出发,优选为单克隆抗体。“单克隆”是指由实际上均匀的抗体组(抗体の集团)得到的显示抗体特性的物质,并不限于利用特定的方法而制造抗体。例如,可以例如通过杂交瘤法(Kohler and Milstein, Nature256 :495 (1975))、或重组方法(美国专利第 4816567 号)制造在本发明中使用的单克隆抗体。本发明中使用的单克隆抗体可以从噬菌体抗体库中分离(Clackson et al., Nature352 :624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222 :581-597 (1991))。本发明的单克隆抗体中,特别包含重链和 / 或轻链的一部分为特定的种类、或来自特定的抗体类或子类且链剩余部分为其它的种类、或来自其它的抗体类或子类的“嵌合”抗体(免疫球蛋白),抗体变体,以及其功能片段(美国专利第 4816567 号; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA81 : 6851-6855 (1984))。

[0118] 本发明的抗体为多克隆抗体时,例如可以通过对哺乳类宿主动物注射免疫原和佐剂的混合物来制备。通常将作为免疫原的抗原和 / 或佐剂多次注射到宿主动物的皮下或腹腔内。佐剂的例子中,包含完全氟氏(完全フロイト)和单磷酸脂质 A 合成 - 海藻糖二霉菌酸酯(MPL-TDM)。免疫原处理后,从针对血中产生的 EP4 的抗体中,以 EP4 结合特异性和 EP4 的功能抑制作用等为指标,可取得所希望的抗体。

[0119] 另外,本发明的抗体为单克隆抗体时,例如可使用杂交瘤法进行制备。

[0120] 该方法中包含以下所示的 4 个工序:(i) 对宿主动物或来自宿主动物免疫人 EP4 蛋白质,(ii) 回收单克隆抗体分泌性(或潜在分泌性)的淋巴细胞,(iii) 使淋巴细胞与永生化细胞融合,(iv) 选择分泌所希望的单克隆抗体的细胞。选择小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、或其它的适当的宿主动物作为免疫动物注射免疫原。

[0121] 免疫后,从宿主动物得到的淋巴细胞为了建立杂交瘤细胞而使用聚乙二醇等的融合剂与永生化细胞株融合。作为融合细胞,例如使用大鼠或小鼠的骨髓瘤细胞株。进行细胞融合后,在含有抑制未融合的淋巴细胞和永生化细胞株的生长或生存的一个或多个基质的适当培养基中培育细胞。在通常的技术中,使用缺少酶的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT)的母细胞。此时,将次黄嘌呤、氨基蝶呤以及胸腺嘧啶添加到抑制 HGPRT 缺损细胞的生长、允许杂交瘤的生长的培养基(HAT 培养基)中。可以从这样得到的杂交瘤中,选择产生所希望的抗体的杂交瘤,从培育该杂交瘤的培养基中,根据常用方法,取得目标单克隆抗体。

[0122] 可以将这样制备的杂交瘤进行体外培养,或在小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠等腹水中进

行体内培养,由培养上清、或腹水制备目标抗体。

[0123] 本发明的核酸是编码本发明的抗体中的重链可变区域或轻链可变区域的核酸。可以将作为本发明的核酸的编码重链可变区域或轻链可变区域的核酸插入到载体中,使其在细胞内表达。

[0124] 作为载体的种类,没有特别限定,根据其导入的宿主细胞的种类等适当地进行选择即可。也可以为了使这些作为抗体表达而导入到适当的宿主细胞(例如,CHO 细胞等哺乳类细胞、酵母细胞、昆虫细胞等),来制备重组型的抗体。

[0125] 本发明的嵌合抗体的定义和生产方法

[0126] 在本发明的抗 EP4 抗体的实施方式中,包含基因重组抗体。作为基因重组抗体,没有特别限定,例如可举出嵌合抗体、人型化抗体以及人抗体等。此处,嵌合抗体是指将来自不同动物种类的可变区域和恒定区域连结的抗体、特别是使来自小鼠的抗体的可变区域与来自人的恒定区域连结的抗体(参照 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81,6851-6855,(1984)等),制作嵌合时,能够根据本领域技术人员公知的基因重组技术而容易地构建以得到这样连结的抗体。在此,作为来自小鼠的抗体的可变区域,重链可变区域例如优选由序列编号 2 或序列编号 12 所示的氨基酸序列构成的区域,轻链可变区域例如优选由序列编号 4 或序列编号 14 所示的氨基酸序列构成的区域。将本发明的嵌合重链或嵌合轻链插入到载体。作为载体的种类没有特别限定,根据其导入的宿主细胞的种类等适当地进行选择即可。也可以为了使这些作为抗体表达而导入适当的宿主细胞(例如,CHO 细胞等的哺乳类细胞、酵母细胞、昆虫细胞等),来制备重组型的抗体。

[0127] 本发明的人型抗体的定义和生产方法

[0128] 本发明的嵌合抗体中,包含人源(型)化抗体。人型化抗体是由框架区域来自人,CDR 来自小鼠的区域构成的抗体。人型化抗体可通过如下制成,即首先从小鼠抗体的可变区域将该 CDR 移植到人可变区域,再次构建重链和轻链可变区域后,使这些人型化的再构建人可变区域与人恒定区域连结。这样的人型化抗体的制作法在本领域是公知的(例如,参照 Nature,321,522-525 (1986);J. Mol. Biol.,196,901-917 (1987);Queen C et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,86 :10029-10033(1989)等)。在此,作为本发明的抗 EP4 抗体中使用的来自小鼠的 CDR 序列,没有限定,例如,可举出作为重链 CDR1 ~ 3 的序列编号 5 ~ 7 所示的氨基酸序列、作为轻链 CDR1 ~ 3 的序列编号 8 ~ 10 所示的氨基酸序列或作为轻链 CDR1 ~ 3 的序列编号 18 ~ 20 所示的氨基酸序列。

[0129] 为了使人型化抗体重链或人型化抗体轻链在宿主细胞内表达,可以将人型化抗体重链或人型化抗体轻链插入到载体中。作为载体的种类,没有特别限定,可以根据其后导入的宿主细胞的种类等适当地进行选择。也可以为了使它们作为抗体表达而导入到适当的宿主细胞(例如,CHO 细胞等哺乳类细胞、酵母细胞、昆虫细胞等),在宿主细胞内再构建抗体,来制备重组型的抗体。

[0130] 本发明的人抗体的定义和生产方法

[0131] 人抗体(完全人抗体)是指作为可变区域的抗原结合部位的超变区域(Hyper Variable region)、可变区域的其它部分以及恒定区域的构造具有与人的抗体相同的结构。但是,超可变部位也可以来自其它的动物。本领域技术人员可利用公知的技术而容易地制成人抗体。人抗体例如可以利用如下的方法而取得,即,使用具有包含人抗体的

重链和轻链基因的人染色体片段的人抗体产生小鼠的方法(参照 Tomizuka, K. et al., Nature Genetics, (1997) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nuc. Acids Res., (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727 等), 或得到从人抗体库筛选的来自噬菌体展示的人抗体的方法(参照 Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology, (2002) 109 (3), 427-431 等)。

[0132] 本发明的抗体的功能片段

[0133] 作为本发明的抗体的功能片段,是指抗 EP4 抗体的一部分的区域,例如可举出 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv (variable fragment of antibody)、单链抗体(重链、轻链、重链可变区域、以及轻链可变区域等)、scFv、diabody (scFv 二聚体)、dsFv (二硫化物稳定化可变区域)、以及至少一部分含有 CDR 的肽等。Fab 是用蛋白质分解酶木瓜蛋白酶处理抗体分子而得到的片段中,重链的 N 末端侧约一半与轻链整体通过二硫键进行结合的具有抗原结合活性的抗体片段。

[0134] Fab 的制作除了可以通过用木瓜蛋白酶对抗体分子进行处理而取得片段之外,例如还可以通过构建插入了编码 Fab 的 DNA 的适当的表达载体,将其导入到适当的宿主细胞(例如,CHO 细胞等哺乳类细胞、酵母细胞,昆虫细胞等)后,在细胞内使 Fab 表达而实施。

[0135] 另外,F(ab')₂是用蛋白质分解酶胃蛋白酶对抗体分子进行处理而得到的片段中,比 Fab 介由铰链区域的二硫键而结合的物质略大,具有抗原结合活性的抗体片段。F(ab')₂可以通过用抗体分子胃蛋白酶进行处理而取得片段,除此之外,还可以通过使后述的 Fab 进行硫醚结合或二硫结合而制成,并且,也可以与 Fab 同样地利用基因工程的方法而制成。

[0136] Fab' 是切断上述 F(ab')₂的铰链区域的二硫键的具有抗原结合活性的抗体片段。Fab' 也可以与 Fab 等同样地利用基因工程的方法而制成。

[0137] scFv 是使用适当的肽连接器将 1 根重链可变区域(VH)和 1 根轻链可变区域(VL)连结而成的 VH-连接器-VL~VL-连接器-VH 多肽,是具有抗原结合活性的抗体片段。scFv 可以通过取得编码抗体的重链可变区域和轻链可变区域的 cDNA,利用基因工程的方法而制成。

[0138] diabody 是 scFv 二聚体化的抗体片段,具有二价的抗原结合活性的抗体片段。二价的抗原结合活性可以是相同抗原结合活性,也可以是一方不同的抗原结合活性。diabody 可以通过取得编码抗体的重链可变区域和轻链可变区域的 cDNA,构建用肽连接器将重链可变区域和轻链可变区域结合的表达 scFv 的 cDNA,利用基因工程的方法而制成。

[0139] dsFv 是指使将重链可变区域和轻链可变区域中的各 1 个氨基酸残基置换为半胱氨酸残基的多肽介由该半胱氨酸残基间的二硫键而结合得到的物质。置换为半胱氨酸残基的氨基酸残基可以利用 Reiter 等所示的方法等基于抗体的立体结构预测而选择。dsFv 可以通过取得编码抗体的重链可变区域和轻链可变区域的 cDNA,构建编码 dsFv 的 DNA 利用基因工程的方法而制成。

[0140] 含有 CDR 的肽以包含重链或轻链的 CDR (CDR1 ~ 3) 中的至少 1 个区域以上的方

式构成。含有多个 CDR 的肽可以直接或经由适当的肽连接器而结合。含有 CDR 的肽,构建编码抗体的重链或轻链的 CDR 的 DNA,插入到表达载体。作为载体的种类没有特别限定,根据其导入的宿主细胞的种类等适当地进行选择即可。可以通过将它们作为抗体表达而导入到适当的宿主细胞(例如,CHO 细胞等哺乳类细胞、酵母细胞、昆虫细胞等)进行制造。另外,含有 CDR 的肽也可以利用 Fmoc 法(苄氧羰基氨基羰基法)和 tBoc 法(叔丁氧羰基氨基羰基法)等的化学合成法进行制造。

[0141] 本发明的抗体的精制

[0142] 作为本发明的抗体的精制方法,没有特别限定,可以采用公知的方法。例如可以回收上述杂交瘤或上述重组细胞的培养上清,组合各种色谱法、盐析、透析、膜分离等公知的方法,来精制本发明的抗体。抗体的同型为 IgG 的情况下,也可以通过使用了蛋白质 A 的亲色和色谱法进行简便地精制。

[0143] 包含本发明的抗体的医药

[0144] 本发明的抗体或其功能片段可以用作以它们为有效成分的医药。这样的本发明的医药可以用于与 EP4 相关的免疫疾病、肿瘤以及疼痛的治疗或预防。

[0145] 与 EP4 相关的免疫疾病是指,例如牛皮癣;多发性硬化症;类风湿性关节炎;全身性红斑蓝疮;克罗恩病等炎症性肠疾病;I 型糖尿病及其并发症(例如糖尿病性网膜症、糖尿病性细小血管症、糖尿病性肾损伤、黄斑变性等);多发性肌炎;干燥综合症;哮喘特异性皮炎以及接触性皮炎;免疫缺陷疾病;脏器移植等。

[0146] 本发明的医药可以用于疼痛即伤害感受性疼痛和神经障碍性疼痛的治疗或预防。伤害感受性疼痛是指例如由体性和内脏性的伤害感受器的活化所引起的疼痛,例如关节的病性变形和慢性关节痛(例如包括类风湿性关节炎的关节炎、变形性关节症、类风湿性脊椎炎、骨关节炎、痛风性关节炎以及青少年性关节炎等)(包括疾病的缓和和关节结构维持);腰痛和颈部痛;肌骨酸痛;肌炎;骨折;捻挫,挫伤;伴随纤维肌痛症的疼痛;肿瘤和与肿瘤治疗相关的疼痛;伴随流感或其它的病毒感染病(感冒等)的疼痛;风湿热;内脏痛;伴随功能性的肠病(例如过敏性肠综合症、非心脏性胸痛、非溃疡性消化不良等)的疼痛;伴随心肌缺血的疼痛;牙痛;术后和牙科处置后的疼痛;产后痛;一次性头痛(例如偏头痛、紧张型头痛、群发头痛和其它的一次性头痛);二次性头痛(例如由头颈部外伤引起的头痛、由头颈部血管障碍引起的头痛、由非血管性颅内疾病引起的头痛、由药物乱用等物质或其脱离引起的头痛、由感染病引起的头痛、由体内平衡的障碍引起的头痛、由颅骨、颈、眼、耳、鼻、副鼻腔、牙、口或其它的面·颅的构成组织的损伤引起的头痛或伴随面痛药物诱发性头痛和偏头痛的疼痛等)等。

[0147] 神经障碍性疼痛是指例如物理性外伤或切断;幻肢痛;由慢性炎症症状引起的疼痛;带状疱疹后神经痛;糖尿病性神经障碍;非特异性的腰痛;背部痛;坐骨神经痛;肿瘤和与其治疗相关的神经障碍;HIV 相关神经障碍;腕管综合症;慢性醇中毒;甲状腺功能低下症;三叉神经痛;三叉神经·植物神经性头痛;尿毒症;维生素缺乏症;多发性硬化症;纤维肌痛症;伴随毒素等的疼痛等。

[0148] 本发明的医药对肿瘤的治疗或预防有用。肿瘤的治疗不仅包括肿瘤的生长、散开、转移的全面或部分的阻止或肿瘤细胞的全面或部分的驱除,还包括伴随肿瘤的症状(疼痛、食欲不振、体重减少等)的部分的或全面的消除。

[0149] 作为肿瘤的治疗或预防,以良性的肿瘤的异常增殖和息肉、恶性的肿瘤的异常增殖和息肉、新生物为对象。

[0150] 良性的肿瘤的异常增殖和息肉是指例如扁平上皮细胞乳头状瘤;基底细胞肿瘤;移行细胞乳头状瘤;腺瘤;胃泌素瘤;胆管细胞腺瘤;肝细胞腺瘤;肾管状腺瘤;膨大细胞瘤;血管球肿瘤;黑色素细胞母斑;纤维瘤;粘液瘤;脂肪瘤;平滑肌瘤;横纹肌瘤;良性畸形瘤;血管瘤;骨瘤;软骨瘤以及髓膜瘤等。

[0151] 恶性的肿瘤的异常增殖以及息肉包括例如肝细胞癌;胆管细胞癌;肾细胞癌;扁平上皮癌;基底细胞癌;移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;恶性黑色素瘤;纤维肉瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;恶性畸形瘤;血管肉瘤;卡波济氏肉瘤;骨肉瘤;软骨肉瘤;淋巴管肉瘤;恶性髓膜瘤;非霍奇金淋巴瘤;霍奇金淋巴瘤;白血病以及脑肿瘤等。

[0152] 新生物包括来自上皮细胞的新生物(上皮癌瘤)、基底细胞癌瘤、腺癌瘤,以及口唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌以及胃癌之类的胃肠癌,结肠癌、直肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、肺癌、乳腺癌,以及扁平上皮细胞癌和基底细胞癌之类的皮肤癌,前列腺癌、肾细胞癌瘤,另外,包括侵袭全身的上皮、间质或血液细胞的其它的已知的癌。

[0153] 可以提供含有本发明的抗体和具有抗肿瘤活性和/或杀细胞活性的化合物的抗体-药剂复合体。另外,使用基因重组技术,使作为具有抗肿瘤活性和/或杀细胞活性的化合物的蛋白质毒素在基因上与抗体基因融合,作为一个蛋白质表达而得到的通常称为免疫毒素。作为具有抗肿瘤活性的化合物,例如可举出阿霉素、丝裂霉素C等。作为抗体-药剂复合体的制作方法,没有限定,例如可举出利用二硫键或胺键将抗体和药剂偶联的方法等。

[0154] 含有本发明的抗体的医药组合物

[0155] 本发明中还包含医药或医药组合物。作为本发明的医药的有效成分,除了上述的本发明的抗体或其功能片段,还可使用生理学上允许的它的盐。作为盐,例如存在酸性基团的情况下,可以形成锂、钠、钾、镁、钙等碱金属以及碱土类金属盐;氨、甲胺、二甲胺、三甲胺、二环己胺、三(羟基甲基)氨基甲烷、N,N-双(羟基乙基)哌嗪、2-氨基-2-甲基-1-丙醇、乙醇胺、N-甲基葡糖胺、L-葡糖胺等胺的盐;或与赖氨酸、 δ -羟基赖氨酸、精氨酸等碱性氨基酸的盐。存在碱性基团的情况下,可以举出盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等矿酸的盐;与甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、乙酸、丙酸盐、酒石酸、富马酸、马来酸、苹果酸、草酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、桂皮酸、乳酸、乙醇酸、葡萄糖醛酸、抗坏血酸、烟酸、水杨酸等有机酸的盐;或与天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸的盐等。

[0156] 本发明的医药可以给予作为有效成分的本发明的抗体或其功能片段本身,但通常除了作为有效成分的抗体或其功能片段之外,还优选以含有1或2个以上的制剂用添加物的医药组合物的形态进行给药。作为本发明的医药的有效成分,可以组合发明的抗体或其功能片段的2种以上使用,上述医药组合物中可以一并配合公知的其它的药剂。

[0157] 医药组合物的种类没有特别限定,作为剂型,可以举出片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、糖浆剂、悬浮剂、栓剂、软膏、乳膏剂、凝胶剂、贴剂、吸入剂、注射剂等。这些制剂可以根据常用方法而制备。应予说明,对于液体制剂,用时,可以是溶解或悬浮于水或其它的适当的溶剂的形态。另外,片剂、颗粒剂可以利用公知的方法包衣。为注射剂的情况下,使本发明的化合物溶解在水中制备,根据需要也可以溶解于生理盐水或葡萄糖溶液,另外,也

可以添加缓冲剂、保存剂。以经口给药用或非经口给药用的任意的制剂形态提供。例如,可以作为颗粒剂、细粒剂、散剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、糖浆剂、乳剂、悬浮剂或液剂等形态的经口给药用医药组合物、静脉内给药用、肌肉内给药用、或皮下 给药用等注射剂、点滴剂、经皮吸收剂、经粘膜吸收剂、点鼻剂、吸入剂、栓剂等形态的非经口给药用医药组合物而制备。注射剂、点滴剂等可以以冷冻干燥形态等的粉末状的剂形而制备,用时可以溶解于生理盐水等适当的水性介质而使用。另外,能够将用高分子等覆盖的缓释制剂直接向脑内给药。

[0158] 对于医药组合物的制造中使用的制剂用添加物的种类、制剂用添加物相对于有效成分的比例、或医药组合物的制造方法,本领域技术人员可以根据组合物的形态适当地进行选择。作为制剂用添加物,可以使用无机或有机物质或者固体或液体的物质,通常可以以相对于有效成分重量为 1 重量% ~ 90 重量% 之间进行配合。具体而言,作为这样的物质的例子,可以举出乳糖、葡萄糖、甘露糖醇、糊精、环糊精、淀粉、蔗糖、偏硅铝酸镁、合成硅酸铝、羧甲基纤维素钠、羟丙基淀粉、羧甲基纤维素钙、离子交换树脂、甲基纤维素、明胶、阿拉伯胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、轻质无水硅酸、硬脂酸镁、滑石、黄耆胶、膨润土、硅酸镁铝、氧化钛、脱水山梨糖醇脂肪酸酯、月桂基硫酸钠、甘油、脂肪酸甘油酯、精制羊毛脂、甘油明胶、聚山梨酸酯、聚乙二醇、植物油、蜡、液体石蜡、白色凡士林、碳氟化合物、非离子性表面活性剂、丙二醇、水等。

[0159] 为了制造经口给药用的固体制剂,将有效成分和赋形剂成分例如乳糖、淀粉、结晶纤维素、乳酸钙、无水硅酸等进行混合制成散剂,或进一步根据需要添加白糖、羟丙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等结合剂,羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙等崩解剂等进行湿式或干式造粒制成颗粒剂。为了制造片剂,将这些散剂和颗粒剂直接、或加入硬脂酸镁、滑石等润滑剂进行压片即可。这些颗粒或片剂可以用羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯聚合物等肠溶剂基剂覆盖而制成肠溶剂制剂,或用乙基纤维素、巴西棕榈蜡、硬化油等覆盖制成持续性制剂。另外,为了制造胶囊剂,可以将散剂或颗粒剂填充到硬胶囊,或者将有效成分直接或溶解于甘油、聚乙二醇、香油、橄榄油等后用明胶膜覆盖制成软胶囊。

[0160] 为了制造注射剂,可以将有效成分根据需要与盐酸、氢氧化钠、乳糖、乳酸、钠、磷酸一氢钠、磷酸二氢钠等 pH 调整剂、氯化钠、葡萄糖等等渗剂一起溶解于注射用蒸馏水中,进行无菌过滤填充到安瓿中,或者进一步加入甘露醇、糊精、环糊精、明胶等进行真空冷冻干燥,制成用时溶解型的注射剂。另外,也可以向有效成分中加入卵磷脂、聚山梨酸酯 80、聚氧乙烯硬化蓖麻油等在水中乳化制成注射剂用乳剂。

[0161] 为了制造直肠给药剂,将有效成分与可可脂、脂肪酸的三、二以及单甘油酯、聚乙二醇等栓剂用基材一起加湿而溶解浇注到模内进行冷却,或将有效成分溶解于聚乙二醇、大豆油等后,用明胶膜等覆盖即可。

[0162] 本发明的医药的给药量及给药次数没有特别限定,可根据治疗对象疾病的恶化·发展的防止和 / 或治疗的目的、疾病的种类、患者的体重或年龄、疾病的严重度等条件,基于医师的判断适当地进行选择。通常,经口给药时成人每日的给药量为 0.01 ~ 1000mg (有效成分重量) 左右,可一日 1 次或分多次、或每隔数日给药。用作注射剂的情况下,优选对成人连续给药或间歇给药一日量为 0.001 ~ 400mg (有效成分重量)。

[0163] 本发明的医药作为植入片和封入到微囊的传递系统等的缓释性制剂,可以使用能

防止从体内即时除去的载体来制备。作为载体,例如可使用乙烯-乙烯基乙酸盐、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、以及聚乳酸等生物分解性、生物适应性聚合物。本领域技术人员可容易地制备这样的材料。另外,脂质体的悬浮液也能够用作药剂上可接受的载体。有用的脂质体没有限定,但作为含有磷脂酰胆碱、胆固醇以及 PEG 衍生磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物,以成为适合使用的尺寸的方式,通过适当的孔隙尺寸的过滤器而制备,利用逆相蒸发法进行精制。

[0164] 本发明的医药作为医药组合物以试剂盒的形态与给药说明书一起包含在容器、包装中。本发明的医药组合物作为试剂盒供给时,该组合物中不同的构成成分包装在不同的容器中,使用之前混合。这样将构成成分分别包装能够在不损失活性构成成分的功能的情况下进行长期的储藏。

[0165] 试剂盒中含有的试剂被供给到长时间有效维持构成成分的活性、不吸附在容器内侧、并且由不使构成成分变质的材质制造的容器中。例如,密封的玻璃安瓿还可以含有在氮气之类的中性且显示不反应性的气体的存在下封入的缓冲液等。安瓿由玻璃、聚碳酸酯、聚苯乙烯等有机聚合物,陶瓷、金属、或通常用于保持试剂的其它任意的适当的材料构成。

[0166] 另外,试剂盒中可以附有使用说明书。本试剂盒的使用说明可以印刷在纸等上,和/或保存在 Floppy (注册商标) 盘、CD-ROM、DVD-ROM、Zip 盘、录像带、录音带等电或电磁性可读的介质中提供给使用者。详细的使用说明可以实际上附加在试剂盒内,或可以记载在试剂盒的制造者或销售者所指定或电子邮件等通知的网站。

[0167] 另外,本发明中包含将本发明的医药或医药组合物向患者等给药,来预防或治疗与 EP4 相关的免疫疾病、肿瘤以及疼痛等的方法。

[0168] 在此,“治疗”是指在患有因 EP4 的功能异常(例如,功能的异常亢进等)而发病的疾病等的哺乳动物中,阻止或缓和其症状的进行和恶化,由此进行以阻止或缓和该疾病的进行和恶化为目的的处置。

[0169] 另外,“预防”是指对可能患有因 EP4 的功能异常(例如,功能的异常亢进等)而发病的疾病等的哺乳动物,预先阻止该疾病的发病或患病,由此进行以预先阻止该疾病的诸症状等的发病为目的的处置。

[0170] 成为治疗对象的“哺乳动物”是指被分类为哺乳类的任意的动物,没有特别限定,例如除了人,还可以是狗、猫、兔子等宠物,牛、猪、羊、马等家畜动物等。特别优选的“哺乳动物”是人。

[0171] 本发明的抗体固定化担载体

[0172] 本发明中包含抗体固定化担载体。本发明的抗体固定化担载体是本发明的抗人 EP4 抗体固定在担载体而成的。优选的实施方式中,本发明的抗体固定化担载体用于与含有 EP4 表达细胞的血液接触,从而从上述体液中除去 EP4 表达细胞。固定在担载体上的抗人 EP4 抗体可以仅为 1 种,也可以为 2 种以上。

[0173] 作为本发明的抗体固定化担载体的具体方式,例如,可举出本发明的抗体固定在水不溶性担载体,填充到容器的方式。在此,作为水不溶性担载体可以使用任意的材质,但若从成型性、灭菌性、细胞毒性低的观点考虑,列出优选的材质,可以举出聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、丙烯酸树脂、尼龙、聚酯、聚碳酸酯、聚丙烯酰胺、聚氨酯等合成高分子,琼脂糖、纤维素、乙酸纤维素、甲壳素、壳聚糖、藻酸盐等天然高分子,羟基磷灰石、玻璃、氧化铝、氧

化钛等无机材料,不锈钢、钛等金属材料。

[0174] 作为承载体的形状,可以举出粒状、棉状、编织物、无纺布、海绵状多孔体、平板状等,但从单位体积的表面积大的观点出发优选为粒状、棉状、编织物、无纺布、海绵状多孔体。例如,在将固定了抗体的水不溶性载体预先填充到容器中而得的多孔体过滤器中,使末梢血液通过,能够高效地除去与疾病相关的 EP4 表达细胞。

[0175] 组合本发明的抗体固定化载体和它的构成要素,能够制成 EP4 表达细胞除去用试剂盒。作为该其它的构成要素,可举出抗凝固剂、体外循环回路。

[0176] 含有本发明的抗 EP4 抗体的诊断用试剂盒

[0177] 本发明的抗 EP4 抗体可以以诊断用试剂盒的形态提供。本发明的诊断用试剂盒包含抗体,除此之外,可以含有标记物质、或二次抗体或其标记物。抗体的标记物质是指利用酶、放射性同位素、荧光化合物以及化学发光化合物等进行标记的物质。对于本发明的诊断用试剂盒,除了上述的构成要素之外,还可以含有用于实施本发明的检测的其它试剂,例如标记物为酶标记物时,可以含有酶基质(显色性基质等)、酶基质溶解液、酶反应停止液、或检体用稀释液等。另外,还可以包含各种缓冲液、灭菌水、各种细胞培养容器、各种反应容器(艾本德管等)、阻断剂(Bovine Serum Albumin (BSA), Skim milk, Goat 血清等血清成分)、清洗剂、表面活性剂、各种板、叠氮化钠等防腐剂,以及实验操作手册(说明书)等。作为测定法,例如有 ELISA 法、EI 法、RIA 法、荧光免疫测定法(FIA)、化学发光免疫测定法(Luminescence immunoassay)、流式细胞法,其中,从简便且高灵敏度的观点考虑,特别优选流式细胞法。另外,可以组合识别其它的细胞表面抗原的抗体试剂盒而使用。

[0178] 使本发明的诊断用试剂盒与患有癌、自身免疫疾病等的患者的血液细胞反应,可以检测 EP4 表达细胞在血液中的比例。通过与其它的细胞表面抗原抗体组合,能够检测特定的细胞集团(例如树状细胞、TH17 细胞、Treg 细胞)中的 EP4 表达细胞的比例。通过评价 EP4 表达细胞的比例的增减,从而能够评价疾病的状态。

[0179] 以下示出实施例进一步进行详细说明,但本发明不受以下的实施例任何限定。

[0180] 实施例

[0181] (1) 人 EP4 表达载体 pcDNA-DEST40-hEP4 的制作

[0182] 在 GenBank 完成注册的人 EP4 基因(注册编号 NM__000958)的、从 ORF 序列中除去了终止密码子的序列的 5' 末端附加 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATA GAACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC-3' 序列(序列编号 30),在 3' 末端附加 5'-GACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC-3' 序列(序列编号 31),合成 DNA,使用 Gateway 系统(Invitrogen 公司)组入 pDONR221 载体(Invitrogen 公司制),制成 pDONR-hEP4。插入的碱基序列根据常用方法确定,确认序列没有错误。接着利用 Gateway 系统,将含有人 EP4 基因的序列重组到 pcDNA-DEST40 载体(Invitrogen 公司制),得到 pcDNA-DEST40-hEP4。由该质粒表达的人 EP4 是在 C 末端附加了 V5 和 6×HIS 标签的融合蛋白质。pcDNA-DEST40-hEP4 的质粒 DNA 根据常用方法转化大肠菌(DH5 α 株)而扩增,使用 PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen 公司制)根据使用说明书而制备。

[0183] (2) 人 EP4 表达 293FT 细胞的制备

[0184] 对接种在 100mm 的胶原 I 皮细胞培养用器皿的 293FT 细胞(Invitrogen 公

司制),使用 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司制) 25 μ L 基于使用说明书将上述的 pcDNA-DEST40-hEP4 质粒 DNA10 μ g 进行基因导入。基因导入 24 小时后用 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions, Invitrogen 公司制)清洗细胞,利用不含酶的细胞解离缓冲液(Invitrogen 公司制)从细胞培养用器皿中剥离,利用离心操作回收。EP4 基因导入 293FT 细胞和基因未导入 293FT 细胞是使用 Cytotfix/Cytoperm Kit (BD 公司制)实施细胞膜透过处理,与抗 V5 标签抗体(Invitrogen 公司制)混合进行孵育(4 $^{\circ}$ C,1 小时)。用清洗缓冲液(含有 0.1% 牛胎儿血清的 PBS (Phosphate Buffered Saline, Invitrogen 公司制))清洗 3 次后,利用二次抗体 Alexa488 标记抗小鼠 IgG 抗体(Invitrogen 公司制)进行染色(4 $^{\circ}$ C,1 小时),再次利用清洗缓冲液清洗 3 次后,用流式细胞仪 Quanta SC MPL (Beckman Coulter 公司制)进行解析。其结果仅基因导入 293FT 细胞显示 Alexa488 荧光阳性,所以可确认表达人 EP4。

[0185] 因此,将该人 EP4 表达 293FT 细胞作为致敏抗原使用。

[0186] (3) 免疫

[0187] 抗原免疫是对 129/01a 系统的 7 周龄的雌性小鼠进行。将(2)中记载的人 EP4 表达 293FT 细胞悬浮于生理盐水后,间隔 10 ~ 14 日进行 5 次腹腔内给药。

[0188] (4) 杂交瘤的制作

[0189] 从第 5 次免疫 3 天后摘出小鼠的脾脏,制备脾细胞。使用聚乙二醇 4000 (默克公司制)根据常用方法使脾细胞和小鼠骨髓瘤 P3X63Ag8.653 细胞(ECACC)细胞融合。融合细胞悬浮在含有 100 单位/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、非必须氨基酸、2mM L-谷氨酸、NCTC-109 培养基(以上 Invitrogen 公司制)的 GIT 培养基(和光纯药公司制)中,在 96 孔板以 100 μ L/孔的比例接种,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下进行培养。从融合的次日开始,交换成在上述的培养基中加入 HAT Supplement (Invitrogen 公司制)而成的培养基,融合后继续培养 13 天。其结果得到约 700 次克隆的杂交瘤的集落。

[0190] (5) 人 EP4 稳定表达 NS0 细胞株的构建

[0191] 从(1)中所述的 pDONR-hEP4 向 pEF-DEST51 载体(Invitrogen 公司制)进行利用了 Gateway 系统的序列的重组,得到 pEF-DEST51-hEP4 质粒。由该质粒表达的人 EP4 是在 C 末端附加 V5 和 6 \times HIS 标签的融合蛋白质。

[0192] 对在含有 10% 的牛胎儿血清、100 单位/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素(Invitrogen 公司制)的 RPMI 培养基中培养的小鼠骨髓瘤 NS0 细胞(理化学研究所细胞库)1 \times 10⁷细胞,使用 Lipofectamin LTX (Invitrogen 公司制) 35 μ L 和 PlusReagent (Invitrogen 公司制) 14 μ L,根据使用说明书将 pEF-DEST51-hEP4 质粒 14 μ g 进行基因导入。从基因导入的次日开始,在加入了 2.5 μ g/mL 的抗生物质杀稻瘟菌素(Invitrogen 公司制)的 RPMI 培养基中,每第 3 天交换培养基,培养 2 周。从形成的集落中利用青霉素帽法(ペニシリンキャップ法),克隆杀稻瘟菌素耐性 NS0 细胞。

[0193] 将得到的杀稻瘟菌素耐性 NS0 细胞用 FcBlock(Becton Dickinson 公司制)在 4 $^{\circ}$ C 封闭 15 分钟后,通过与(2)相同的方法利用流式细胞仪确认 EP4 融合蛋白质的表达。其结果可确认得到的杀稻瘟菌素耐性 NS0 细胞稳定表达人 EP4。

[0194] (6) 抗 EP4 抗体产生杂交瘤的筛选

[0195] 将(5)中制成的人 EP4 稳定表达 NS0 细胞株 2 \times 10⁵细胞通过与(2)相同的方法染

色且进行利用流式细胞仪的解析。不实施细胞膜透过处理,作为一次抗体,使用(4)中得到的杂交瘤的培养上清 50 μ L。其结果在 21 孔的上清可观察到 Alexa488 荧光阳性的反应。呈阳性的孔的细胞利用极限稀释法进行克隆,2 周后的培养上清也通过相同的方法,进行利用流式细胞仪的与人 EP4 稳定表达 NS0 细胞株的结合试验。再次重复相同的克隆和结合试验,最终得到 2 次克隆的抗 EP4 抗体产生杂交瘤。将这些杂交瘤分别标记为 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21。

[0196] 得到的杂交瘤细胞 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 于 2010 年 6 月 29 日(原保藏日)保藏在茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 筑波中心中央第 6 (邮政编号 305-8566) 独立行政法人工业技术总合研究所专利生物保藏中心并使其保藏编号分别为 FERM P-21978 和 FERM P-21979。其后,基于布达佩斯条约,由原保藏转移国际保藏管理(国际保藏单位是独立行政法人制品评价技术基础机构专利生物保藏中心,地址为日本国千叶县木更津市 Kazusa 镰足 2-5-8120 号室,国际保藏日为 2011 年 8 月 3 日;“原保藏的保藏证明”和“与存活相关的证明书”的通知日;2011 年 9 月 5 日)。保藏编号分别为 FERM BP-11402 和 FERMBP-11403。

[0197] (7) 抗 EP4 抗体的精制

[0198] 将杂交瘤细胞 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 分别在无血清的 CD-Hybridoma Medium (Invitrogen 公司制)中,继续培养直到细胞的约 9 成死亡,产生抗体。从该培养上清 100mL 利用离心操作(1500rpm, 15 分钟)除去细胞后,通过通入 HiTrap Protein G HP 柱(GE Healthcare Japan 公司制)而将 IgG 精制·浓缩。对于得到的精制 IgG,使用 Iso Strip 小鼠单克隆抗体同型试剂盒(Roche Diagnostics 公司制)来决定子类和轻链的种类,其结果均为(IgG2a, κ)。以下,NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 是指它们的精制抗体,记载为杂交瘤或细胞时是指产生这些抗体的杂交瘤。

[0199] 与(2)、(3)、(4)、(6)同样地得到子类不同的抗 EP4 抗体产生杂交瘤细胞。从该杂交瘤的培养上清,与(7)同样地得到子类和轻链的种类为(IgG1, κ)的精制 IgG。该精制抗体为 NBG016-mAb9。

[0200] (8) 人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的制作

[0201] 从 pDONR-hEP4, 利用 Gateway 系统在 pEF5/FRT/V5-DEST 载体(Invitrogen 公司制)中重组人 EP4 基因,得到 pEF-FRT-hEP4。由该质粒表达的人 EP4 是在 C 末端附加 V5 和 6 \times HIS 标签的融合蛋白质。

[0202] 对在含有 10% 的牛胎儿血清和 100 单位 /mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 Ham's F-12 培养基(Invitrogen 公司制)中培养的 Flp-In-CHO 细胞(Invitrogen 公司制),使用 Lipofectamine2000 将 pEF-FRT-hEP4 质粒和 pOG44 质粒(Invitrogen 公司制)同时基因导入。从基因导入的次日开始,将培养基交换成加入了 500 μ g/mL 的抗生物质潮霉素(Invitrogen 公司制)的 Ham's F-12 培养基,每第 3 天交换培养基地培养 2 周。从形成的集落中,利用青霉素帽法克隆潮霉素耐性细胞。

[0203] 利用(2)所述的方法,作为二次抗体,使用藻红蛋白(PE)标记抗小鼠 IgG 抗体(Beckman Coulter 公司),用流式细胞仪解析得到的潮霉素耐性细胞与抗 V5 标签抗体的结合。其结果是得到的潮霉素耐性 Flp-In-CHO 细胞显示 PE 阳性,所以确认稳定表达人 EP4。以下将该细胞记载为人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株。

[0204] (9) 抗人 EP4 抗体与人 EP4 表达细胞的结合试验

[0205] 通过(6)所述的方法利用流式细胞仪实施抗人 EP4 抗体与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验。使用 5×10^5 人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株或母株 Flp-In-CHO 细胞, 作为一次抗体使用 $1 \mu\text{g}$ 的 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 或小鼠同型对照抗体(BioRegend 公司制), 作为二次抗体使用 PE 标记抗小鼠 IgG 抗体。

[0206] 其结果示于图 1。将母株 Flp-In-CHO 细胞以涂成灰色的直方图表示, 将人 EP4 稳定表达株细胞以黑的实线表示。NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 一起仅与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株结合, 所以显示这些的抗体与人 EP4 特异性地结合。

[0207] 同样地也进行 NBG016-mAb9 与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验。将结果示于图 2。由其结果示出 NBG016-mAb9 也与人 EP4 特异性地结合。

[0208] (10) 抗体对 PGE_2 所致的 cAMP 产生的抑制试验

[0209] 将人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株或母株 Flp-In-CHO 细胞, 在含有乙酰水杨酸 1mM 的培养基中培养 18 小时后, 用细胞解离缓冲液从细胞培养器皿中回收, 在 CulturPlate-96 (Perkin Elmer 公司制) 中每 1 孔分注 2500 个。向各孔中加入 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 或小鼠同型对照抗体以使其为 $0.05 \sim 30 \mu\text{g}/\text{mL}$, 在室温下精置 15 分钟。接着以成为 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 的方式加入 PGE_2 (Cayman 公司制), 进而在室温下静置 30 分钟。细胞内产生的 cAMP 量通过使用 LANCE Ultra cAMP Kit (Perkin Elmer 公司制), 进行基于使用说明书的反应, 利用读板仪 ARV01420HTS (Perkin Elmer 公司制) 进行测定。

[0210] 将其结果示于图 3。即使加入小鼠同型对照抗体, 也观察不到与利用 PGE_2 诱导的 cAMP 产生量相关的有意义的抑制效果, 然而加入 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 的情况下, 观察到抗体浓度依赖性的 cAMP 产生抑制效果。使用数据解析软件 OriginPro8.1 (OriginLab 公司制) 进行利用逻辑函数的解析, 其结果 IC_{50} 值, NBG016-mAb14 为 $0.15 \mu\text{g}/\text{mL}$ (约 1.0nM), NBG016-mAb21 为 $0.24 \mu\text{g}/\text{mL}$ (约 1.6nM)。从其结果显示, NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 是对人 EP4 具有拮抗剂活性的功能性抗体, 与对人 EP4 具有拮抗剂活性的现有物质(例如低分子化合物) 相比, 具有同等以上的强的受体功能抑制活性。

[0211] 同样地对于 NBG016-mAb9, 将添加 $1.5 \times 10^{10}\text{PGE}_2$ 进行的试验的结果示于图 4。进行上述的解析后, NBG016-mAb9 的 IC_{50} 值为 $4.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ (约 28.8nM)。由其结果显示, NBG016-mAb9 也是对人 EP4 具有拮抗剂活性的功能性抗体。

[0212] (11) 人 EP1 ~ 4、小鼠 EP1 ~ 4 的表达载体制作

[0213] 在人 EP1 (GenBank 注册编号 NM__000955)、人 EP2 (GenBank 注册编号 NM__000956) 人 EP3a1 (GenBank 注册编号 X83857)、小鼠 EP1 (GenBank 注册编号 NM__013641)、小鼠 EP2 (GenBank 注册编号 NM__008964)、小鼠 EP3 (GenBank 注册编号 NM__011196)、小鼠 EP4 (GenBank 注册编号 NM__008965) 的除终止密码子以外的 ORF 序列的 5' 末端附加 CA CCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGG TACTGCTGCTCTGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC 序列(序列编号 32), 得到 DNA 片段, 使用 KOD FX(东洋纺织公司制) 根据常用方法对得到的 DNA 片段进行 PCR 扩增。扩增的 DNA 组入 pENTR/D-TOPO 载体 (Invitrogen 公司制), 分别制成 pENTR-hEP1、pENTR-h EP2、pENTR-hEP3、pENTR-mEP1、pENTR-mEP2、pENTR-mEP3、pENTR-mEP4。插入的碱基序列根据常用方法决定, 确认序列没有错误。使用这 7 种质粒和(1) 中制成的 pDONR-hEP4 质粒, 利用 Gateway 系统将各插入片段重组到 pcDNA-DEST47 载体 (Invitrogen 公司制)。其结果得到 pcDNA-DEST47-hEP1、pcDNA-DEST47-hEP2、pcDNA-DEST47-hEP3、

pcDNA-DEST47-hEP4、pcDNA-DEST47-mEP1、pcDNA-DEST47-mEP2、pcDNA-DEST47-mEP3、pcDNA-DEST47-mEP4。由这些质粒表达在各 PGE₂受体的 C 末端附加了 Cycle3Green Fluorescent Protein (GFP) 的融合蛋白质。

[0214] (12) 抗 EP4 抗体的结合特异性试验

[0215] 将(11)中制成的 pcDNA-DEST47-hEP1、pcDNA-DEST47-hEP2、pcDNA-DEST47-hEP3、pcDNA-DEST47-hEP4、pcDNA-DEST47-mEP1、pcDNA-DEST47-mEP2、pcDNA-DEST47-mEP3、pcDNA-DEST47-mEP4 各 10 μg 使用 Lipofectamine2000 向 293FT 细胞进行基因导入。次日用 HBSS 清洗细胞,利用不含酶的细胞解离缓冲液从细胞培养用器皿剥取,通过离心操作回收。将这些细胞记载为 EP 瞬时表达 293FT 细胞。

[0216] 通过(6)所述的方法利用流式细胞仪实施本发明的抗 EP4 抗体与 EP 瞬时表达 293FT 细胞的结合试验。8 种 PGE₂受体亚型各自的瞬时表达 293FT 细胞使用 5×10^5 个,作为一次抗体使用 1 μg 的抗 EP4 抗体 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 或小鼠同型对照抗体 (BioRegend 公司制),作为二次抗体使用 PE 标记抗小鼠 IgG 抗体。

[0217] 作为例子,将 NBG016-mAb14 的结果示于图 5。存在来自 GFP 的荧光阳性细胞,所以可确认各 PGE₂受体在 293FT 细胞上表达。但是 8 种细胞中显示 PE 荧光阳性的仅为人 EP4 的表达细胞。NBG016-mAb21 也是相同的结果,所以可知本发明的抗 EP4 抗体对人型的 EP4 具有强特异性。显示 PGE₂受体亚型结合特异性比对人 EP4 具有拮抗剂活性的现有物质高。

[0218] 将同样地研究 NBG016-mAb9 的结合特异性的结果示于图 6。分别表达 8 种 PGE₂受体亚型的细胞中,显示 PE 荧光阳性的仅为人 EP4 的表达细胞。由其结果可知,NBG016-mAb9 也对人型的 EP4 具有强特异性。

[0219] (13) 人淋巴细胞与抗 EP4 抗体的结合性试验

[0220] 冷冻人末梢血单核细胞 (Cellular Technology Ltd. 公司制) 基于使用说明书使用 CTL-Anti-Aggregate-Wash Supplement (Cellular Technology Ltd. 公司制) 进行解冻而制备。

[0221] 人淋巴细胞与本发明的抗 EP4 抗体的结合性试验通过(6)所述的方法利用流式细胞仪而实施。对于制备的人末梢血单核细胞 9×10^5 个,作为一次抗体使用 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 或小鼠同型对照抗体 1.5 μg,作为二次抗体使用 Alexa488 标记抗小鼠 IgG 抗体。进行利用流式细胞仪的解析时,基于前方散射光和侧方散射光的点曲线,将细胞集团区分为淋巴细胞部分和单核细胞·巨噬细胞部分,研究淋巴细胞部分的 Alexa488 荧光强度。

[0222] 将利用流式细胞仪的解析结果示于图 7。将小鼠同型对照抗体的结果以涂成灰色的直方图表示,将抗 EP4 抗体的结果以黑的实线表示。仅与抗 EP4 抗体反应的情况下,人淋巴细胞部分的大部分显示 Alexa488 阳性,所以可知人淋巴细胞与抗 EP4 抗体结合。由其结果可知,本发明的抗 EP4 抗体对人的内源性 EP4 具有结合的能力。

[0223] 对 NBG016-mAb9 也同样地进行与人淋巴细胞的结合确认实验。从人新鲜末梢血中使用 Lymphoprep (AXIS SHIELD 公司制) 基于使用说明书分离人末梢血单核细胞后,使用抗人 CD14 微球 (Miltenyi Biotec 公司制) 分取 CD14 阴性的细胞部分,得到人淋巴细胞部分。以下的结合确认实验通过使用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记抗小鼠 IgG 抗体 (Beckman Coulter 公司制) 作为二次抗体,如上所述地进行。如图 8 所示可知,人淋巴细胞的大部分

与 NBG016-mAb9 结合, NBG016-mAb9 也能与人的内源性 EP4 结合。

[0224] (14) PMA 刺激 THP1 的利用抗 EP4 抗体的免疫染色

[0225] 人单核系 THP1 细胞株在含有 PMA (Phorbol12-myristate13?acetate, Sigma Aldrich 公司制) 100nM 的 RPMI 培养基中, 在 4 孔培养板 (Becton Dickinson 公司制) 上以每孔有 1.5×10^5 细胞的方式接种, 培养 3 天分化为巨噬细胞形态。除去培养基之后用 PBS 清洗 3 次, 利用 1% 多聚甲醛溶液 200 μ L 固定细胞 (4 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟)。再次用 PBS 清洗 3 次后, 加入含有人体丙种球蛋白 (和光纯药公司制) 1mg/mL 的 1%BSA (Bovine Serum Albumin, 和光纯药公司制) 300 μ L 进行封闭 (室温, 静置 20 分钟)。接着利用含有 0.1%Tween20 (MP Bio 公司制) 的 PBS (以下, 记载为免疫染色清洗缓冲液) 清洗 3 次之后, 加入制备成 1mg/mL 的 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 或小鼠同型对照抗体 200 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用免疫染色清洗缓冲液清洗 3 次后, 利用二次抗体的 FITC 标记抗小鼠 IgG 抗体进行染色 (4 $^{\circ}$ C, 1 小时)。用免疫染色清洗缓冲液清洗 3 次而得的培养板在最后用含有 Propidium Iodide (PI) 的 VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories 公司制) 密封。制成的培养板通过使用荧光显微镜而观察。

[0226] 将经免疫染色的 THP1 细胞的荧光显微镜观察像示于图 9。左侧图像为小鼠同型对照抗体的染色图像, 中央仅能观察到被 PI 染色的细胞核 (灰色)。右侧的图像为抗 EP4 抗体的染色图像, 在细胞核的周边观察到 FITC 的荧光 (白色) 为粒状。由其结果可知, 本发明的抗体与利用 PMA 使 THP1 细胞株分化而得的巨噬细胞样细胞的细胞膜表面上的天然型 EP4 结合。

[0227] (15) 抗 EP4 抗体对 PGE₂ 所致的细胞因子抑制效果的抑制

[0228] 已知 PGE₂ 在巨噬细胞中介由 EP4 或 EP2 抑制 LPS 刺激所致的细胞因子产生。使用表达 EP4 受体的 PMA 分化 THP1 研究本发明的抗体是否使介由 EP4 的 PGE₂ 所致的抑制细胞因子产生恢复。THP1 细胞株在含有 PMA100nM 的 RPMI 培养基中在 48 孔细胞培养板上每 1 孔接种 2.5×10^5 细胞。培养 3 天后, 培养基交换成含有 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21、小鼠同型对照抗体 3.0 μ g/mL 的 RPMI 培养基, 孵育 30 分钟。接下来, 以成为 20nM 的方式加入 PGE₂ 进一步孵育 30 分钟。进而以成为 100ng/mL 的方式加入 LPS 后培养 18 小时。回收培养上清, 使用 TNF α Human DuoSet Kit (R & D Systems 公司制) 根据使用说明书, 测定培养上清中的 TNF α 的量。

[0229] 另一方面, 向回收培养上清后的细胞中, 加入以 RPMI 培养基稀释 10 倍的 AlamarBlue (MorphoSys 公司制) 0.5mL。孵育 4 小时后, 在激发波长 535nm、检测波长 595nm 的条件下利用读板仪 ARV01420HTS 进行荧光测定。以利用该 AlamarBlue 的测定结果为基础, 求出各孔间的相对生存细胞数比, 计算单位生存细胞数比的 TNF α 生产量。本发明的抗体恢复 PGE₂ 所致的抑制细胞因子产生到什么程度, 根据以下的基准进行计算。即, 以仅加入 LPS 刺激的孔的 TNF α 量为恢复率 100%, 以加入 LPS 刺激和 PGE₂ 的孔的 TNF α 量为恢复率 0%, 计算加入 LPS 刺激、PGE₂ 和该抗体时的恢复率。

[0230] 将试验结果示于表 1。即使加入小鼠同型对照抗体, 也没有观察到对 PGE₂ 所致的抑制 TNF α 产生有有意义的变化。但是, 加入 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 的情况下, 可知恢复约 50% 左右 PGE₂ 所致的抑制 TNF α 产生。独立进行 2 次试验得到相同的结果。由以上可知 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 是对人内源性 EP4 具有拮抗剂活性的功能性抗体。

[0231] [表 1]

[0232] 试验 1

[0233]

LPS	PGE ₂	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF α 浓度 \pm SD (pg/mL)	恢复率 \pm SD (%)
-	-	-	177.1	
+	-	-	350.0 \pm 21.8	
+	+	-	386.1 \pm 16.7	
+	+	NBG016-mAb14	423.4 \pm 33.9	52.0 \pm 12.9
+	+	NBG016-mAb21	469.1 \pm 48.1	69.3 \pm 18.2
+	+	同型对照	275.9 \pm 11.1	-3.9 \pm 4.2

[0234] 试验 2

[0235]

LPS	PGE ₂	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF α 浓度 \pm SD (pg/mL)	恢复率 \pm SD (%)
-	-	-	68.2 \pm 8.5	
+	-	-	403.5 \pm 37.1	
+	+	-	166.8 \pm 15.7	
+	+	NBG016-mAb14	281.5 \pm 10.7	48.5 \pm 4.5
+	+	NBG016-mAb21	286.1 \pm 19.5	50.4 \pm 8.3
+	+	同型对照	148.9 \pm 15.4	-7.6 \pm 6.5

[0236] (16) 编码抗 EP4 抗体的可变区域的 cDNA 的分离、解析

[0237] 由产生抗 EP4 抗体的杂交瘤 (NBG016-mAb14、NBG016-mAb21) 约 1×10^7 个, 使用 Rneasy Mini Kit (QIAGEN 公司制), 根据附加的使用说明书进行 Total RNA 的提取。采用 5' / 3' RACE 试剂盒、2nd GENERATION (Roche Diagnostics 公司制) 进行利用 5' -RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法的 PCR, 进行重链或轻链的可变区域的扩增。3' 引物使用与小鼠恒定区域 $\gamma 1$ 和 κ 相当的引物。用于重链可变区域扩增的 3' 引物为 5' -AGGGCCAGTGGATAGACCGATG-3' (序列编号 33) 和 5' -GGCTGTTGTTTTGGCTGCAGAGAC-3' (序列编号 34)。用于轻链可变区域扩增的 3' 引物为 5' -ACTGGATGGTGGGAAGATGGATAC-3' (序列编号 35) 和 5' -TGGATACAGTTGGTGCAGCATCAG-3' (序列编号 36)。接下来, 通过利用琼脂糖凝胶将得到的扩增片段电泳, 切出段, 溶解出凝胶, 从而进行 DNA 的精制。将精制的 DNA 组入 T-Vector pMD20 (Takara Bio 公司制), 解析碱基序列测定氨基酸序列。测序反应是使用 ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits Version 3.1 (Applied Biosystems 公司), 利用 Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems 公司) 测定碱基序列。解析碱基序列之后, 结果是作为编码 NBG016-mAb14 的重

链可变区域的核酸序列为序列编号 1, 作为编码轻链可变区域的核酸序列为序列编号 3。另外, 作为重链可变区域的氨基酸序列得到序列编号 2, 作为轻链可变区域的氨基酸序列得到序列编号 4。

[0238] 并且, 作为编码 NBG016-mAb21 的重链可变区域的核酸序列为序列编号 11, 作为编码轻链可变区域的核酸序列为序列编号 13。另外, 作为重链可变区域的氨基酸序列得到序列编号 12, 作为轻链可变区域的氨基酸序列得到序列编号 14。

[0239] 由以上的结果可明确由 Kabat 等((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth edition U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office) 定义的 CDR 区域的氨基酸序列。

[0240] NBG016-mAb14 的重链 CDR1 ~ 3 分别为序列编号 5 ~ 7。另外, 轻链 CDR1 ~ 3 分别为序列编号 8 ~ 10。另外, NBG016-mAb21 的重链 CDR1 ~ 3 分别为序列编号 15 ~ 17。另外, 轻链 CDR1 ~ 3 分别为序列编号 18 ~ 20。对于重链 CDR, 两个克隆完全一致。

[0241] 对于 NBG016-mAb9, 也根据上述的方法, 重链可变区域使用序列编号 33 和序列编号 34 的引物进行扩增, 轻链可变区域使用序列编号 35 和序列编号 36 的引物进行扩增, 测定可变区域的序列。作为编码 NBG016-mAb9 的重链可变区域的核酸序列为序列编号 41, 作为编码轻链可变区域的核酸序列为序列编号 42。另外, 作为重链可变区域的氨基酸序列得到序列编号 43, 作为轻链可变区域的氨基酸序列得到序列编号 44。

[0242] NBG016-mAb9 的重链 CDR1 ~ 3 分别为序列编号 45 ~ 47。另外轻链 CDR1 ~ 3 分别为序列编号 48 ~ 50。

[0243] (17) 抗 EP4 抗体基因的克隆

[0244] 使用 First Strand cDNA Synthesis Kit For RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics 公司制) 所附带的 Oligo-dT Primer, 根据使用说明书合成 cDNA。将合成的 cDNA 作为模板, 对本发明的抗 EP4 抗体的重链和轻链基因全长进行 PCR 扩增。重链和轻链的 5' 末端侧以 5' -RACE 中明确的碱基序列为参考, 3' 末端侧以恒定区域特异性的序列为参考而设计。用于重链基因扩增的 5' 引物为 5' -CACTGACCCTACGCGTATG GAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3' (序列编号 37)、3' 引物为 5' -ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAG-3' (序列编号 38)。用于轻链可变区域扩增的 5' 引物为 5' -TTGACGCCA GGAACGCGTATGGACATGAGGACCCCTGCT-3' (序列编号 39) 和 5' -ATAAGAATGCGGCCGCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCT-3' (序列编号 40)。得到的重链和轻链扩增片段用限制酶 MluI 和 NotI 切断, 重链组入 pEHX1.1 (东洋纺织公司制) 的 MluI 和 NotI 位置、轻链组入 pELX2.1 (东洋纺织公司制) 的 MluI 和 NotI 位置, 解析碱基序列测定氨基酸序列。

[0245] 解析碱基序列之后, 结果是作为编码 NBG016-mAb14 的重链的核酸序列为序列编号 22, 作为编码轻链的核酸序列为序列编号 24。另外作为重链的氨基酸序列得到序列编号 23, 作为轻链的氨基酸序列得到序列编号 25。

[0246] 作为编码 NBG016-mAb21 的重链的核酸序列为序列编号 26, 作为编码轻链的核酸序列为序列编号 28。另外, 作为重链的氨基酸序列得到序列编号 27, 作为轻链的氨基酸序列得到序列编号 29。

[0247] 重链以及轻链可变区域的氨基酸序列与利用上述 5' -RACE 法解析的氨基酸序列相同。

[0248] 对于 NBG016-mAb9, 也根据上述的方法合成 cDNA, 将其作为模板对 NBG016-mAb9 的重链和轻链基因全长进行 PCR 扩增。用于重链基因扩增的 5' 引物为 5'-CACTAGAGCCC CCATACGCGTATGGCTGT CCTGGTGCTGTTCC-3' (序列编号 51), 3' 引物为 5'-ATAAGAATGC GGCCTCATTTACCCGGAGAGTGGGAGAG-3' (序列编号 52)。用于轻链基因扩增的 5' 引物为 5'-TCCTCAGGTTGCCTCACGCGTAT GAAGTTCCTGTTAG-3' (序列编号 53) 和 5'-ATAAGAATGCGGC CGCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCT-3' (序列编号 40)。得到的重链和轻链扩增片段用限制酶 MluI 和 NotI 切断, 重链组入 pEHX1.1 (东洋纺织公司制) 的 MluI 和 NotI 位置, 轻链组入 pELX2.1 (东洋纺织公司制) 的 MluI 和 NotI 位置, 解析碱基序列测定氨基酸序列。

[0249] 作为编码 NBG016-mAb9 的重链的核酸序列为序列编号 54, 作为编码轻链的核酸序列为序列编号 55。另外, 作为重链的氨基酸序列得到序列编号 56, 作为轻链的氨基酸序列得到序列编号 57。

[0250] (18) 得到的抗体基因序列编码抗 EP4 抗体的确认

[0251] NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 的重组抗体使用 Mammalian PowerExpress System (东洋纺织公司制) 生产。用限制酶 EcoRI 和 BglIII 切断插入了轻链基因的 pELX2.1, 利用琼脂糖凝胶进行电泳, 从而精制含有轻链基因的片段。将精制的轻链基因片段组入插入了重链基因的 pEHX1.1 的 EcoRI-BglIII 位置, 制成保持轻链和重链双方的基因的质粒。将该质粒使用 Lipofectamine2000 转导到 293FT 细胞, 进行瞬时的抗体表达。

[0252] 采集转导后 72 小时后的细胞培养上清, 通过(6)所述的方法利用流式细胞仪实施与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验。作为对照, 使用抗体基因未导入的 293FT 细胞的培养上清。其结果培养上清中分泌的重组抗体 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 保持对人 EP4 的结合性。因此, 可确认(17)中得到的抗体基因序列编码抗 EP4 抗体。

[0253] NBG016-mAb9 的重组抗体也与上述的方法相同地生产。用限制酶 SalI 和 SpeI 切断插入了轻链基因的 pELX2.1, 利用琼脂糖凝胶进行电泳, 从而精制含有轻链基因的片段。将精制的轻链基因片段组入插入了重链基因的 pEHX1.1 的 SalI-SpeI 位置, 制成保持轻链和重链双方的基因的质粒。将该质粒转导到 293FT 细胞, 进行瞬时的抗体表达。

[0254] 采集转导后 72 小时后的细胞培养上清, 通过(6)所述的方法利用流式细胞仪实施与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验。作为对照, 使用抗体基因未导入的 293FT 细胞的培养上清。将结果示于图 10。将母株 Flp-In-CHO 细胞以涂成灰色的直方图表示, 将人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株以黑的实线表示。培养上清中分泌的重组抗体 NBG016-mAb9 保持对人 EP4 的结合性, 可确认(17)中得到的 NBG016-mAb9 的抗体基因序列编码抗 EP4 抗体。

[0255] (19) 重组抗 EP4 抗体稳定表达 CHO 细胞的制作

[0256] 用限制酶 SspI 切断(18)中制成的保持 NBG016-mAb14、NBG016-mAb21 的轻链和重链的基因的载体, 利用乙醇沉淀法进行精制。使用 Lipofectamine2000 来转导到 CHO-K1 细胞(理化学研究所细胞库), 在含有 10% 牛胎儿血清的 Ham's F12 培养基中培养 24 小时。24 小时后, 交换成含有 10% 牛胎儿血清和 10 μ g/mL 嘌呤毒素的 Ham's F12 培养基, 每 3 天交换培养基, 并且培养 12 天。12 天后利用青霉素帽法分离集落。

[0257] 将分离的 CHO-K1 细胞接种在 24 孔板上, 在含有 10 μ g/mL 嘌呤毒素的 Ham's F12 培养基上培养 3 天。3 天后交换为含有 10 μ g/mL 嘌呤毒素的 Ham's F12 培养基(未添加牛胎儿血清), 回收培养 72 小时后的培养上清。

[0258] 培养上清中的小鼠 IgG 利用 ELISA 法进行检测。使用 PBS 制成培养上清的稀释系列,分注在 Maxisorp96 孔板(Nunc 公司制),在 4℃ 静置一夜。次日,加入含有 3%BSA(Sigma 公司制)的 PBS,在室温静置 1 小时进行封闭。用含有 0.1%Tween20 的 PBS 清洗后,加入用含有 1%BSA 的 PBS 稀释到 4000 倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗小鼠 IgG 抗体(Millipore 公司制),在室温静置 1 小时。用含有 0.1%Tween20 的 PBS 进行清洗后,加入显色试剂(Sureblue TMB microwell peroxidase substrate, Kirkegaard & Perry Laboratories 公司制)100 μ L,在室温静置 5 分钟后,加入 100 μ L 的 1N 硫酸停止反应,测定 450nm 的吸光度。其结果是在导入保持轻链和重链的基因的载体而成株的 CHO-K1 细胞的上清,确认 IgG 的表达。

[0259] (20) 重组抗 EP4 抗体与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验

[0260] 从(19)中建立的细胞株培养上清中,与(7)同样地精制重组抗体 NBG016-mAb14、重组抗体 NBG016-mAb21。通过(6)所述的方法利用流式细胞仪实施得到的精制重组抗 EP4 抗体与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验。精制重组抗 EP4 抗体或小鼠同型对照抗体每 5×10^5 个细胞使用 1 μ g。二次抗体使用 PE 标记抗小鼠 IgG 抗体。

[0261] 图 11 示出其结果。将母株 Flp-In-CHO 细胞以涂成灰色的直方图表示,将人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株以黑的实线表示。重组抗体 NBG016-mAb14、重组抗体 NBG016-mAb21 都仅与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株结合,所以可确认精制重组抗 EP4 抗体对人 EP4 保持结合性。

[0262] (21) 小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 表达载体的制作

[0263] (7)中精制的 NBG016-mAb21 的子类为 IgG2a。因此,将 NBG016-mAb21 的子类改变为 IgG1,制成小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21。小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 基因利用 Overlapping PCR 法如下所述地制作。将 NBG016-mAb21 的重链基因作为模板,使用 5'-CACT GACCCTACGCGTATGGAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3' (序列编号 37) 和 5'-GACAGATGGGGTGT CGTTTTAGCGCTAGAGA CAGTGACCAGAGTCCC-3' (序列编号 58),对 NBG016-mAb21 的可变区域基因进行 PCR 扩增。另一方面,将由产生小鼠 IgG1 的杂交瘤的 Total RNA 合成的 cDNA 作为模板,使用 5'-GGGACTCTGGTCACT GTCTCTAGCGCTAAAACGACACCCCATCTGTC-3' (序列编号 59)和 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTACCAGGAGAGTGGGAGAG-3' (序列编号 38),对从小鼠 IgG1 的 CH1 到恒定区域基因进行 PCR 扩增。将扩增得到的重链可变区域基因和 CH1-恒定区域基因片段进行混合,使用序列编号 37 和序列编号 38 的引物进行 PCR 扩增。用限制酶 MluI 和 NotI 切断扩增得到的 DNA 片段,插入到表达载体 pEHX1.1 的 MluI-NotI 位置。用限制酶 EcoRI 和 BglIII 切断得到的表达载体,插入 NBG016-mAb21 的轻链基因片段(EcoRI-BglIII 片段),制成小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 表达载体。

[0264] (22) 小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 稳定表达株制作方法

[0265] 将在含有 8mM 谷氨酸的 EX-CELL CD CHO 培养基(SAFCBioscience 公司制)中培养的浮游 CHO-K1 细胞(东洋纺织公司) (2.5×10^5 cells/ml) 分注到 24 孔板的 2 孔各 1ml。将 Opti-MEM136 μ l、Lipofectamine200015 μ l 和用限制酶 SspI 切断的小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 表达载体 4 μ g 混合,在室温放置 20 分钟后,在放入了 CHO-K1 的孔内各添加 68 μ l,在 CO₂ 恒温箱中孵育 24 小时。将 24 小时后的细胞在含有 8mM 谷氨酸的 EX-CELL CD CHO 培养基 8ml 中悬浮细胞,在 6 孔板的 2 孔中各分注 4ml。一个孔中添加 10mg/ml 的嘌呤

毒素 $3 \mu\text{l}$, 另一个孔中添加 $4 \mu\text{l}$, 每 3 天或 4 天交换培养基, 并且培养 18 天。回收增殖的孔的细胞, 以成为 5cells/ml 的方式悬浮在 Conditioned medium (每 1l 混合 EX-CELL CD CHO 培养基 700ml、浮游 CHO-KI 细胞培养上清 300ml、 10mg/ml 嘌呤霉素 1ml 或 0.75ml 的培养基), 在 96 孔板中各分注 $200 \mu\text{l}$ 。1 周后添加 Conditioned medium $100 \mu\text{l}$, 进一步培养 1 周。多次继代培养后, 在 24 孔板中加入 $500 \mu\text{l}$ 耐药性细胞 ($4 \times 10^4 \text{cells/ml}$), 培养 5 天。5 天后使用小鼠 IgG EIA Kit (Takara Bio 公司制) 定量上清中的抗体量, 筛选抗体生成细胞。将该细胞作为小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 稳定表达 CHO 细胞株。

[0266] (23) 小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 的精制

[0267] 将小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 稳定表达 CHO 细胞株在含有 8mM 谷氨酸、 $7.5 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的 EX-CELL CD CHO 培养基中培养 10 天生成抗体。从该培养上清 200mL 中与 (7) 同样地得到精制 IgG。以下, 将得到的精制 IgG 作为小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21。

[0268] (24) 小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 与人 EP4 的结合试验

[0269] 与 (9) 同样地实施小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验。将结果示于图 12(A)。将母株 Flp-In-CHO 细胞以涂成灰色的直方图表示, 将人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株以黑的实线表示。小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 仅与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株结合, 所以确认制成的小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 保持对人 EP4 的结合性。

[0270] (25) 小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 对 PGE_2 所致的 cAMP 产生的抑制试验

[0271] 与 (10) 同样地研究小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 是否抑制 PGE_2 所致的 cAMP 产生。使细胞和抗体在室温反应 15 分钟后, 以成为 $1.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的方式加入 PGE_2 , 进而在室温静置 30 分钟。cAMP 量通过使用 LANCE Ultra cAMP Kit (Perkin Elmer 公司制), 进行基于使用说明书的反应来测定。

[0272] 将其结果示于图 12(B)。即使加入小鼠同型对照抗体, 也观察不到与由 PGE_2 诱导的 cAMP 产生量相关的有意义的抑制效果, 然而加入小鼠 IgG1 型抗体 NBG016-mAb21 的情况下, 观察到抗体浓度依赖性地抑制 cAMP 产生的效果。IC₅₀ 值为 $1.1 \mu\text{g/ml}$ (约 6.9nM)。由其结果显示即使将 NBG016-mAb21 改变为小鼠 IgG1 型抗体也保持对 EP4 的拮抗剂活性。

[0273] (26) 人嵌合型抗体 NBG016-mAb14 和 21 的制作

[0274] 将 NBG016-mAb14 和 21 的 CH1 区域以下置换为人抗体基因的人嵌合型抗体使用 Mammalian PowerExpress System (东洋纺织公司制) 来生产。对 NBG016-mAb14 和 21 的重链可变区域基因, 使用 $5' \text{-CAC TGACCCTAAGCTTATGGAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3'}$ (序列编号 60) 和 $5' \text{-GGCTGTTGTGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCA GAGT-3'}$ (序列编号 61) 进行 PCR 扩增。得到的重链基因片段用限制酶 HindIII 和 NheI 切断, 插入到表达载体 pEH γ X1.1 的 HindIII-NheI 位置。另一方面, 对 NBG016-mAb14 和 21 的轻链可变区域基因, 使用 $5' \text{-ATT GCAGCCAGGAGAATTCATGGACATGAGGACCCCTGCT-3'}$ (序列编号 62) 和 $5' \text{-GGTGCAGCATCCGTACGT TTTATTTCCAACCTTTGTCCCC-3'}$ (序列编号 63) 进行 PCR 扩增。得到的轻链基因片段用限制酶 BsiWI 和 EcoRI 切断, 插入到表达载体 pEL κ X2.1 的 BsiWI-EcoRI 位置。

[0275] 用限制酶 BglIII、NotI、ScaI 切断插入了轻链基因的 pEL κ 2.1, 利用琼脂糖凝胶进行电泳, 从而精制含有轻链基因的片段。将精制的轻链基因片段组入插入了重链

基因的 pEH γ X1.1 的 BglIII-NotI 位置,制成保持轻链和重链双方的基因的质粒。使用 Lipofectamine2000 将该质粒转导到 293FT 细胞,进行瞬时的抗体表达。

[0276] 采集转导后 72 小时后的细胞培养上清,通过(6)所述的方法利用流式细胞仪实施与人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株的结合试验。作为对照,使用抗体基因未导入的 293FT 细胞的培养上清,作为二次抗体使用 PE 标记抗人 IgG 抗体(Abcam 公司制)。将结果示于图 13。将母株 Flp-In-CHO 细胞以涂成灰色的直方图表示,将人 EP4 稳定表达 CHO 细胞株以黑的实线表示。由该结果可确认,培养上清中分泌的人嵌合型抗体 NBG016-mAb14 和 21 保持对人 EP4 的结合性。

[0277] 由这些结果可显示,使用编码本发明所提供的抗体的核酸序列,能够生产出保持其功能的重组抗体(例如,嵌合抗体、人型化抗体以及人抗体等)。

[0278] 产业上的可利用性

[0279] 本发明提供的抗体特异性地抑制人 PGE₂受体亚型 EP4 的功能,所以期待提供与 EP4 相关的疾病的预防或治疗方法、或在该疾病的预防或治疗剂的开发中起到重要作用。

[0001]

IP1346947F.txt

序列表

<110> 株式会社SB健康研究所
国立大学法人熊本大学

<120> 抗hEP4 抗体

<130> TPC0033NBK

<140> JP2010-218158

<141> 2010-09-29

<160> 63

<170> Patent in version 3.1

<210> 1

<211> 435

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 1

```

atggaatgga gatgatctt tctctctc ctgtcaggaa ctacaggtgt ccactctgag      60
atccagctgc agcagctctgg accigaactg gtgaagcctg gggtttcagt gaaggtaica      120
tgcaaggctt ctggttttcc attttctacc tacaaeatat actgggtgat ccagagccat      180
ggaaagcgc ttgagtggat tggatatatt gatccitaca atggtggtac ttctacaac      240
cagaagttca gggccaagc cacaltgact gttgacaagt cctccagcac agcctacatg      300
catctcaaca gactgacttc tgaggactct gcagctctatt actgtgeaag aagatggtat      360
acttacgaag gggactggtt tcttactgg ggccaagga ctctggteac igtctctgca      420
gccaaaacaa cagcc                                435

```

<210> 2

<211> 145

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

```

Met Glu Trp Arg Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
1           5           10
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Glu Leu Val Lys
20          25          30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Pro Phe
35          40          45
Ser Thr Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Ile Gln Ser His Gly Lys Arg Leu
50          55          60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn
65          70          75          80
Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85          90          95
Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100         105         110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala

```

[0002]

IP1346947P.txt

```

115                               120                               125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr
130                               135                               140

Ala
145

<210> 3
<211> 415
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 3
atggacatga ggacccctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgcctcggtt tccaggatc      60
aaatgtgaca tcaagatgac ccagtcctca tcttccatgt atgtatctct aggagagaga      120
gtcactaica cttgcaagge gagtcaggac ailaataggi atllaaegtg gttccagcag      180
aaaccaggga aatctectaa gacctgate tatectgcaa acagatigtg agatggagtc      240
ccatcaaggt tcagtgccag tggatctggg ctagattatt ctctcaccat cagcagcctg      300
gagtatgaag atatgggaaa ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc attcaegttc      360
ggctcgggga caaagttgga aataaaaacgg gctgatgctg caccaactgt atcca      415

<210> 4
<211> 138
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4
Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp
1           5           10           15

Phe Pro Gly Ile Lys Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20          25          30

Met Tyr Val Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
35          40          45

Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50          55          60

Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val
65          70          75          80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Tyr Ser Leu Thr
85          90          95

Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln
100         105         110

Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115         120         125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
130         135

```

[0003]

IP1346947P.txt

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 5

Thr Tyr Asn Ile Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 6

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 7

Arg Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 9

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 10

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

[0004]

IP1346947P.txt

<400> 11
 atggaatgga gatggatctt tctcttctc ctgtcaggaa ctacaggtgt ceactctgag 60
 atccagctgc agcagctctgg acctgaactg gtgaagcctg gsgcttcagt gaaggtatca 120
 tgaaggctt ctggttttcc attctctacc tacaacatat actgggtgat ccagagccat 180
 ggaagagcc ttagtggtat tggatatatt gactcttaca atggtggtac ttcttaaac 240
 cagaaaitca ggggcaagge cacattgact gtgacaagt cctecagcac agectacatg 300
 catctcaaca gectgacttc tgaggactct gcagctctatt actgtgcaag aagatggtat 360
 acttacgacg gggacttggt tgettactgg ggccaaggga ctctggtcac tctctctgca 420
 gccaaaacaa cagcc 485

<210> 12
 <211> 145
 <212> PKT
 <213> 小家鼠
 <220>
 <221> 结构域
 <222> (50)..(54)
 <223> CDR1

<220>
 <221> 结构域
 <222> (69)..(85)
 <223> CDR2

<220>
 <221> 结构域
 <222> (118)..(129)
 <223> CDR3

<400> 12
 Met Glu Trp Arg Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Pro Phe
 35 40 45
 Ser Thr Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Ile Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala
 115 120 125

[0005]

IP1346947P.txt

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr
 130 135 140

Ala
 145

<210> 13
 <211> 415
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 13
 atggacatga ggaacctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgcctcgggt tccaggtatc 60
 aaatgtgaca tcaagatgac ccagttctca tcttccatgt atgtatctct aggagagaga 120
 gtcactatca cttgcaaggc gagtcaggac attaatagat atttaagctg gttccagcag 180
 aaaccaggga aatctcctaa gacctgate tategtgca acagaatggt agatggggtc 240
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg caagattatt ctctcaecat cagcagcctg 300
 gaatacgaag atatgggaaa ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc ttccacgttc 360
 ggctcgggga caaagttgca aataaaaagg gctgatgctg caccaaactg atcca 415

<210> 14
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 结构域
 <222> (46)..(56)
 <223> CDR1

<220>
 <221> 结构域
 <222> (72)..(78)
 <223> CDR2

<220>
 <221> 结构域
 <222> (111)..(119)
 <223> CDR3

<400> 14

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ile Lys Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Met Tyr Val Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
 35 40 45

Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Met Leu Asp Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr

[0006]

IP1346947P.txt

85

90

95

Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln
 100 105 110

Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 130 135

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 15

Thr Tyr Asn Ile Tyr
 1 5

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 16

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 17

Arg Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 18

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 19

Arg Ala Asn Arg Met Leu Asp
 1 5

<210> 20

[0007]

IP1346947P.txt

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 20

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 21

Met Ser Thr Pro Gly Val Asn Ser Ser Ala Ser Leu Ser Pro Asp Arg
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Pro Val Thr Ile Pro Ala Val Met Phe Ile Phe Gly Val
 20 25 30

Val Gly Asn Leu Val Ala Ile Val Val Leu Cys Lys Ser Arg Lys Glu
 35 40 45

Gln Lys Glu Thr Thr Phe Tyr Thr Leu Val Cys Gly Leu Ala Val Thr
 50 55 60

Asp Leu Leu Gly Thr Leu Leu Val Ser Pro Val Thr Ile Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

Met Lys Gly Gln Trp Pro Gly Gly Gln Pro Leu Cys Glu Tyr Ser Thr
 85 90 95

Phe Ile Leu Leu Phe Phe Ser Leu Ser Gly Leu Ser Ile Ile Cys Ala
 100 105 110

Met Ser Val Glu Arg Tyr Leu Ala Ile Asn His Ala Tyr Phe Tyr Ser
 115 120 125

His Tyr Val Asp Lys Arg Leu Ala Gly Leu Thr Leu Phe Ala Val Tyr
 130 135 140

Ala Ser Asn Val Leu Phe Cys Ala Leu Pro Asn Met Gly Leu Gly Ser
 145 150 155 160

Ser Arg Leu Gln Tyr Pro Asp Thr Trp Cys Phe Ile Asp Trp Thr Thr
 165 170 175

Asn Val Thr Ala His Ala Ala Tyr Ser Tyr Met Tyr Ala Gly Phe Ser
 180 185 190

Ser Phe Leu Ile Leu Ala Thr Val Leu Cys Asn Val Leu Val Cys Gly
 195 200 205

Ala Leu Leu Arg Met His Arg Gln Phe Met Arg Arg Thr Ser Leu Gly
 210 215 220

Thr Glu Gln His His Ala Ala Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Arg Gly
 225 230 235 240

[0008]

IP1346947P.txt

His Pro Ala Ala Ser Pro Ala Leu Pro Arg Leu Ser Asp Phe Arg Arg
 245 250 255

Arg Arg Ser Phe Arg Arg Ile Ala Gly Ala Glu Ile Gln Met Val Ile
 260 265 270

Leu Leu Ile Ala Thr Ser Leu Val Val Leu Ile Cys Ser Ile Pro Leu
 275 280 285

Val Val Arg Val Phe Val Asn Gln Leu Tyr Gln Pro Ser Leu Glu Arg
 290 295 300

Glu Val Ser Lys Asn Pro Asp Leu Gln Ala Ile Arg Ile Ala Ser Val
 305 310 315 320

Asn Pro Ile Leu Asp Pro Trp Ile Tyr Ile Leu Leu Arg Lys Thr Val
 325 330 335

Leu Ser Lys Ala Ile Glu Lys Ile Lys Cys Leu Phe Cys Arg Ile Gly
 340 345 350

Gly Ser Arg Arg Glu Arg Ser Gly Gln His Cys Ser Asp Ser Gln Arg
 355 360 365

Thr Ser Ser Ala Met Ser Gly His Ser Arg Ser Phe Ile Ser Arg Glu
 370 375 380

Leu Lys Glu Ile Ser Ser Thr Ser Gln Thr Leu Leu Pro Asp Leu Ser
 385 390 395 400

Leu Pro Asp Leu Ser Glu Asn Gly Leu Gly Gly Arg Asn Leu Leu Pro
 405 410 415

Gly Val Pro Gly Met Gly Leu Ala Gln Glu Asp Thr Thr Ser Leu Arg
 420 425 430

Thr Leu Arg Ile Ser Glu Thr Ser Asp Ser Ser Gln Gly Gln Asp Ser
 435 440 445

Glu Ser Val Leu Leu Val Asp Glu Ala Gly Gly Ser Gly Arg Ala Gly
 450 455 460

Pro Ala Pro Lys Gly Ser Ser Leu Gln Val Thr Phe Pro Ser Glu Thr
 465 470 475 480

Leu Asn Leu Ser Glu Lys Cys Ile
 485

<210> 22
 <211> 1413
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 22
 atggaatgga gatggatcct tetcttctct ctgtcaggaa etacagggtt ccactctgag 60
 atccagctgc agcagctctgg acctgaactg gtgaagcctg gggettcagt gaaggatca 120

[0009]

IP1346947P.txt

```

tgcaaggett ctggttttcc attttctacc tacaacatat actggggtgat ccagagecat 180
ggaaagcgcc ttgagtggat tggatatatt gatecittaca atgggtggtac ttcctacaac 240
cagaagtcca ggggeaagge cacatigact gttgacaagt cctccagcac agcctaacatg 300
catctcaaca gactgacttc tgaggactct gcagttctatt actgtgcaag aagatgggat 360
acttaogaag gggactgggt tgcctactgg ggccaagga ctctggtcac tgtctctgca 420
gccaaaacaa cagccccacc ggtctatcca ctggcccctg tgggtggaga tacaactgga 480
tctctcggtga ctctaggatg cctggteaag gttattttcc ctgagccagt gaccttgacc 540
tggaactctg gatecctgtc cagtggtgtg cacaccttcc cagctgtctc gcagctctgac 600
ctctacaacc tcagcagctc agtgactgta acctcgagca cctggcccag ccagctccacc 660
acctgcaatg tgcccacccc ggcaagcagc accaaggtgg acaagaaaa tgcagcccaga 720
gggcacacaa tcaagccctg tcttccatgc aaatgccag cacctaacct ctgggttggg 780
ccatcagctc tcatcttccc tccaagatc aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc 840
atagtcacat gtgtgggtgt ggatgtgagc gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg 900
tttgtgaaca actgtgaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaa 960
agtaactctc ggttggtcag tgcctccccc atccagcacc aggactggat gagtggcaag 1020
gagttcaaat gcaaggtcaa caacaagac ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca 1080
aaaccacaaag ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag 1140
atgaactaaga aacaggtcac tctgacctgc atggcacacag acttcatgcc tgaagacatt 1200
tacgtggagt ggaaccaaaa cgggaabaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc 1260
ctggactctg atggttctta cticcatgtac agcaagetga gagtggaaaa gaagaactgg 1320
gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtcccagagg gtctgcacaa tcaccacagc 1380
actaagagct tctcccaete tctgtgtaaa tga 1413

```

<210> 23
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 23

Met Glu Trp Arg Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Pro Phe
 35 40 45

Ser Thr Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Ile Gln Ser His Gly Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

[0010]

IP1346947P.txt

Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
 195 200 205
 Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg
 225 230 235 240
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 260 265 270
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 290 295 300
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
 370 375 380
 Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile

[0011]

IP1346947P.txt

Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

Tyr Asp Gln Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Gln
165 170 175

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
195 200 205

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
210 215 220

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 26
<211> 1413
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 26
atggaatgga gatgatett tctcttcctc ctgtcaggaa ctacagggtg ccactctgag 60
atccagctgc agcagctctgg acctgaactg gtgaagcctg gggcttcaag gaaggtatca 120
tgcaaggctt ctggttttcc attctctaac tacaacatat actgggtgat ccagagcoat 180
ggaaagagcc ttgagtggat tggatatatt gatecttaca atggtggtac ttccctacaac 240
cagaaatica ggggcaaggc cacattgact gttgacaagi cctccagcac agcctacatg 300
catctcaaca gcctgacttc tgaggactct gcagttctatt actgtgcaag aagatggtat 360
acttaegacg gggactgggt tgcctactgg ggccaaggga ctctggctac tgtctctgca 420
gccaaaacaa cagecccatc ggtctatcca ctggcccctg igtgiggaga tacaactggc 480
tctctgggtg ctctaggatg cctggctcaag ggttatttcc ctgagccagt gaecttgacc 540
tggaactctg gatecctgic cagtggigtg cacaccttcc cagctgtcct gcagctctgac 600
ctctaacncc tcagcagctc agtgacigta acctegagca cctggcccag ccagtcctac 660
acctgcaatg tggcccacc gccaaagcgc accaaggtgg acaagaaaat tgagcccaga 720

[0013]

IP1346947P.txt

```

gggeccacaaa teaagccctg tectccaigc aaatgccag cacctaacct ctigggtgga 780
ccatpcttet teatettecc tccaaagatc aaggatgtac teatgatete cctgagcccc 840
atagtcacat gtgtggtgtt gzatgtgagc gaggatgacc cagatgtaca gatcagetgg 900
tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac 960
agtactctcc gggtggteag tgcctccccc atccagcacc aggaactggat gagtggcaag 1020
gagttcaaat gcaaggteaa caacaaagac ctcccagegc ccatcgagag aaccatctca 1080
aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag gtatagttet tgcctccacc agaagaagag 1140
atgactaaga aacaggtcac tctgacctgc atggtaacag acitcatgac tgaagacatt 1200
tacgtggagt ggaccaacaa cgggaanaaa gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc 1260
ciggactctg atggttctta ctctcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaacigg 1320
gtggaaagaa atagetaact ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcccacacg 1380
actaagagct tctcccactc tctctgtaaa tga 1413

```

<210> 27
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 27

Met Glu Trp Arg Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Pro Phe
 35 40 45

Ser Thr Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Ile Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr
 130 135 140

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly
 145 150 155 160

Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

[0014]

IP1346947P.txt

Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
 195 200 205
 Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg
 225 230 235 240
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 260 265 270
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 290 295 300
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Met Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
 370 375 380
 Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
 385 390 395 400
 Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
 405 410 415
 Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
 450 455 460
 Ser His Ser Pro Gly Lys

[0015]

IP1346947P.txt

465 470

<210> 28
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 28
 atggacatga ggaacctgc tcagtttctt ggaattctgt tgcctctggtt tccaggtate 60
 aaatgigaca tcaagatgac ccagctctca tcttccatgt atgtatctct aggagagaga 120
 gtcactatca ctctgaagc gagtcaggac attaatagat atttaagctg gttccagcag 180
 aaaccaggga aatctcctaa gacctgata tctctgcaa acagaatgtt agatgggctc 240
 ccataaaggt tcagctgag tggatctgg caagattatt ctctaccat cagcagctg 300
 gaatacgaag atatgggaaa ttattatgt ctacagtatg atgatttcc ttccagctt 360
 ggctcgggga caaagttga aataaacgg cctgatctg caccactgt atccatctt 420
 ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt ctgacaaa 480
 ttctaccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaac acaaaatgg 540
 gtctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagat gacagcacc 600
 ctcaagttga ccaaggaca gfatgaaca cataacagct atacctgtga ggcactcac 660
 aagacatcaa ctccacctat tgtcaagagc tccaacagga atgagtgtta a 711

<210> 29
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 29

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ile Lys Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Met Tyr Val Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
 35 40 45

Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Met Leu Asp Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln
 100 105 110

Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140

[0016]

IP1346947P.txt

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
165 170 175

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
195 200 205

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
210 215 220

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 30
<211> 109
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的 DNA

<400> 30
ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggett cgaaggagat agaaccatgg agacagacac 60
actctgctga tgggtactgc tgetctgggt tccaggttcc aciggtgac 109

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的 DNA

<400> 31
gaccaggett tcttgtacaa agtggteccc 30

<210> 32
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的 DNA

<400> 32
eaccatggag acagacacac tcttctatg ggtactgetg ctctgggttc eaggttccac 60
tggtgac 67

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的 DNA

<400> 33

[0017]

	IP1346947P.txt	
aggggccagt ggatagaccg atg		23
<210> 34		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的 DNA		
<400> 34		
ggctgttgtt ttgctgcag agac		24
<210> 35		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的 DNA		
<400> 35		
actggatggt gggaagatgg atac		24
<210> 36		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的 DNA		
<400> 36		
tggatacagt tggcgcagca tcag		24
<210> 37		
<211> 43		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的 DNA		
<400> 37		
cactgaccct acgctatgg aatggagatg gatctttctc ttc		43
<210> 38		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的 DNA		
<400> 38		
ataagaatgc ggcctctat ttaccaggag agtggagag		40
<210> 39		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的 DNA		
<400> 39		
ttgcagccag gaaacgctat ggacatgagg accctctct		39

[0018]

IP1346947P.txt

<210> 40
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的 DNA

<400> 40
 ataagaatgc ggccgcttaa caatcaticc tgttgaaget 40

<210> 41
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 41
 atggctgtcc tgggtctgtt cctctgcctg gtgcatttc caagctgtgt cctgtccag 60
 gtgcagctga aggagtcagg gcttggcctg gtcgcccct cacagagcct ttcctaccat 120
 tgcactgtct ctgggttttc attaagcagc tatactatac actgggttcg ccagcctcca 180
 ggaaggggtc tggagtgct gggagtgata tgggctggig gaagcacaaa ctataattcg 240
 gctctcatgt ctagactggc catcagcaaa gacacctcca ggagccaagt ttctctaaaa 300
 gtgaacagtc tgcaaaacga tgaactagcc aatactact gtcccagaaa tgacttcggc 360
 tacgggtttg ctactgggg ccaagggact ctggtaactg tetctgcagc caaaacaaca 420
 gccaatcgg 429

<210> 42
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 42
 atgaagtgc ctgttagct gtigtgtctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagcagat 60
 gttttgatga cccaaaactc acctctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtcagag cctgttacat actaactggaa acacctatit agaatggtat 180
 ttgcagaaac cagccagtc tccaaagctc ctgacttaca aagtttcccg ccgattttct 240
 ggggtccagc acagttcag tggcactgga tcaggacag atttcacaet caggatcagc 300
 agagtggagg ctgcgatct gggaatttat tactgctttc aggttccaca tattctctct 360
 acgttcggtg ctgggaccac actggagcgg aaacgggctg atgetgacc aactgtatcc 420

<210> 43
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 43
 Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 20 25 30
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

[0019]

IP1346947P.txt

Ser Ser Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

Gln Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Leu Lys Val Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Ile Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Asp Phe Gly Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Asn Arg
 130 135 140

<210> 44
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 44

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Thr Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Ala Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Arg Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 130 135 140

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 45

Ser Tyr Thr Ile His

[0020]

IP1346947P.txt

1 5

<210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 46

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 47

Asn Asp Phe Gly Tyr Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 48

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Thr Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 49

Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 50

Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Pro Thr
 1 5

<210> 51
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的 DNA

<400> 51
 cactagagcc ccataegcg tatgctgtc ctggctgtg tcc

43

<210> 52
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

[0021]

IP1346947P.txt

<220>
 <223> 合成的 DNA

<400> 52
 ataagaatgc ggcegetcat ttaccggag agtgggagag 40

<210> 53
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的 DNA

<400> 53
 tectcagggtt gcctcaccgc tatgaagttg cctgttag 38

<210> 54
 <211> 1383
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 54
 atgggtgtcc tgggtctgtt cctctgectg gtgcatttc caagctgtgt cctgtcccag 60
 gtgcagctga aggagtcagg gccctggcctg gtggcgccct cacagagcct ttccatcact 120
 tgcactgtct ctgggttttc attaagcagc tatactatac actgggtctg ccagcctcca 180
 ggaaggggtc tggagtgctt gggagtgata tgggctggtg gaagcacaaa ctataattg 240
 gctctcatgt ctgactcgc cctcagcaaa gacacctcca ggagccaagt ttctctaaaa 300
 gtgaacagtc tcaaaactga tgaactcagc atataactact gtgccagaga tgaacteggc 360
 taegggtttg cttaactggg ccaagggaact ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca 420
 ccccactctg tetatccact ggcacctgga tctgtgccc aaactaacte eatggtgacc 480
 ctgggatgcc tggtaaggc ctatttccct gagccagtga cagtgaactg gaactctgga 540
 tccctgtcca ggggtgtgca caccttccca gctgtctctg agtctgaact ctacactctg 600
 agcagctcag tgaactgccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt 660
 gccaccctgg ccnccagcac caaggtggac aagaaaattg tgcctcngga ttgigtgtgt 720
 aagccttgcg tatgtacagt cccagaagta tcatctgtct tcatcttccc cccaaaagccc 780
 aaggatgtgc taccatllac tctgacctct aaggtaacgt gtgtgtgtgt agacatcagc 840
 aaggatgata ccgaggtcca gttcagctgg ttgttagatg atgtggaggt gcacacagct 900
 cagaagcaac cccgggagga gcagttcaac agcactttcc gctcagtcag tgaacttccc 960
 atcatgcacc aggactggct caatggcaag gacttcaaat gcagggtcaa cagtgcagct 1020
 ttccctgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaag gcagaccgaa ggctccacag 1080
 gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag atggccaagg ataaagtcag tctgacctgc 1140
 atgataacag acttcttccc tgaagacatt actgtggagt ggcagtggaa tgggcagcca 1200
 geggagaact acaagaacac tccagccatc atggacaacg atggctctta ctctgtctac 1260
 agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg gaggcaggaa ataactttcac ctgctctgtg 1320
 ttacatgagg gccctgcaca ccaccatact gagaagagcc tctcccaete tccgggtaaa 1380
 tga 1383

<210> 55

[0022]

IP1346947P.txt

<211> 717
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 55
 atgaagttgc ctgcttagget gttggtgctg atgtttctgga ttcctgettc cagcagegat 60
 gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacat actactggaa acacctatft agaatggtat 180
 ttgcagaaac cagccagtc tccaaagctc ctgatctaca aaatttcccg ccgattttct 240
 gsggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caggatcage 300
 agagtggagg ctgcggatct gggaatttat tactgttttc agsgttcaca tattctctct 360
 acgttcggtg ctgggaccac actggagcgg aaacgggctg atgtctcaac auctgtaicc 420
 aicctccac cctccagtga gcagtaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgctctctg 480
 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
 aatggctcc tgaacagttg gactgtatcag gacagcaaaag acagenccta cagcatgagc 600
 agcacctca ngttgaccac ggaacagtat gaacgacata acagctatac ctgtgagccc 660
 actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttaa 717

<210> 56
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 56

Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Ser Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Leu Lys Val Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Ile Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Phe Gly Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 130 135 140

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 145 150 155 160

[0023]

IP1346947P.txt

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 210 215 220

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 225 230 235 240

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 275 280 285

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 290 295 300

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 305 310 315 320

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 325 330 335

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 340 345 350

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 355 360 365

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
 370 375 380

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 385 390 395 400

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 405 410 415

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 420 425 430

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 435 440 445

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

[0024]

IP1346947P.txt

<220>
 <223> 合成的 DNA

 <400> 58
 gacagatggg ggtgctggtt tagcgetaga gacagtgacc agagtcce 48

 <210> 59
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的 DNA

 <400> 59
 ggactctgg tcactgtctc tagcgetaaa acgacacccc catctgtc 48

 <210> 60
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的 DNA

 <400> 60
 cactgacct aagcttatgg aatggagatg gatctttctc ttc 43

 <210> 61
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的 DNA

 <400> 61
 ggctgttgct ctagctgcag agacagtgac cagagt 36

 <210> 62
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的 DNA

 <400> 62
 attgcagcca ggagaattca tggacatgag gaccctgct 40

 <210> 63
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的 DNA

 <400> 63
 ggtgcagcat cegtacgttt tatttccaac tttgccc 39

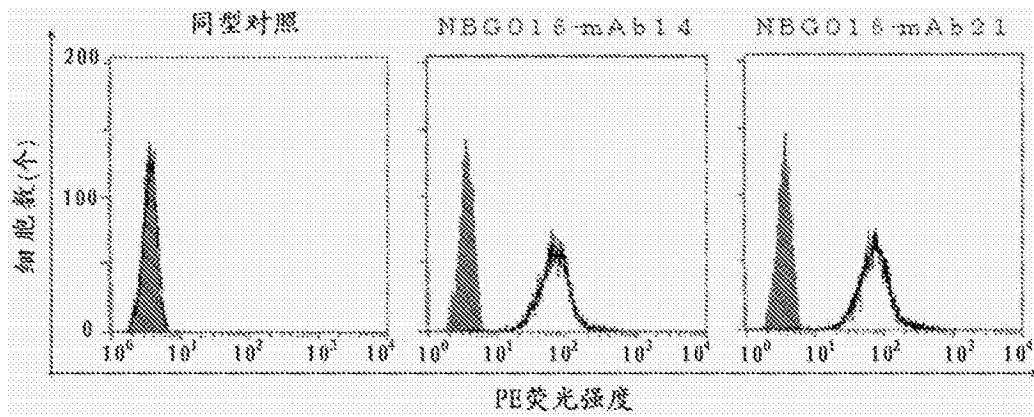


图 1

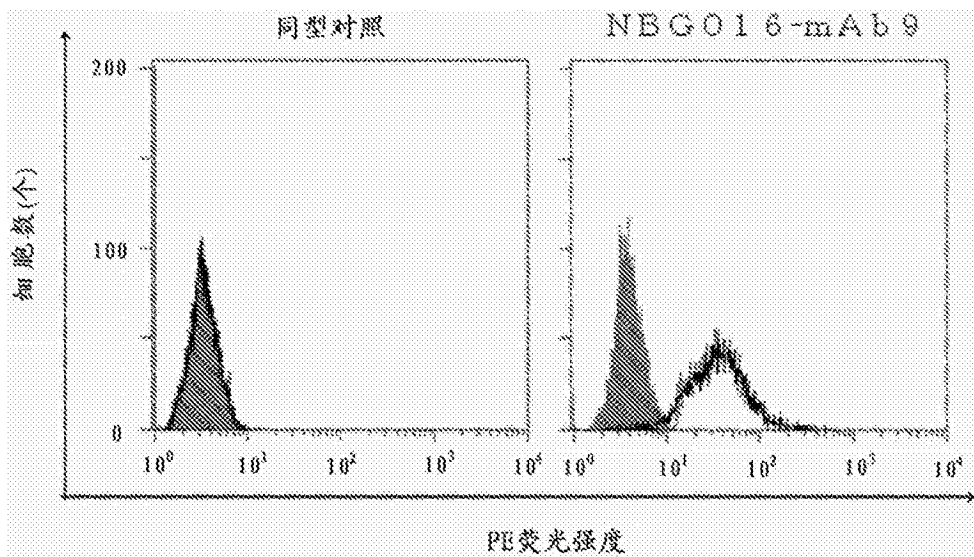


图 2

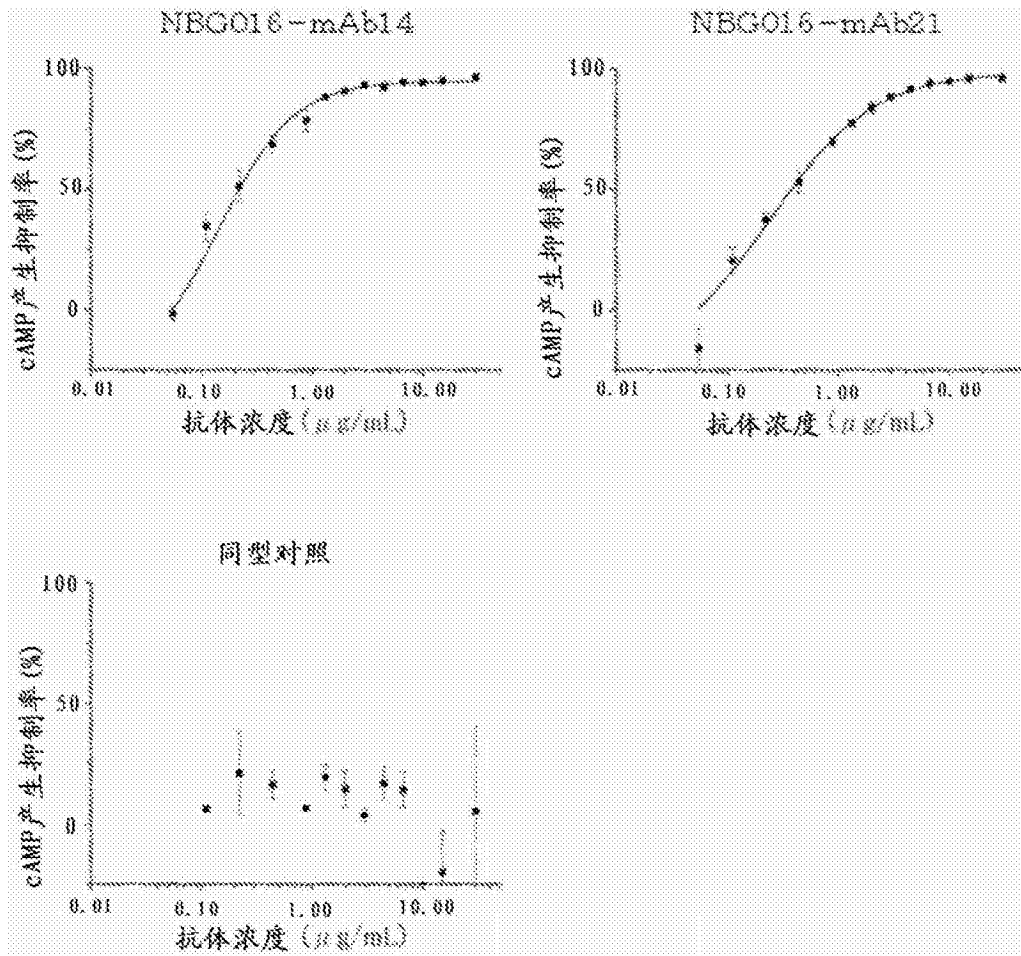


图 3

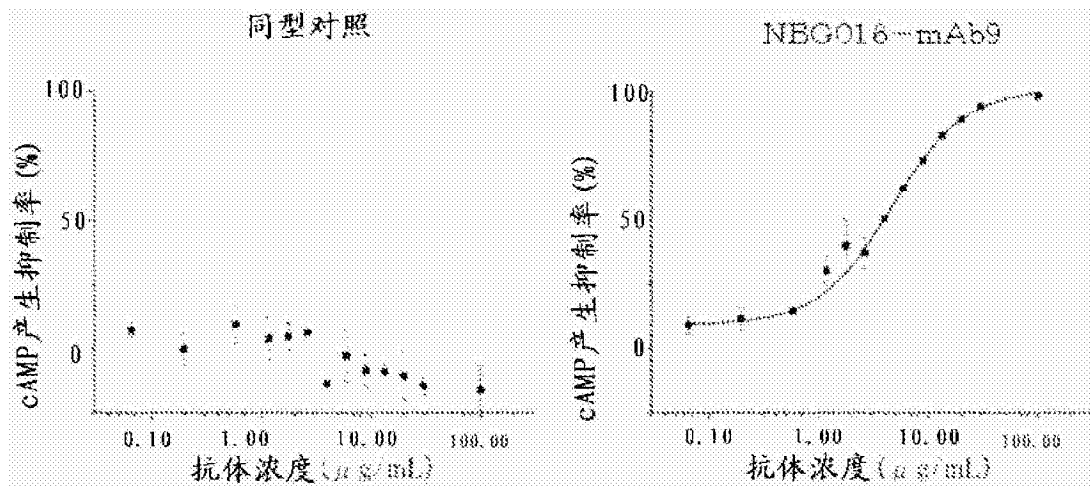


图 4

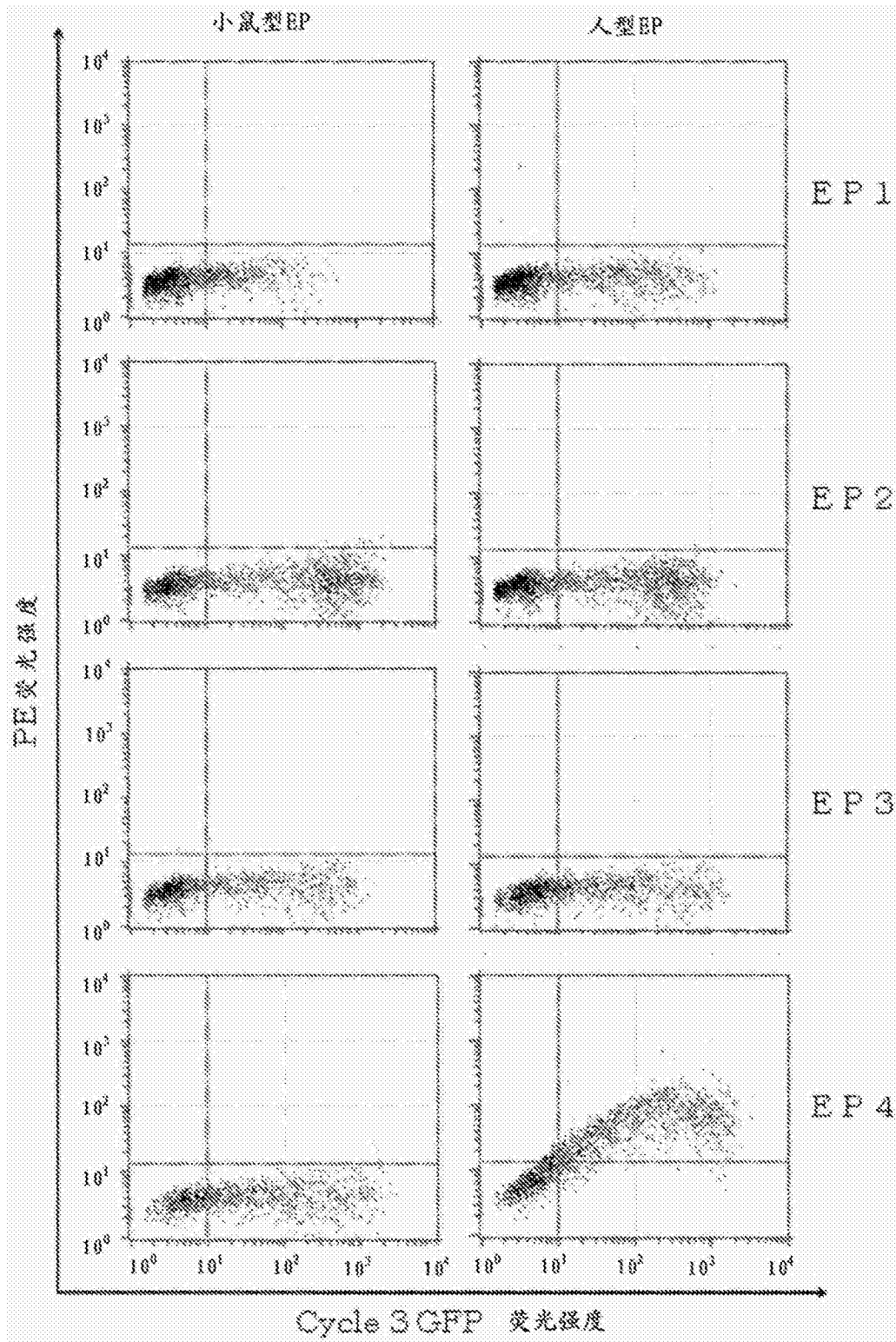


图 5

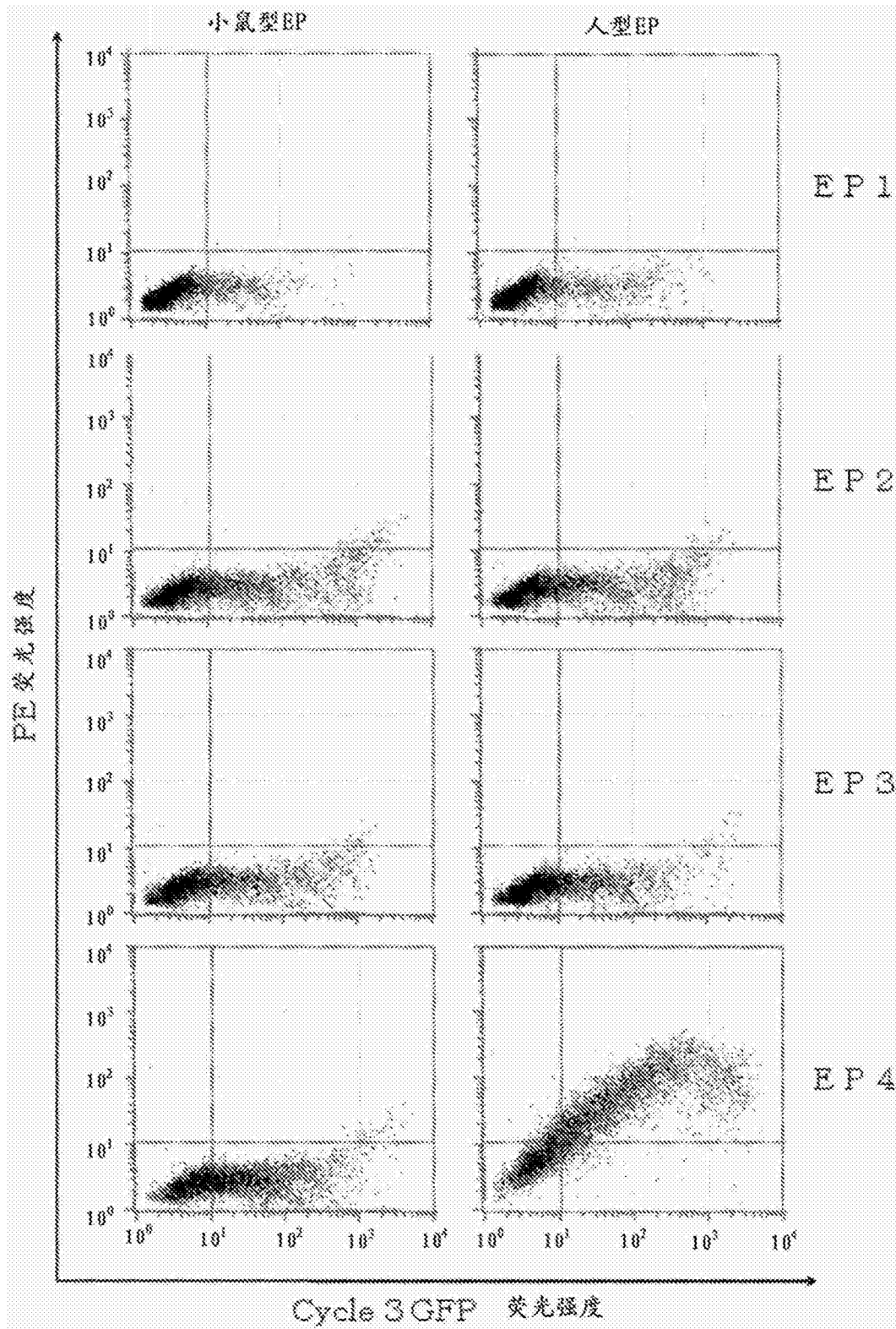


图 6

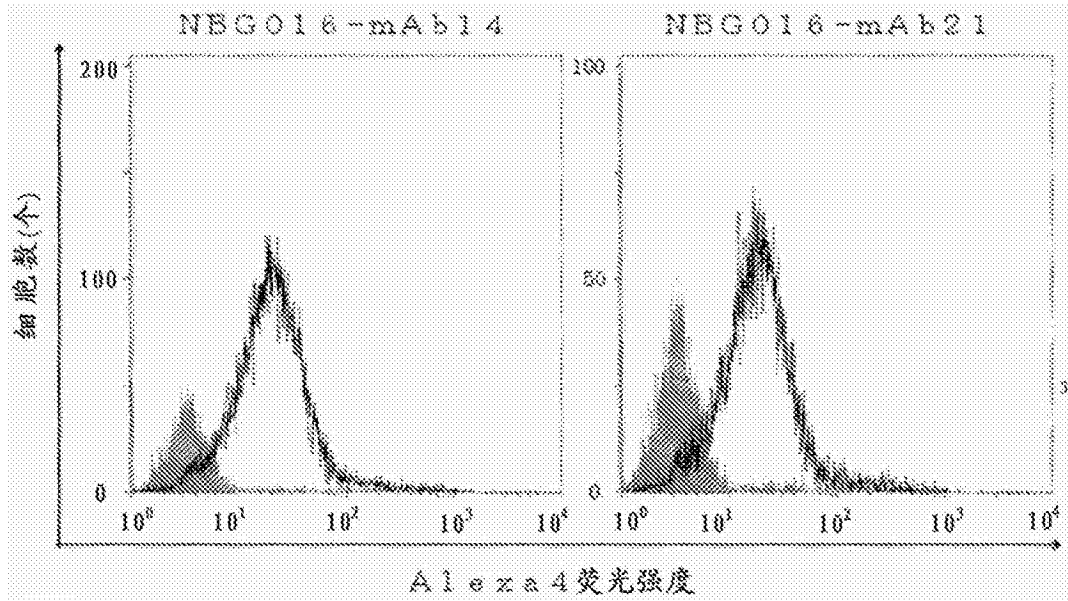


图 7

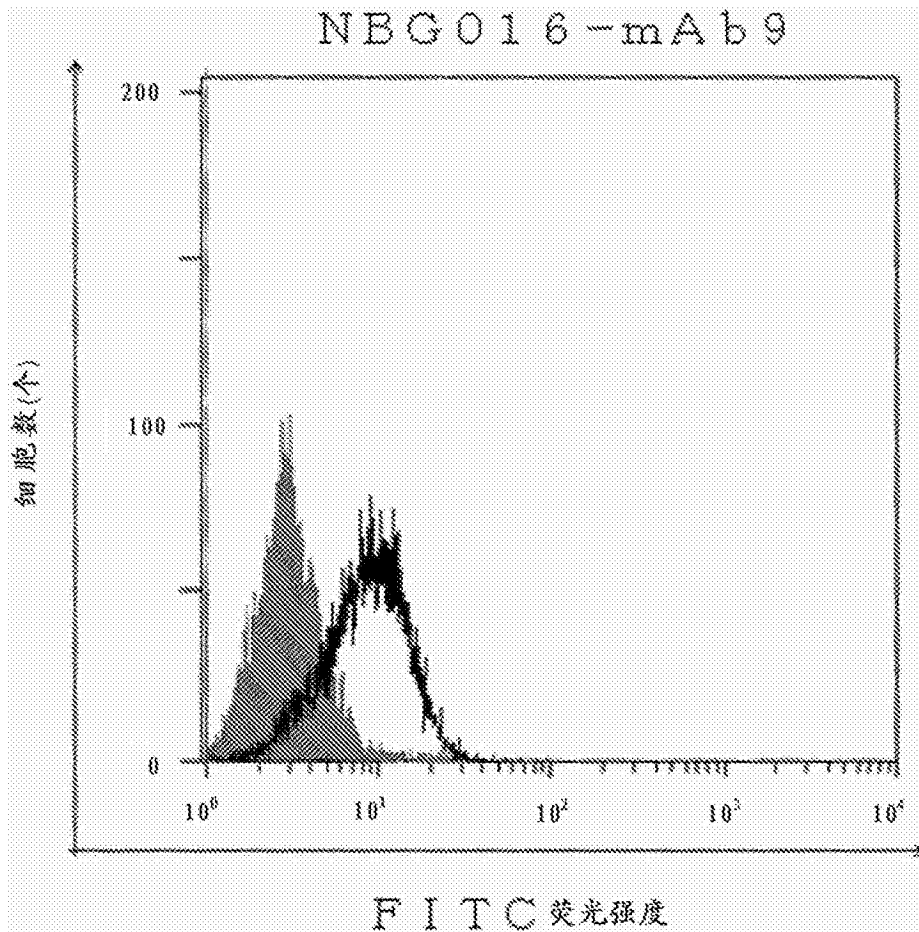


图 8

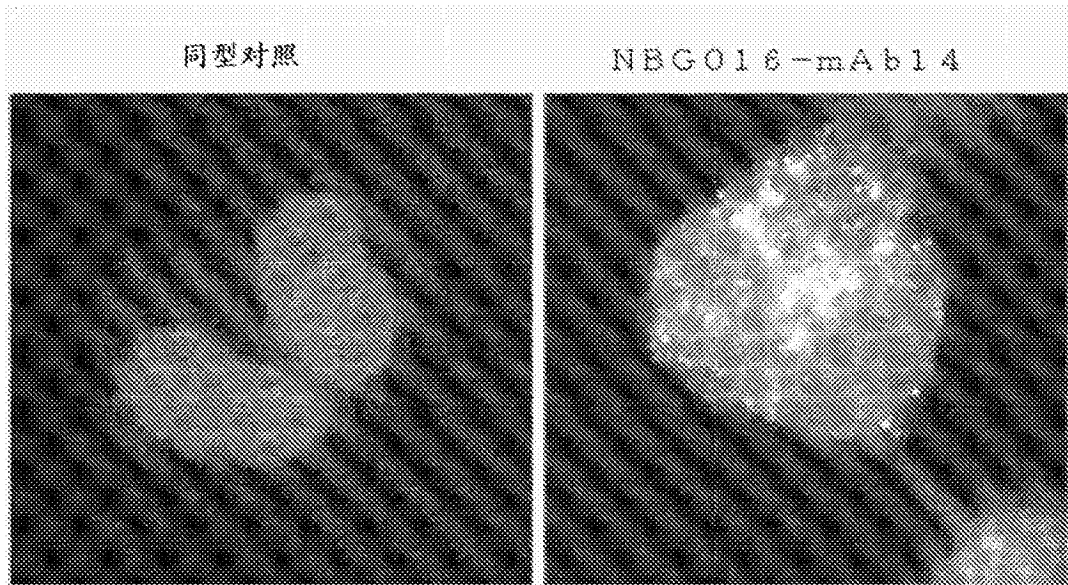


图 9

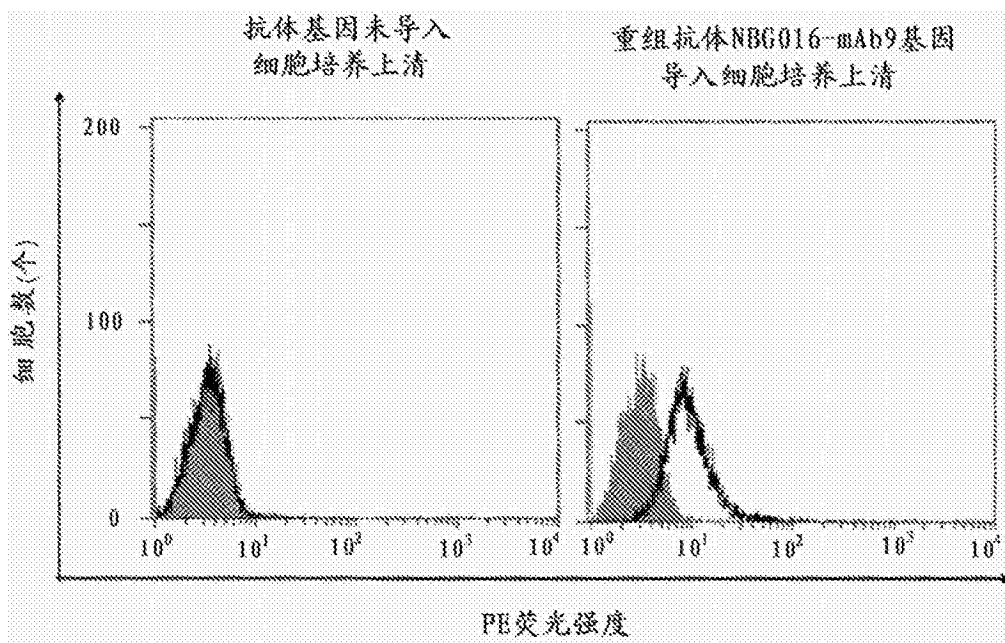


图 10

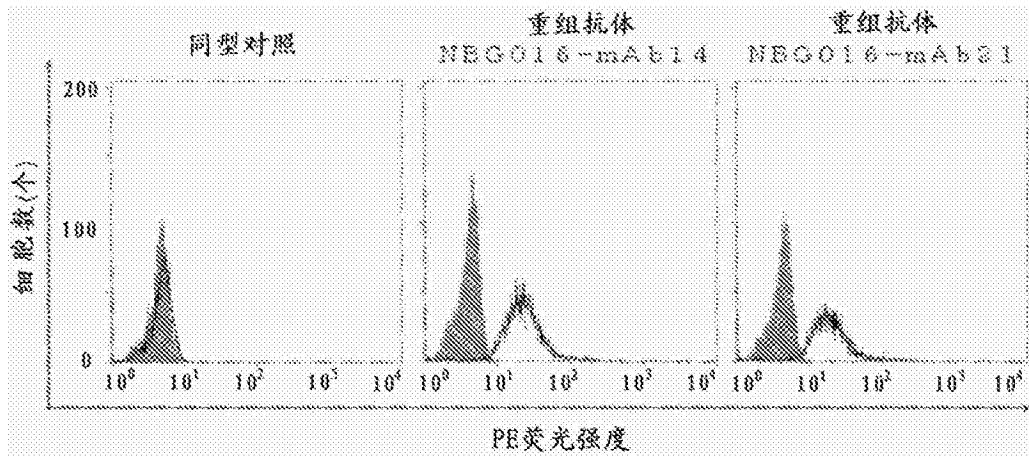


图 11

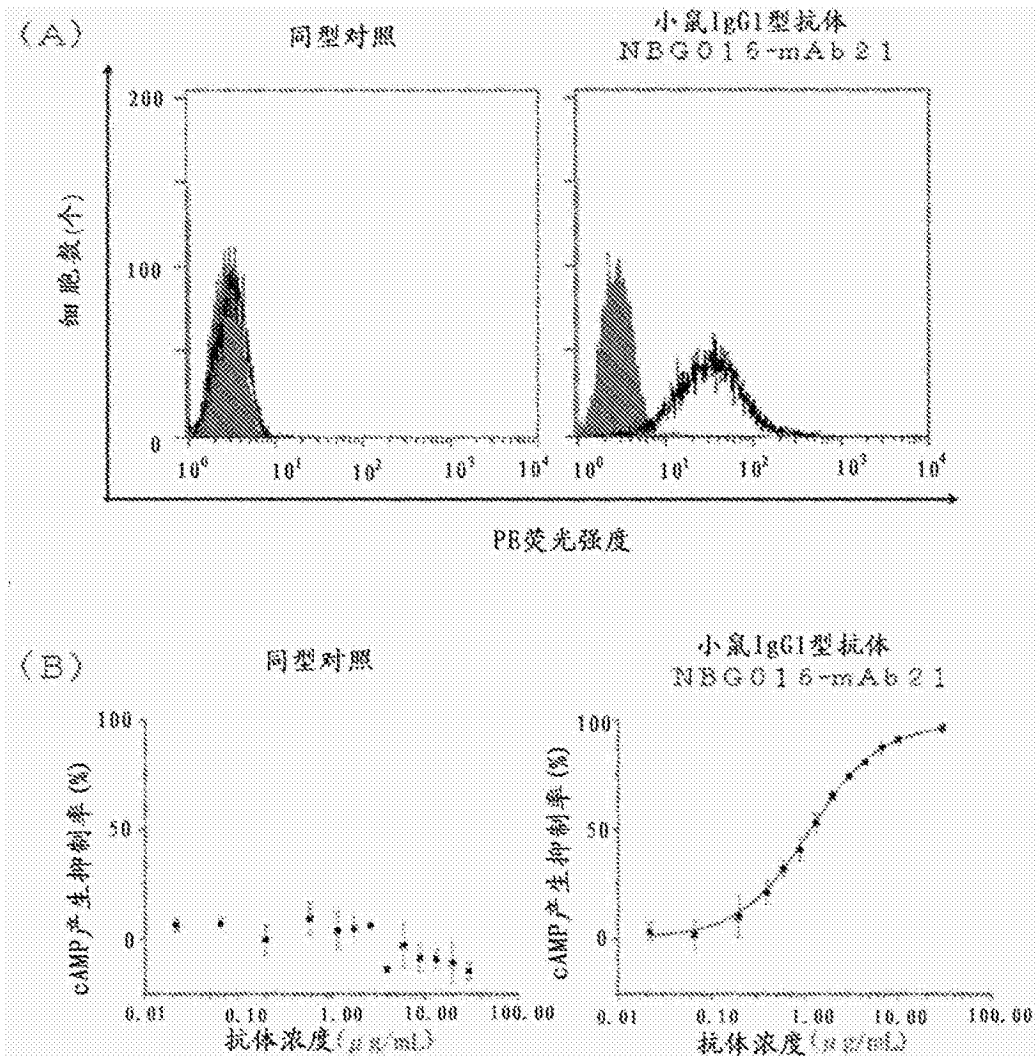


图 12

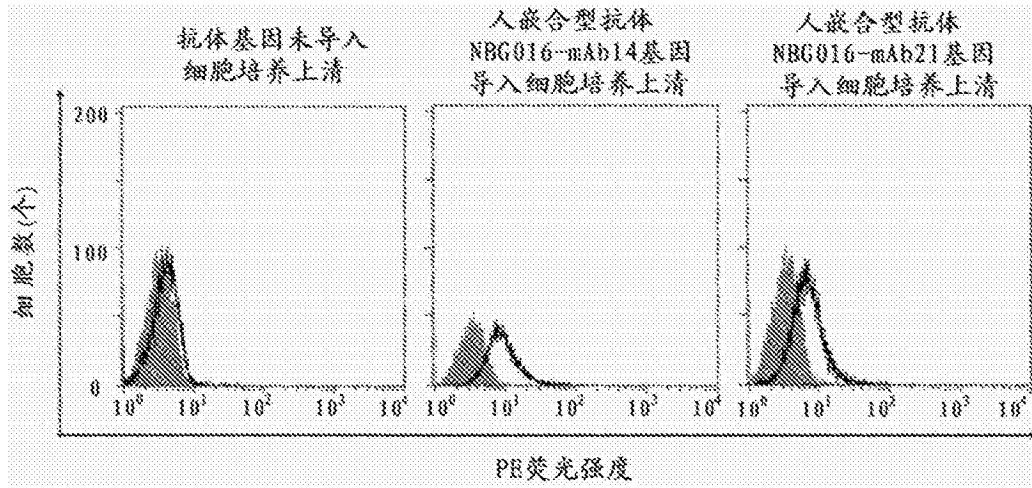


图 13

专利名称(译)	针对人前列腺素E2受体EP4的抗体		
公开(公告)号	CN103459595B	公开(公告)日	2016-04-13
申请号	CN201180046998.3	申请日	2011-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社NB健康研究所 国立大学法人熊本		
申请(专利权)人(译)	株式会社NB健康研究所 国立大学法人熊本大学		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社NB健康研究所		
[标]发明人	高山喜好 清水朋子 漆畑祐司 杉本幸彦		
发明人	高山喜好 清水朋子 漆畑祐司 杉本幸彦		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/28 C07K17/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/2869 C07K17/00 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/624 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K2317/24 C07K2317/76 G01N33/88 A61K38/17 A61K38/18 A61K39/395 A61K48/00 C07K14/435 C07K14/475 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/28 C07K19/00		
代理人(译)	苗堃		
审查员(译)	郝佳		
优先权	2010218158 2010-09-29 JP		
其他公开文献	CN103459595A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供与人PGE2受体亚型EP4结合来抑制EP4的功能的抗体或其功能片段。另外，目的在于提供包含该抗体或其功能片段的医药。使小鼠对人PGE2受体亚型EP4免疫，筛选出抑制EP4所致的细胞内cAMP上升的单克隆抗体。另外，对取得的单克隆抗体的CDR进行序列测定。

LPS	PGE ₂	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF α 浓度 \pm SD (pg/mL)	恢复率 \pm SD (%)
-	-	-	177.1	
+	-	-	550.0 \pm 21.8	
+	+	-	286.1 \pm 16.7	
+	+	NBG016-mAb14	423.4 \pm 33.9	52.0 \pm 12.9
+	+	NBG016-mAb21	469.1 \pm 48.1	69.3 \pm 18.2
+	+	同型对照	275.9 \pm 11.1	-3.9 \pm 4.2