

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/043634

発行日 平成26年2月24日(2014.2.24)

(43) 国際公開日 平成24年4月5日(2012.4.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C O 7 K 17/00 (2006.01)	C O 7 K 17/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 48 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2012-536508 (P2012-536508)	(71) 出願人 507420835 株式会社エヌビー健康研究所 北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目2
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/072190	
(22) 国際出願日 平成23年9月28日(2011.9.28)	
(11) 特許番号 特許第5273689号 (P5273689)	(71) 出願人 504159235 国立大学法人 熊本大学 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号
(45) 特許公報発行日 平成25年8月28日(2013.8.28)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-218158 (P2010-218158)	(74) 代理人 100137512 弁理士 奥原 康司
(32) 優先日 平成22年9月29日(2010.9.29)	(72) 発明者 ▲高▼山 喜好 北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目2 株式会社エヌビー健康研究所
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトプロスタグランジンE₂受容体EP₄に対する抗体

(57) 【要約】

本発明は、ヒトPGE₂受容体サブタイプEP₄に結合し、EP₄の機能を阻害する抗体又はその機能的断片の提供を目的とする。さらに、該抗体又はその機能的断片を含む医薬の提供を目的とする。ヒトPGE₂受容体サブタイプEP₄をマウスに免疫し、EP₄による細胞内cAMP上昇を抑制するモノクローナル抗体をスクリーニングした。また、取得したモノクローナル抗体のCDRの配列決定を行った。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 の細胞外ドメインに結合し、EP4 の機能を阻害する抗体又はその機能的断片。

【請求項 2】

前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 3】

前記抗体が国際寄託受託番号 FERM BP - 11402 (NBG016 - mAb14)、受託番号 FERM BP - 11403 (NBG016 - mAb21) のハイブリドーマから産生されることを特徴とする請求項 2 に記載の抗体又はその機能的断片。

10

【請求項 4】

前記 EP4 の機能が、細胞内 cAMP 濃度を上昇させることである、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 5】

EP4 の細胞外ドメインに特異的に結合し、その相補性決定領域 1 ~ 3 (CDR1 ~ 3) のアミノ酸配列について、下記 (A)、(B) 又は (C) のいずれかを満たすことを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

(A) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、及び
配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する、

20

(B) 配列番号 15 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 16 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 17 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 18 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 19 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、及び
配列番号 20 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

30

(C) 配列番号 45 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 46 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 47 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 48 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 49 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、及び
配列番号 50 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

【請求項 6】

EP4 の細胞外ドメインに特異的に結合し、その重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列について、下記 (a)、(b) 又は (c) のいずれかを満たすことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

40

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、

(b) 配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 14 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。

(c) 配列番号 43 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 44 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。

【請求項 7】

EP4 の細胞外ドメインに結合し、EP4 の機能を阻害する抗体又はその機能的断片であって、請求項 3 乃至 6 のいずれかに記載の抗体と同一のエピトープに結合する、抗体又はその機能的断片。

50

【請求項 8】

ヒト化抗体又はキメラ抗体であることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 9】

ヒト抗体であることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 10】

抗体断片、一本鎖抗体、又はダイアボディであることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 11】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 41、配列番号 42 であらわされる請求項 5 又は 6 に記載の抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードする核酸。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のベクターが導入された細胞。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を含む医薬組成物。

【請求項 15】

EP4 の機能異常によって発症及び/又は進展する疾患の予防あるいは治療に用いられる、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

治療対象疾患が、免疫疾患であることを特徴とする請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

治療対象疾患が、腫瘍であることを特徴とする請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

治療対象疾患が、疼痛であることを特徴とする請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の抗 EP4 抗体又はその機能的断片が担体に固定化されてなる抗体固定化担体。

【請求項 20】

EP4 発現細胞を含む血液を接触させて、前記体液から EP4 発現細胞を除去するために用いられることを特徴とする請求項 19 に記載の抗体固定化担体。

【請求項 21】

請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の抗 EP4 抗体を含む細胞表面上の EP4 発現量を測定するキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトプロスタグランジン E₂ 受容体サブタイプ EP4 に対するモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

プロスタグランジン (PG) は、トロンボキサンと共にプロスタノイドと称される生理活性物質で、プロスタノ酸骨格を持つ脂質である。プロスタグランジンなどのプロスタノイドは、ホスホリパーゼ A₂ により膜リン脂質から遊離されるアラキドン酸から生合成される。プロスタグランジンは、その 5 員環に付く酸素原子と二重結合の相違により、A~J の各群に区別される。また、プロスタノ酸骨格側鎖の二重結合の数によって、1~3 群に区別される。例えば、プロスタグランジン E (PGE) には、プロスタノ酸骨格側鎖に

10

20

30

40

50

存在する二重結合の数が相違する、 PGE_1 、 PGE_2 、 PGE_3 の各群が存在する。

PGは、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼI (COX-I)あるいはシクロオキシゲナーゼII (COX-II)により生合成される PGG_2 から PGH_2 が生じ、その後、酸素原子間の結合の切断の相違により、 PGD_2 、 PGE_2 、 PGF_2 などが生じる。さらに、 PGE_2 からは、 PGA_2 、 PGC_2 などが生産されていく。各PGの生成反応は、特異的な酵素の作用によって生じており、これらの酵素には組織特異性が存在し、各組織の機能に応じたPGを産生しているものと考えられている。

【0003】

PGの中でもPGEは、様々な重要な生物活性を担っているとされており、その特異的受容体を介して血管拡張、血圧降下、子宮収縮の他、免疫系の調節などに関与していると考えられている。 PGE_2 の受容体は、他のPG受容体と同様に、7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体である。 PGE_2 受容体は、EPと略称され、4種類のサブタイプ(EP1、EP2、EP3、EP4)の存在が明らかにされている。各サブタイプは生体内において、EP1が細胞内 Ca^{2+} の上昇、EP2及びEP4がcAMPの上昇、EP3がcAMPの減少に関与している(非特許文献1)。4種類のサブタイプは、タンパク質構造上高い相同性を有している。

10

【0004】

EP4に選択性の高い低分子化合物アンタゴニストを、実験的自己免疫性脳脊髄炎あるいは接触過敏症を誘導したマウスに投与すると、所属リンパ節内のTH1及びTH17細胞の両方の蓄積が減少し、疾患の進行が抑制されることが報告された(非特許文献2)。樹状細胞においては、 PGE_2 はEP4の活性化を介したcAMPの上昇によりIL-23の産生を亢進させることが示されている。また、TH17細胞においては、 PGE_2 はIL-23と協調してTH17細胞の増殖にかかわることが示されている。TH17細胞においても、EP4の活性化を介したcAMP上昇が細胞内情報伝達に重要な役割を果たしていることが示されている(非特許文献3)。このような報告から、 PGE_2 受容体、特にEP4選択的アンタゴニストが、TH1あるいはTH17が関与する免疫異常に起因する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患及び接触性皮膚炎などの治療に効果的であることが示唆されている(非特許文献2)。

20

【0005】

多くの癌細胞が正常細胞と比較してCOX-IIを過剰発現していることが報告されている。さらに PGE_2 が癌組織あるいは周辺組織に対して作用し、癌の進行に関与することが示されている。例えば、 PGE_2 は難治性の炎症性乳癌細胞あるいは肺癌細胞の転移組織への浸潤に関わることが示されている(非特許文献4、5)。また PGE_2 はEP4を介して非小細胞肺癌細胞、大腸癌細胞、炎症性乳癌細胞、Bリンパ球、前立腺癌細胞、黒色腫の増殖に関与することが知られている。

30

NK細胞は、直接癌細胞を攻撃する作用を有するが、 PGE_2 はその作用を阻害することが知られている。 PGE_2 のNK細胞活性阻害の機構としては、EP4の活性化を介した細胞内のcAMP上昇が示されている(非特許文献6)。さらに、癌免疫を抑制すると考えられているTreg細胞がEP4を介して活性化することが知られており、癌細胞に対する生体内の免疫機構を低下させる可能性が示されている(非特許文献7)。このような報告から、 PGE_2 が癌の進展に重要であることが明らかである。そこで PGE_2 の産生にかかわるCOXの、非選択的阻害剤による臨床研究が試みられているが、副作用により十分な治療成績をあげることができていない。 PGE_2 受容体、特にEP4選択的アンタゴニストが直接的に癌細胞の増殖を抑制し、かつ自己の癌免疫機構を賦活化させることができることから、EP4受容体に選択的に結合する抗体は、様々な癌、例えば、乳癌、大腸癌、肺癌、前立腺癌、皮膚癌、Bリンパ腫の治療に効果的であることが期待される。

40

【0006】

従来より、非特異的なCOX阻害剤は疼痛の軽減に応用されている。しかしながら非特異的阻害剤については胸やけ、消化不良、吐き気、腹部膨満、下痢、胃痛、消化性潰瘍、消化管出血といった副作用を発生することが知られている。近年、COX II選択的阻

50

害剤（例えばセレコキシブ、ロフェコキシブ）が疼痛治療を目的として開発された。しかしCOX II選択的阻害剤は特定の患者において重篤な心血管系障害を発症させる可能性が示唆されており、異なる作用機序で疼痛を軽減する薬剤が望まれている。COXにより産生されるPGのうち、PGE₂は痛覚の過敏性を増強させることが知られている。特に、PGE₂受容体の中でEP₄が痛覚の過敏性の増強に関わることが複数の動物試験で証明されている。例えばラット脊髄後根神経節（DRG）では、炎症性疼痛モデルにおいてEP₄の発現が増強し、EP₄の比較的選択的アンタゴニスト（AH23848）が同モデルでの疼痛の感受性を軽減することが知られている（非特許文献8）。また、EP₄のノックアウトマウスを用いた解析でも同様の結果が得られている（非特許文献9）。このような報告から、EP₄の機能を選択的に遮断する医薬品は免疫異常を伴う疾患、癌、疼痛治療に有効で、かつ副作用が少ないものとなりうることを示唆される。

10

EP₄の機能を選択的に遮断する方法としては、低分子化合物によるアンタゴニストが複数報告されているが、医薬品として開発に成功しているものはない。低分子化合物のアンタゴニストは、PGE₂受容体サブタイプ（EP₁～4）に対する結合選択性やトロンボキサンあるいはその他のプロスタノイド受容体への結合親和性の軽減といった改良の余地がある。十分な受容体選択性がなければCOX阻害剤同様の副作用が発生する懸念がある。

EP₄受容体を選択的に結合する抗体は、低分子化合物と比較して受容体選択性が高いことが期待される。さらに抗体医薬は、低分子化合物と比べて一般的に血中半減期が長いいため、一回の投与で長期に薬効を保持することが期待され、慢性疾患（例えば関節リウマチ、大腸炎、癌など）においては有用である。

20

【0007】

膜タンパク質（受容体）に対する抗体医薬の主要な作用機序は、当該タンパク質を発現する細胞を抗体が認識した後、補体依存性細胞溶解作用（CDC）および抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用（ADCC）に基づき除去するものが一般的であった。しかしながら、CDCやADCCはマクロファージ等の炎症細胞の活性化を伴い、免疫異常に起因する疾患や疼痛治療には必ずしも適切とはいえない。したがって、EP₄を選択的に阻害するモノクローナル抗体を免疫異常に起因する疾患や疼痛治療に応用する場合には、CDCやADCCによらない機能性抗体が望ましい。すなわち、EP₄依存的細胞内情報伝達を選択的に遮断する抗体が望ましい。

30

【0008】

これまで特許第3118460号（特許文献1）においてEP₄に対する抗体の取得法に関する記載があるが、低用量でEP₄特異的にその機能を抑制しかつ、EP₁、EP₂、EP₃には結合しない具体的な抗体の報告はいまだにない。また、特許第3118460号に記載されている一般的なモノクローナル抗体の取得法では、7回膜貫通型受容体に対する機能性抗体を取得することは一般的に困難であることが知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特許第3118460号

40

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Sugimotoら、J. Biol. Chem., 282, 11613 - 11617 2007

【非特許文献2】Yaoら、Nat. Med., 15, 633 - 640 2009

【非特許文献3】Sakataら、J. Pharmacol. Sci., 112(1):1?5. 2010

【非特許文献4】Robertson FM Cancer. 2010 Jun 1;116(11 Suppl):2806 - 14.

【非特許文献5】Martinet L. Biochem Pharmacol. 2010

50

Sep 15; 80(6):838-45.

【非特許文献6】Sharma SD, Mol Cancer Ther. 2010 Mar; 9(3):569-80.

【非特許文献7】Sharma S. Cancer Res. 2005 Jun 15; 65(12):5211-20

【非特許文献8】Lin C.-R. J Pharmacology and Experimental Therapeutics 2006 319:3 (1096-1103)

【非特許文献9】Popp L. European Journal of Pain. 2009 13:7 (691-703)

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、免疫異常に起因する疾患、腫瘍、疼痛の治療薬として有用なヒトPGE₂受容体のEP4サブタイプに対する抗体と当該抗ヒトEP4抗体を含む医薬組成物等の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、ヒトPGE₂受容体のEP4サブタイプに対するモノクローナル抗体の作製を試みたところ、EP4サブタイプの細胞外ドメインに特異的に結合し、かつEP4の機能（例えば、細胞内cAMP濃度を上昇させる機能）を抑制する抗体の取得に成功し、本発明を完成させた。

20

すなわち、本発明は以下の(1)~(21)である。

(1) PGE₂受容体サブタイプEP4の細胞外ドメインに結合し、EP4の機能を阻害する抗体又はその機能的断片。

(2) 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする上記(1)に記載の抗体又はその機能的断片。

(3) 上記抗体が国際寄託受託番号FERM BP-11402、受託番号FERM BP-11403のハイブリドーマから産生されることを特徴とする上記(2)に記載の抗体又はその機能的断片。

(4) 上記EP4の機能が、細胞内cAMP濃度を上昇させることである、上記(1)乃至(3)のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

30

(5) EP4の細胞外ドメインに特異的に結合し、その相補性決定領域1~3(CDR1~3)のアミノ酸配列について、下記(A)、(B)又は(C)のいずれかを満たすことを特徴とする上記(1)乃至(3)のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

(A) 配列番号5で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、

配列番号6で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、

配列番号7で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、

配列番号8で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号9で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び

配列番号10で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する、

40

(B) 配列番号15で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、

配列番号16で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、

配列番号17で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、

配列番号18で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号19で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び

配列番号20で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。

(C) 配列番号45で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、

配列番号46で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、

配列番号47で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、

配列番号48で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

50

配列番号 49 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、及び配列番号 50 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

(6) EP4 の細胞外ドメインに特異的に結合し、その重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列について、下記 (a)、(b) 又は (c) のいずれかを満たすことを特徴とする上記 (1) 乃至 (5) のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、

(b) 配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 14 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。

(c) 配列番号 43 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 44 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。

(7) EP4 の細胞外ドメインに結合し、EP4 の機能を阻害する抗体又はその機能的断片であって、上記 (3) 乃至 (6) のいずれかに記載の抗体と同一のエピトープに結合する、抗体又はその機能的断片。

(8) ヒト抗体又はキメラ抗体であることを特徴とする上記 (1) 乃至 (7) のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

(9) ヒト抗体であることを特徴とする上記 (1) 乃至 (7) のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

(10) 抗体断片、一本鎖抗体、又はダイアボディであることを特徴とする上記 (1) 乃至 (9) のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

(11) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 41、配列番号 42 であらわされる上記 (5) 又は (6) に記載の抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードする核酸。

(12) 上記 (11) に記載の核酸を含むベクター。

(13) 上記 (12) に記載のベクターが導入された細胞。

(14) 上記 (1) 乃至 (10) のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を含む医薬組成物。

(15) EP4 の機能異常によって発症及び / 又は進展する疾患の予防または治療に用いられる (14) に記載の医薬組成物。

(16) 治療対象疾患が、免疫疾患であることを特徴とする上記 (15) に記載の医薬組成物。

(17) 治療対象疾患が、腫瘍であることを特徴とする上記 (15) に記載の医薬組成物。

(18) 治療対象疾患が、疼痛であることを特徴とする上記 (15) に記載の医薬組成物。

(19) 上記 (1) 乃至 (10) のいずれかに記載の抗 EP4 抗体又はその機能的断片が担体に固定化されてなる抗体固定化担体。

(20) EP4 発現細胞を含む血液を接触させて、前記体液から EP4 発現細胞を除去するために用いられることを特徴とする上記 (19) に記載の抗体固定化担体。

(21) 上記 (1) 乃至 (10) のいずれかに記載の抗 EP4 抗体を含む細胞表面上の EP4 発現量を測定するキット。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、EP4 特異的にその機能を抑制する抗体が初めて提供される。

【0014】

本発明により、EP4 に関連する本発明の医薬は EP4 に関連する免疫疾患、腫瘍および疼痛の治療又は予防が可能となる。特に、低分子化合物に比べ、EP4 サブタイプに対して結合選択性の高い本発明の抗体を使用することで、副作用などの少ない治療効果を提供することができる。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明の抗体固定化担体により、癌、自己免疫疾患などを罹患している患者の血液から、EP4発現細胞を選択的に除去することが出来る。

【0016】

本発明のEP4発現量を測定キットにより、癌、自己免疫疾患などを罹患している患者の血液からEP4発現細胞を検出し、疾病の状態を評価することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、親株 Flp - In - CHO細胞並びにヒトEP4 安定発現CHO細胞株に対する、マウスアイソタイプコントロール抗体並びにNBG016 - mAb14 , NBG016 - mAb21の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

10

【図2】図2は、親株 Flp - In - CHO細胞並びにヒトEP4 安定発現CHO細胞株に対する、マウスアイソタイプコントロール抗体並びにNBG016 - mAb9の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

【図3】図3は、PGE₂誘発のcAMP上昇に対するマウスアイソタイプコントロール抗体並びにNBG016 - mAb14 , NBG016 - mAb21による抑制効果を解析した結果である。

【図4】図4は、PGE₂誘発のcAMP上昇に対するマウスアイソタイプコントロール抗体並びにNBG016 - mAb9による抑制効果を解析した結果である。

【図5】図5は、ヒトEP1~4、マウスEP1~4 遺伝子導入293FT細胞に対するNBG016 - mAb14の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

20

【図6】図6は、ヒトEP1~4、マウスEP1~4 遺伝子導入293FT細胞に対するNBG016 - mAb9の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

【図7】図7は、ヒト末梢血液のリンパ球分画に対するマウスアイソタイプコントロール抗体並びにNBG016 - mAb14 , NBG016 - mAb21の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

【図8】図8は、ヒト末梢血液のリンパ球分画に対するマウスアイソタイプコントロール抗体並びにNBG016 - mAb9の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

【図9】図9は、ヒト単球系THP1細胞株をPMAで処理後、抗EP4抗体で免疫染色した結果である。

30

【図10】図10は、親株 Flp - In - CHO細胞並びにヒトEP4 安定発現CHO細胞株に対する、抗体遺伝子未導入細胞の培養上清並びにリコンビナント抗体NBG016 - mAb9 遺伝子発現細胞の培養上清の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

【図11】図11は、親株 Flp - In - CHO細胞並びにヒトEP4 安定発現CHO細胞株に対する、マウスアイソタイプコントロール抗体並びにリコンビナント抗体NBG016 - mAb14、リコンビナント抗体NBG016 - mAb21の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

【図12】図12(A)は、親株 Flp - In - CHO細胞並びにヒトEP4 安定発現CHO細胞株に対する、マウスアイソタイプコントロール抗体並びにマウスIgG1型抗体NBG016 - mAb21の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。また図12(B)は、PGE₂誘発のcAMP上昇に対するマウスアイソタイプコントロール抗体並びにマウスIgG1型抗体NBG016 - mAb21による抑制効果を解析した結果である。

40

【図13】図13は、親株 Flp - In - CHO細胞並びにヒトEP4 安定発現CHO細胞株に対する、抗体遺伝子未導入細胞の培養上清並びにヒトキメラ型抗体NBG016 - mAb14 遺伝子発現細胞の培養上清、ヒトキメラ型抗体NBG016 - mAb21 遺伝子発現細胞の培養上清の結合を解析したフローサイトメトリーの結果である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

50

本発明は、ヒト PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 の細胞外ドメインに結合し、EP4 の機能を抑制する抗体又はその機能的断片、及び、これらの抗体又はその機能的断片を含む医薬である。

【0019】

EP4 タンパク質の定義

本発明の抗原となる EP4 タンパク質としては、EP4 タンパク質をコードする cDNA などから調製された組換えタンパク質などを使用することができる。あるいは、EP4 を細胞表面に発現する適当な細胞などを抗原として使用してもよい。ヒト EP4 タンパク質をコードする核酸配列は、GenBank などの公開されたデータベースなどから検索できる（例えば、アクセッション番号：NM_000958）。この遺伝子配列などに基づいて作製したプローブ又は PCR 増幅用のプライマーペアなどを使用して、適当な DNA ライブラリーから EP4 をコードする DNA（cDNA など）を調製することができる。あるいは人工 DNA 合成法で、全 cDNA を調整することができる。その一例として、配列番号 21 にヒト EP4 に対応するアミノ酸配列を示す。ヒト EP4 には、配列番号 21 に示すもの以外にアミノ酸置換体等の各種のバリエーションが知られている。本発明における「ヒト EP4」には、EP4 としての機能を有する限り、前記バリエーションが含まれる。

ヒト EP4 の細胞内および細胞外ドメインは、配列番号 21 に示すアミノ酸配列における以下の部分に相当すると考えられている。左側がアミノ酸番号、右側が各ドメインである。なお各ドメイン間の境界については、多少の前後（1～5 アミノ酸残基、好ましくは、1～3 アミノ酸残基、より好ましくは 1～2 アミノ酸残基）が生じ得る。

【0020】

- 1 ~ 19 : N 末端ドメイン
- 44 ~ 54 : 細胞内第 1 ループドメイン
- 80 ~ 96 : 細胞外第 1 ループドメイン
- 116 ~ 135 : 細胞内第 2 ループドメイン
- 161 ~ 184 : 細胞外第 2 ループドメイン
- 212 ~ 267 : 細胞内第 3 ループドメイン
- 296 ~ 312 : 細胞外第 3 ループドメイン
- 333 ~ 488 : C 末端ドメイン

【0021】

抗体又は機能性抗体の定義

本発明の EP4 の機能を抑制する抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体などが含まれ、該抗体の機能的断片には、Fab または F(ab')₂ などの抗体断片、又は、単一鎖抗体などが含まれ、抗体の一部をなすポリペプチド（あるいは、ポリペプチド複合体）、であって EP4 の機能を抑制するものであれば、如何なるものも本発明の範囲に含まれる。

【0022】

EP4 に対する特異的機能性抗体の定義と評価方法

EP4 の機能としては、例えば、細胞内における cAMP の上昇、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の活性化などの機能を挙げることができる。これらの細胞内の変化が癌細胞の増殖、Tリンパ球の細胞増殖、サイトカイン産生を制御することが知られている。本発明の抗体がヒト PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 の細胞外ドメインに特異的に結合することは次のように示すことができる。ヒト EP4 タンパク質をコードする核酸配列を発現ベクターに挿入し、ベクターを適当な宿主細胞（例えば、CHO 細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入する。非破壊状態のアミノ酸の挿入、欠失、置換等を有しない EP4 発現宿主細胞又は EP4 非発現宿主細胞と、本発明の抗体とを接触させ一定時間反応させる。過剰な抗体を洗浄後、細胞を ELISA 法、RIA 法あるいはフローサイトメトリー法で細胞に結合している抗体量を測定する。非発現宿主細胞と比較して EP4 発現宿主細胞に本発明の抗体がより多く結合することで EP4 の細胞外ドメインへの結合を示すことができる。さらに、ヒト又はマウス由来 E

10

20

30

40

50

P 1、E P 2、E P 3もしくはE P 4タンパク質をコードする核酸配列を挿入した発現ベクターを構築し、上述と同様に受容体発現宿主細胞を解析する。本発明の抗体はヒトE P 4発現宿主細胞への結合がその他の受容体細胞発現細胞と比較して多い、好ましくは、ヒトE P 4以外の受容体発現細胞への結合が認められないことを示すことができる。

【0023】

本発明の抗体が、E P 4の機能を阻害する抗体であることは次のように示すことができる。ヒトE P 4タンパク質をコードする核酸配列を発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入する。ヒトE P 4発現宿主細胞と抗体を $0.01 \sim 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ で接触させたのちPGE₂を $10^{-12} \sim 10^{-6}$ Mの濃度でさらに接触させる。その後、細胞内のcAMPの上昇を適切な方法で測定する。本発明の抗体を添加した場合は、用量依存的にPGE₂により誘発されたcAMPの上昇を抑制することができる。

また、ヒトE P 4を天然に発現している細胞株（例えばヒトマクロファージ細胞）に抗体を $0.01 \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ で接触させたのちPGE₂を $10^{-12} \sim 10^{-6}$ Mの濃度でさらに接触させる。その後炎症刺激（例えばリポポリサッカライド（LPS））時のサイトカインやケモカイン産生を調べる。PGE₂は、LPS刺激によるサイトカイン産生をE P 4あるいはE P 2を介して抑制することが知られている。本発明の抗体は、E P 4を介したPGE₂によるサイトカイン産生抑制を回復することを指標にE P 4の機能阻害を評価することができる。同様に、ヒト末梢血樹状細胞からのPGE₂によるIL-23産生増強作用の阻害効果を指標に本抗体のE P 4機能阻害を評価することができる。

さらに、ヒト膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部癌、皮膚癌、肺癌、口腔癌、前立腺癌、また多発性骨髄腫に由来する癌細胞株（例えば、MDA-MB-231細胞、HCA-7細胞あるいはHT-29細胞など）をPGE₂と接触させることで細胞の増殖性が高まる。これらの細胞に本発明の抗体をあらかじめ接触させたのち、PGE₂による細胞の増殖性の増加が低減することを指標に機能阻害を評価することができる。

【0024】

本発明の抗体は、ヒトE P 4のみに結合し、マウスE P 4には反応しない。したがって動物試験による免疫異常や疼痛に関する薬効の評価は困難である。一方、抗腫瘍効果については、上記のヒト癌組織から樹立されたE P 4を高発現している細胞を、免疫不全マウスに一匹あたり $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞数で接種する。接種直後より本発明の抗体 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg}/\text{匹}$ をマウスに腹腔内あるいは皮下投与する。アイソタイプコントロール抗体投与群と比較して本発明の抗体投与群が有意に腫瘍形成、転移頻度を軽減することで抗腫瘍効果を示すことができる。

【0025】

本発明の抗体の詳細な定義

本発明の抗体及びその機能的断片の例として、例えば、国際寄託における受託番号FERM BP-11402 (NBG016-mAb14)、FERM BP-11403 (NBG016-mAb21)のハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体の他、後述の実施例に示される方法で調製されるモノクローナル抗体が挙げられる。

さらに、本発明の抗体及びその機能的断片として、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号4で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体、配列番号12で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号14で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体、配列番号43で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号44で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体、配列番号23で表されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号25で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号29で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、配列番号56で表されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号57で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、及びこれらの抗体の機能的断片、並びに、これらの抗体を構成する重鎖及び/又は軽鎖の各アミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加

されたアミノ酸配列を有する重鎖及び/又は軽鎖からなる抗体、及びこれらの抗体の機能的断片であって、EP4の機能を抑制するものを挙げることができる。

【0026】

本発明の抗体と同一のエプトープの定義

さらに本発明の抗体及びその機能的断片としては、実施例において単離されたいずれかのモノクローナル抗体とエプトープが重複する(または同一の)抗体が特に好ましい。このような抗体を、本発明においては実質的に同じ部位に結合する抗体と呼ぶ。2つの抗体が抗原蛋白質と実質的に同じ部位に結合するかどうかは、例えば競合実験により決定することができる。具体的には、実施例の抗EP4抗体とEP4との結合が、第二の抗EP4抗体によって競合阻害を受けるとき、第一の抗体と第二の抗体は実質的に同じ抗原部位に結合していると判断される。このように、実施例で単離した抗体のEP4結合部位と実質的に同じ部位に結合する抗体であって、EP4の機能を阻害する作用を有する抗体は本発明に含まれる。

10

【0027】

本発明の抗体の取得方法

本発明の抗EP4抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはそれら機能的断片であってもよい。医薬組成物として均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。「モノクローナル」というのは、実質的に均一な抗体の集団より得られた抗体の特性を示唆するものであって、抗体が特定の方法により製造されることを限定するものではない。例えば、本発明において用いられるモノクローナル抗体を、例えばハイブリドーマ法(Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975))、又は、組換え方法(米国特許第4,816,567号)により製造してもよい。本発明において使用するモノクローナル抗体は、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい(Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991))。本発明におけるモノクローナル抗体には、特に、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラス由来であり、鎖の残りの部分が別の種、又は別の抗体クラス若しくはサブクラス由来である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、抗体変異体、並びにその機能的断片が含まれる(米国特許第4,816,567号; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984))。

20

30

【0028】

本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合、例えば、哺乳類宿主動物に対して、免疫原及びアジュバントの混合物をインジェクトすることにより調製することができる。通常は、免疫原としての抗原及び/又はアジュバントを宿主動物の皮下又は腹腔内へ複数回インジェクトする。アジュバントの例には、完全フロイト及びモノホスホリル脂質A合成-トレハロースジコリノミコレート(MPL-TDM)が含まれる。免疫原処理の後、血中に産生されたEP4に対する抗体を、EP4結合特異性及び、EP4の機能抑制作用などを指標にして、所望の抗体を取得することができる。

【0029】

また、本発明の抗体がモノクローナル抗体の場合、例えば、ハイブリドーマ法を用いて調製することができる。

40

この方法には以下に示す4つの工程が含まれる:(i)宿主動物又は、宿主動物由来にヒトEP4タンパク質を免疫する、(ii)モノクローナル抗体分泌性(又は潜在的に分泌性)のリンパ球を回収する、(iii)リンパ球を不死化細胞に融合させる、(iv)所望のモノクローナル抗体を分泌する細胞を選択する。マウス、ラット、モルモット、ハムスター、又は他の適当な宿主動物が、免疫動物として選択され免疫原がインジェクトされる。

免疫後、宿主動物から得られたリンパ球はハイブリドーマ細胞を樹立するために、ポリエチレングリコールなどの融合剤を用いて不死化細胞株と融合する。融合細胞としては、

50

例えば、ラットもしくはマウスのミエローマ細胞株が使用される。細胞融合を行った後、融合しなかったリンパ球及び不死化細胞株の成長又は生存を阻害する一又は複数の基質を含む適切な培地中で細胞を生育させる。通常の技術では、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPR T）を欠く親細胞を使用する。この場合、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンがHGPRT欠損細胞の成長を阻害し、ハイブリドーマの成長を許容する培地（HAT培地）に添加される。このようにして得られたハイブリドーマから、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマが生育する培地から、常法に従い、目的のモノクローナル抗体を取得することができる。

このようにして調製したハイブリドーマをインビトロ培養し、あるいは、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどの腹水中でインビボ培養し、目的の抗体を培養上清、あるいは、腹水から調製することができる。

【0030】

本発明の核酸は、本発明の抗体における重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードするものである。本発明の核酸である重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードする核酸をベクターに挿入し、これを細胞内で発現させてもよい。

ベクターの種類としては特に限定はなく、その後に導入される宿主細胞の種類等によって適宜選択すればよい。これらを抗体として発現させるために適当な宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し、組換え型の抗体を調製することもできる。

【0031】

本発明のキメラ抗体の定義と生産方法

本発明の抗EP4抗体の実施形態には、遺伝子組換え抗体が含まれる。遺伝子組換え抗体としては、特に限定はされないが、例えば、キメラ抗体、ヒト型化抗体及びヒト抗体等が挙げられる。ここで、キメラ抗体とは、異なる動物種由来の可変領域と定常領域を連結した抗体、特に、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に連結した抗体であり（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81, 6851-6855, (1984)等を参照）、キメラを作製する場合、そのように連結した抗体が得られるよう、当業者に周知の遺伝子組換え技術によって容易に構築できる。ここで、マウス由来抗体の可変領域として、重鎖可変領域は、例えば、配列番号2又は配列番号12で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましく、軽鎖可変領域は、例えば、配列番号4又は配列番号14で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。本発明のキメラ重鎖又はキメラ軽鎖をベクターに挿入する。ベクターの種類としては特に限定はなく、その後に導入される宿主細胞の種類等によって適宜選択すればよい。これらを抗体として発現させるために適当な宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し、組換え型の抗体を調製することもできる。

【0032】

本発明のヒト型抗体の定義と生産方法

本発明のキメラ抗体には、ヒト（型）化抗体が含まれる。ヒト型化抗体は、フレームワーク領域はヒト由来で、CDRはマウス由来の領域からなる抗体のことである。ヒト型化抗体は、まず、マウス抗体の可変領域からそのCDRをヒト可変領域に移植し、重鎖及び軽鎖可変領域を再構成した後、これらヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結することで作製することができる。このようなヒト型化抗体の作製法は、当分野において周知である（例えば、Nature, 321, 522-525 (1986); J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989)等を参照）。ここで、本発明の抗EP4抗体に使用されるマウス由来CDR配列としては、限定はされないが、例えば、重鎖CDR1~3として配列番号5~7に示されるアミノ酸配列が、軽鎖CDR1~3として配列番号8~10に示されるアミノ酸配列あるいは軽鎖CDR1~3として配列番号18~20に示されるアミノ酸配列が挙げら

10

20

30

40

50

れる。

ヒト型化抗体重鎖又はヒト型化抗体軽鎖を宿主細胞内において発現させるために、ヒト型化抗体重鎖又はヒト型化抗体軽鎖をベクターに挿入してもよい。ベクターの種類としては特に限定はなく、その後導入される宿主細胞の種類等によって適宜選択することができる。これらを抗体として発現させるために適当な宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し、宿主細胞内で抗体を再構築させて、組換え型の抗体を調製することもできる。

【0033】

本発明のヒト抗体の定義と生産方法

ヒト抗体（完全ヒト抗体）とは、可変領域の抗原結合部位である超過変領域（Hyper Variable region）、可変領域のその他の部分及び定常領域の構造が、ヒトの抗体と同じ構造を有するものである。ただし、超可変部位は他の動物由来であってもよい。ヒト抗体は、公知の技術により当業者であれば容易に作製することができる。ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体の重鎖及び軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（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等を参照）や、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法（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等を参照）により取得することができる。

【0034】

本発明の抗体の機能的断片

本発明の抗体の機能的断片としては、抗EP4抗体の一部分の領域を意味し、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv (variable fragment of antibody)、一本鎖抗体（重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域等）、scFv、diabody (scFv二量体)、dsFv (ジスルフィド安定化可変領域)、並びに、CDRを少なくとも一部に含むペプチド等が挙げられる。Fabは、抗体分子をタンパク質分解酵素パインで処理して得られる断片のうち、重鎖のN末端側約半分と軽鎖全体とがジスルフィド結合で結合した、抗原結合活性を有する抗体断片である。

Fabの作製は、抗体分子をパインで処理して断片を取得する他、例えば、FabをコードするDNAを挿入した適当な発現ベクターを構築し、これを適当な宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入後、細胞内でFabを発現させることで実施することができる。

また、F(ab')₂は、抗体分子をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、抗原結合活性を有する抗体断片である。F(ab')₂は、抗体分子ペプシンで処理して断片を取得する他、後述するFabをチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させて作製することも可能で、さらに、Fabと同様に遺伝子工学的手法によっても作製することができる。

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した、抗原結

10

20

30

40

50

合活性を有する抗体断片である。F a b ' も、F a b 等と同様に遺伝子工学的な手法により作製することができる。

【0035】

s c F v は、1本の重鎖可変領域(VH)と1本の軽鎖可変領域(VL)とを適当なペプチドリンカーを用いて連結した、VH-リンカー-VLないしはVL-リンカー-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。s c F v は、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするcDNAを取得し、遺伝子工学的な手法により作製することができる。

d i a b o d y は、s c F v が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一抗原結合活性であっても、又は、一方を異なる抗原結合活性であってもよい。d i a b o d y は、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするcDNAを取得し、重鎖可変領域と軽鎖可変領域をペプチドリンカーで結合したs c F v を発現するcDNAを構築して、遺伝子工学的な手法により作製することができる。

d s F v は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は、R e i t e r らにより示された方法などにより、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。d s F v は、抗体の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするcDNAを取得し、d s F v をコードするDNAを構築して遺伝子工学的な手法により作製することができる。

C D Rを含むペプチドは、重鎖又は軽鎖のC D R (C D R 1 ~ 3) の少なくとも1領域以上を含むように構成される。複数のC D Rを含むペプチドは、直接又は適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。C D Rを含むペプチドは、抗体の重鎖又は軽鎖のC D RをコードするDNAを構築し、発現ベクターに挿入する。ベクターの種類としては特に限定はなく、その後導入される宿主細胞の種類等によって適宜選択すればよい。これらを抗体として発現させるために適当な宿主細胞(例えば、C H O細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など)に導入し製造することができる。また、C D Rを含むペプチドは、F m o c法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)及びt B o c法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によって製造することもできる。

【0036】

本発明の抗体の精製

本発明の抗体の精製方法としては特に限定はなく、公知の手法を採用することができる。例えば、前記ハイブリドーマ又は前記組換え細胞の培養上清を回収し、各種クロマトグラフィー、塩析、透析、膜分離等の公知の手法を組み合わせ、本発明の抗体を精製することができる。抗体のアイソタイプがI g Gである場合には、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって簡便に精製することもできる。

【0037】

本発明の抗体を含む医薬

本発明の抗体又はその機能的断片は、これらを有効成分とした医薬として使用することができる。このような本発明の医薬は、E P 4に関連する免疫疾患、腫瘍および疼痛の治療又は予防のために使用することができる。

【0038】

E P 4に関連する免疫疾患とは例えば乾癬；多発性硬化症；関節リウマチ；全身性エリテマトーデス；クローン病等の炎症性腸疾患；I型糖尿病とその合併症(例えば糖尿病性網膜症、糖尿病性細小血管症、糖尿病性腎障害、黄斑変性等)；多発性筋炎；シェーグレン症候群；喘息アトピー性皮膚炎及び接触性皮膚炎；免疫不全疾患；臓器移植等を指す。

【0039】

本発明の医薬は、疼痛すなわち侵害受容性疼痛及び神経障害性疼痛の治療又は予防のために使用することができる。侵害受容性疼痛とは例えば、体性及び内臓性の侵害受容器の活性化に起因する疼痛、例えば関節における病的変形及び慢性関節痛(例えば関節リウマ

10

20

30

40

50

チを含む関節炎、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、骨関節炎、痛風性関節炎及び若年性関節炎等) (疾患の緩和と関節構造維持を含む) ; 腰痛および頸部痛 ; 筋骨格痛 ; 筋炎 ; 骨折 ; 捻挫、挫傷 ; 線維筋痛症に付随する疼痛 ; 腫瘍及び腫瘍治療に関連する疼痛 ; インフルエンザ又は他のウイルス感染症 (感冒等) に付随する疼痛 ; リウマチ熱 ; 内臓痛 ; 機能性の腸疾患 (例えば過敏性腸症候群、非心臓性胸痛、非潰瘍性消化不良等) に付随する疼痛 ; 心筋虚血に付随する疼痛 ; 歯痛 ; 術後および歯科処置後の疼痛 ; 産後痛 ; 一次性頭痛 (例えば片頭痛、緊張型頭痛、群発頭痛とその他の一次性頭痛) ; 二次性頭痛 (例えば頭頸部外傷による頭痛、頭頸部血管障害による頭痛、非血管性頭蓋内疾患による頭痛、薬物乱用等物質又はその離脱による頭痛、感染症による頭痛、ホメオスターシスの障害による頭痛、頭蓋骨、頸、眼、耳、鼻、副鼻腔、歯、口あるいはその他の顔面・頭蓋の構成組織の障害に起因する頭痛あるいは顔面痛薬物誘発性頭痛及び片頭痛に付随する疼痛等) 等を指す。

10

神経障害性疼痛とは例えば物理的外傷や切断 ; 幻肢痛 ; 慢性炎症症状に起因する疼痛 ; 帯状疱疹後神経痛 ; 糖尿病性神経障害 ; 非特異的腰痛 ; 背部痛 ; 坐骨神経痛 ; 腫瘍とその治療に関連する神経障害 ; HIV関連神経障害 ; 手根管症候群 ; 慢性アルコール中毒 ; 甲状腺機能低下症 ; 三叉神経痛 ; 三叉神経・自律神経性頭痛 ; 尿毒症 ; ビタミン欠乏症 ; 多発性硬化症 ; 線維筋痛症 ; 毒素等に付随する疼痛等を指す。

【0040】

本発明の医薬は、腫瘍の治療又は予防に有用である。腫瘍の治療とは、腫瘍の成長、散開、転移の全面又は部分的阻止又は腫瘍細胞の全面又は部分的駆除のみならず、腫瘍に付随する症状 (疼痛、食欲不振、体重減少等) の部分的または全面的解消を含む。

20

腫瘍の治療又は予防としては、良性の腫瘍の異常増殖およびポリープ、悪性の腫瘍の異常増殖およびポリープ、新生物を対象とする。

良性の腫瘍の異常増殖及びポリープとは例えば扁平上皮細胞乳頭腫 ; 基底細胞腫瘍 ; 移行細胞乳頭腫 ; 腺腫 ; ガストリノーマ ; 胆管細胞腺腫 ; 肝細胞腺腫 ; 腎管状腺腫 ; 膨大細胞腫 ; グロムス腫瘍 ; メラノサイト母斑 ; 線維腫 ; 粘液腫 ; 脂肪腫 ; 平滑筋腫 ; 横紋筋腫 ; 良性奇形腫 ; 血管腫 ; 骨腫 ; 軟骨腫および髄膜腫等を指す。

悪性の腫瘍の異常増殖及びポリープ、例えば肝細胞癌 ; 胆管細胞癌 ; 腎細胞癌 ; 扁平上皮癌 ; 基底細胞癌 ; 移行細胞癌 ; 腺癌 ; 悪性ガストリノーマ ; 悪性黒色腫 ; 線維肉腫 ; 粘液肉腫 ; 脂肪肉腫 ; 平滑筋肉腫 ; 横紋筋肉腫 ; 悪性奇形腫 ; 血管肉腫 ; カボジ肉腫 ; 骨肉腫 ; 軟骨肉腫 ; リンパ管肉腫 ; 悪性髄膜腫 ; 非ホジキンリンパ腫 ; ホジキンリンパ腫 ; 白血病及び脳腫瘍等を含む。

30

新生物は、上皮細胞由来新生物 (上皮癌腫) 、基底細胞癌腫、腺癌腫、並びに、口唇癌、口腔癌、食道癌、小腸癌及び胃癌のような胃腸癌、結腸癌、直腸癌、肝癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、乳癌、並びに、扁平上皮細胞癌及び基底細胞癌のような皮膚癌、前立腺癌、腎細胞癌腫を含み、また、全身の上皮、間葉又は血液細胞を冒す他の既知の癌を含む。

本発明の抗体と、抗腫瘍活性及び/又は殺細胞活性を有する化合物とを含む、抗体-薬剤複合体を提供することができる。また、遺伝子組換え技術を用い、抗腫瘍活性及び/又は殺細胞活性を有する化合物としてのタンパク質トキシンを、遺伝子上で抗体遺伝子と融合させて、1つのタンパク質として発現させて得られたものは、一般に、イムノトキシンと称される。抗腫瘍活性を有する化合物としては、例えば、ドキシソルビシン、マイトマイシンCなどが挙げられる。抗体-薬剤複合体の作製方法としては、限定はされないが、例えば、ジスルフィド結合やヒドラゾン結合によって抗体と薬剤とをカップリングする方法などが挙げられる。

40

【0041】

本発明の抗体を含む医薬組成物

本発明には、医薬又は医薬組成物も含まれる。本発明の医薬の有効成分としては、上述の本発明の抗体又はその機能的断片のほか、生理学的に許容されるその塩を用いてもよい。塩としては、例えば、酸性基が存在する場合には、リチウム、ナトリウム、カリウム、

50

マグネシウム、カルシウム等のアルカリ金属及びアルカリ土類金属塩；アンモニア、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、N，N - ビス（ヒドロキシエチル）ピペラジン、2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール、エタノールアミン、N - メチルグルカミン、L - グルカミン等のアミンの塩；又はリジン、 - ヒドロキシリジン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸との塩を形成することができる。塩基性基が存在する場合には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸の塩；メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パラトルエンスルホン酸、酢酸、プロピオン酸塩、酒石酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、シュウ酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、マンデル酸、ケイ皮酸、乳酸、グリコール酸、グルクロン酸、アスコルビン酸、ニコチン酸、サリチル酸等の有機酸との塩；又はアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸との塩などを挙げることができる。

10

【0042】

本発明の医薬は、有効成分である本発明の抗体又はその機能的断片自体を投与してもよいが、一般的には、有効成分である抗体又はその機能的断片の他、1又は2以上の製剤用添加物を含む医薬組成物の形態で投与することが望ましい。本発明の医薬の有効成分としては、発明の抗体又はその機能的断片の2種以上を組み合わせ用いることができ、上記医薬組成物には、公知の他の薬剤を併せて配合してもよい。

医薬組成物の種類は特に限定されず、剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、座剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。なお、液体製剤にあっては、用時、水又は他の適当な溶媒に溶解又は懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明の化合物を水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。経口投与用又は非経口投与用の任意の製剤形態で提供される。例えば、顆粒剤、細粒剤、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤又は液剤等の形態の経口投与用医薬組成物、静脈内投与用、筋肉内投与用、若しくは皮下投与用などの注射剤、点滴剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、点鼻剤、吸入剤、坐剤などの形態の非経口投与用医薬組成物として調製することができる。注射剤や点滴剤などは、凍結乾燥形態などの粉末状の剤形として調製し、用時に生理食塩水などの適宜の水性媒体に溶解して用いることもできる。また、高分子などで被覆した徐放製剤を脳内に直接投与することも可能である。

20

30

医薬組成物の製造に用いられる製剤用添加物の種類、有効成分に対する製剤用添加物の割合、又は医薬組成物の製造方法は、組成物の形態に応じて当業者が適宜選択することが可能である。製剤用添加物としては無機又は有機物質あるいは固体又は液体の物質を用いることができ、一般的には、有効成分重量に対して1重量%から90重量%の間で配合することができる。具体的には、その様な物質の例として乳糖、ブドウ糖、マンニット、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロゼラチン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン性界面活性剤、プロピレングルコール、水等が挙げられる。

40

【0043】

経口投与用の固形製剤を製造するには、有効成分と賦形剤成分例えば乳糖、澱粉、結晶セルロース、乳酸カルシウム、無水ケイ酸などと混合して散剤とするか、さらに必要に応じて白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、カルボ

50

キシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤などを加えて湿式又は乾式造粒して顆粒剤とする。錠剤を製造するには、これらの散剤及び顆粒剤をそのまま、あるいはステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤を加えて打錠すればよい。これらの顆粒又は錠剤はヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸 - メタクリル酸メチルポリマーなどの腸溶剤基剤で被覆して腸溶剤製剤、あるいはエチルセルロース、カルナウバロウ、硬化油などで被覆して持続性製剤とすることもできる。また、カプセル剤を製造するには、散剤又は顆粒剤を硬カプセルに充填するか、有効成分をそのまま、あるいはグリセリン、ポリエチレングリコール、ゴマ油、オリーブ油などに溶解した後ゼラチン膜で被覆し軟カプセルとすることができる。

【0044】

注射剤を製造するには、有効成分を必要に応じて塩酸、水酸化ナトリウム、乳糖、乳酸、ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなどのpH調整剤、塩化ナトリウム、ブドウ糖などの等張化剤と共に注射用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアンプルに充填するか、更にマンニトール、デキストリン、シクロデキストリン、ゼラチンなどを加えて真空凍結乾燥し、用事溶解型の注射剤としてもよい。また、有効成分にレチシン、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などを加えて水中で乳化せしめ注射剤用乳剤とすることもできる。

【0045】

直腸投与剤を製造するには、有効成分をカカオ脂、脂肪酸のトリ、ジ及びモノグリセリド、ポリエチレングリコールなどの座剤用基材と共に加湿して溶解し型に流し込んで冷却するか、有効成分をポリエチレングリコール、大豆油などに溶解した後、ゼラチン膜等で被覆すればよい。

【0046】

本発明の医薬の投与量及び投与回数は特に限定されず、治療対象疾患の悪化・進展の防止及び/又は治療の目的、疾患の種類、患者の体重や年齢、疾患の重篤度などの条件に応じて、医師の判断により適宜選択することが可能である。一般的には、経口投与における成人一日あたりの投与量は0.01~1000mg(有効成分重量)程度であり、一日1回又は数回に分けて、あるいは数日ごとに投与することができる。注射剤として用いる場合には、成人に対して一日量0.001~400mg(有効成分重量)を連続投与又は間欠投与することが望ましい。

【0047】

本発明の医薬は、植込錠及びマイクロカプセルに封入された送達システムなどの徐放性製剤として、体内から即時に除去されることを防ぎ得る担体を用いて調製することができる。担体として、例えば、エチレンビニル酢酸塩、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの、生物分解性、生物適合性ポリマーを用いることができる。このような材料は、当業者によって容易に調製することができる。また、リポソームの懸濁液も薬剤的に受容可能な担体として使用することができる。有用なリポソームは、限定はしないが、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG誘導ホスファチジルエタノール(PEG-PE)を含む脂質組成物として、使用に適するサイズになるように、適当なポアサイズのフィルターを通して調製され、逆相蒸発法によって精製される。

【0048】

本発明の医薬は、医薬組成物としてキットの形態で、容器、バック中に投与の説明書と共に含めることができる。本発明の医薬組成物がキットとして供給される場合、該組成物のうち異なる構成成分が別々の容器中に包装され、使用直前に混合される。このように構成成分を別々に包装するのは、活性構成成分の機能を失うことなく長期間の貯蔵を可能にするためである。

キット中に含まれる試薬は、構成成分の活性を長期間有効に持続し、容器内側に吸着することなく、また、構成成分を変質することのない材質で製造された容器中に供給される。例えば、封着されたガラスアンプルは、窒素ガスのような中性で不反応性を示すガスの

10

20

30

40

50

存在下で封入されたバッファなどを含んでもよい。アンプルは、ガラス、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、セラミック、金属、又は試薬を保持するために通常用いられる他の何れかの適切な材料によって構成される。

【0049】

また、キットには使用説明書が添付されてもよい。本キットの使用説明は、紙などに印刷され、及び/又はフロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、オーディオテープなどの電氣的又は電磁的に読み取り可能な媒体に保存されて使用者に供給されてもよい。詳細な使用説明は、キット内に実際に添付されていてもよく、あるいは、キットの製造者又は分配者によって指定され又は電子メール等で通知されるウェブサイトに掲載されていてもよい。

10

【0050】

さらに、本発明には、本発明の医薬又は医薬組成物を患者等に投与し、EP4に関連する免疫疾患、腫瘍および疼痛等を予防又は治療する方法が含まれる。

ここで「治療」とは、EP4の機能異常（例えば、機能の異常亢進など）に起因して発症する疾患等に罹患した哺乳動物において、その病態の進行及び悪化を阻止又は緩和することを意味し、これによって該疾患の進行及び悪化を阻止又は緩和することを目的とする処置のことである。

また、「予防」とは、EP4の機能異常（例えば、機能の異常亢進など）に起因して発症する疾患等に罹患するおそれがある哺乳動物について、該疾患の発症又は罹患を予め阻止することを意味し、これによって該疾患の諸症状等の発症を予め阻止することを目的とする処置のことである。

20

【0051】

治療の対象となる「哺乳動物」は、哺乳類に分類される任意の動物を意味し、特に限定はしないが、例えば、ヒトの他、イヌ、ネコ、ウサギなどのペット動物、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマなどの家畜動物などのことである。特に好ましい「哺乳動物」は、ヒトである。

【0052】

本発明の抗体固定化担体

本発明には、抗体固定化担体が含まれる。本発明の抗体固定化担体は、本発明の抗ヒトEP4抗体が担体に固定化されてなるものである。好ましい実施形態では、本発明の抗体固定化担体は、EP4発現細胞を含む血液を接触させて、前記体液からEP4発現細胞を除去するために用いられる。担体に固定化される抗ヒトEP4抗体は、1種類のみでもよいし、2種以上でもよい。

30

本発明の抗体固定化担体の具体的形態としては、例えば、本発明の抗体が水不溶性担体に固定され、容器に充填されたものが挙げられる。ここで、水不溶性担体としてはいかなる材質も使用可能であるが、成型性、滅菌性や細胞毒性が低いという点で好ましいものを列記すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン等の合成高分子、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ハイドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン等の金属材料が挙げられる。

40

担体の形状としては、粒状、綿状、織布、不織布、スポンジ状多孔質体、平板状、などが挙げられるが、体積当たりの表面積が大きいという点で粒状、綿状、織布、不織布、スポンジ状多孔質体が好ましい。例えば、抗体が固定された水不溶性担体を予め容器に充填した多孔質体フィルターに末梢血液を通過させ、疾患に関わるEP4発現細胞を効率よく除去することができる。

本発明の抗体固定化担体と他の構成要素とを組み合わせ、EP4発現細胞除去用キットを作製することができる。当該他の構成要素としては、抗凝固剤、体外循環回路が挙げられる。

【0053】

50

本発明の抗EP4抗体を含む診断用キット

本発明の抗EP4抗体は、診断用キットの形態で提供することができる。本発明の診断用キットは抗体を含むが、その他に、標識物質、又は2次抗体もしくはその標識物を含めることができる。抗体の標識物質とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物及び化学発光化合物等によって標識されたものを意味する。本発明の診断用キットは、上記の構成要素のほか、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質（発色性基質等）、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釈液等を含んでいてもよい。また、各種バッファー、滅菌水、各種細胞培養容器、各種反応容器（エッペンドルフチューブ等）、ブロッキング剤（Bovine Serum Albumin (BSA), Skim milk, Goat血清等の血清成分）、洗浄剤、界面活性剤、各種プレート、アジ化ナトリウム等の防腐剤、及び実験操作マニュアル（説明書）等を含んでいてもよい。測定法としては、例えばELISA法、EII法、RIA法、蛍光免疫測定法（FIA）、化学発光免疫測定法（Luminescence immunoassay）、フローサイトメトリー法が考えられるが、なかでも特に、フローサイトメトリー法が、簡便かつ高感度という点で好ましい。また、その他の細胞表面抗原を認識する抗体キットと組み合わせて使用することができる。

本発明の診断用キットを、癌、自己免疫疾患などを罹患している患者の血液細胞と反応させ、EP4発現細胞の血液中での割合を検出することができる。その他の細胞表面抗原抗体と組み合わせることにより特定の細胞集団（例えば樹状細胞、TH17細胞、Treg細胞）でのEP4発現細胞の割合を検出することができる。EP4発現細胞の割合の増減を評価することで、疾病の状態を評価することができる。

以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0054】

(1) ヒトEP4 発現ベクター p c D N A - D E S T 4 0 - h E P 4 の作製

GenBankに登録済みのヒトEP4遺伝子（登録番号NM_000958）の、ORF配列から終止コドンを除いた配列の5'末端に5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAGCAGGCTTTCGAAGGAGATAGAACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTA CTGCTGCTCTGGGTTCCA GGTTCCACTGGTGAC-3'配列（配列番号30）を、3'末端に5'-GACCCAGCTTTCTTGTACAAAAGTGGTCCCC-3'配列（配列番号31）を付加したDNAを合成し、pDONR221ベクター（インビトロジェン社製）にGatewayシステム（インビトロジェン社）を使用して組み込み、pDONR-hEP4とした。インサートの塩基配列は常法に従って決定し、配列に誤りがないことを確認した。次にGatewayシステムにより、ヒトEP4遺伝子を含む配列をp c D N A - D E S T 4 0 ベクター（インビトロジェン社製）に組み替え、p c D N A - D E S T 4 0 - h E P 4 を得た。このプラスミドから発現するヒトEP4は、C末端にV5と6xHISタグが付加された融合タンパク質である。p c D N A - D E S T 4 0 - h E P 4 のプラスミドDNAは、常法に従って大腸菌（DH5 株）を形質転換して増幅し、PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit（インビトロジェン社製）を用いて使用説明書に従い調製した。

【0055】

(2) ヒトEP4発現293FT細胞の調製

100mmのコラーゲンIコート細胞培養用ディッシュに播種した293FT細胞（インビトロジェン社製）に、上述のp c D N A - D E S T 4 0 - h E P 4 プラスミドDNA 10µgを、リポフェクトアミン2000（インビトロジェン社製）25µLを用いて、使用説明書に従い遺伝子導入した。遺伝子導入24時間後に細胞をHBSS（Hanks' Balanced Salt Solutions、インビトロジェン社製）で洗浄し、酵素不含細胞解離バッファー（インビトロジェン社製）によって細胞培養用ディッシ

ユから剥がし取り、遠心操作により回収した。EP4 遺伝子導入 293FT 細胞および遺伝子未導入 293FT 細胞は、Cyt o f i x / C y t o p e r m K i t (B D 社製) を用いて細胞膜透過処理を施し、抗 V5 タグ抗体(インビトロジェン社製)と混合してインキュベートした(4、1時間)。洗浄バッファー(0.1%ウシ胎児血清を含む P B S (P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e , インビトロジェン社製))で3回洗浄した後、2次抗体の A l e x a 4 8 8 標識抗マウス I g G 抗体(インビトロジェン社製)によって染色(4、1時間)し、再度洗浄バッファーで3回洗浄した後、フローサイトメーター Q u a n t a S C M P L (ベックマン・コールター社製)で解析した。その結果、遺伝子導入 293FT 細胞のみが A l e x a 4 8 8 蛍光陽性を示したことから、ヒト EP4 を発現していることが確認できた。

10

そこで、このヒト EP4 発現 293FT 細胞を感作抗原として使用した。

【0056】

(3) 免疫

抗原免疫は 129/O1a 系統の7週齢のメスマウスに対して行った。(2)で記載したヒト EP4 発現 293FT 細胞を生理食塩水に懸濁した後、10~14日の間隔を空けて5回腹腔内投与を行った。

【0057】

(4) ハイブリドーマの作製

5回目の免疫から3日後にマウスの脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。脾細胞とマウスミエローマ P3X63Ag8.653 細胞 (E C A C C) とをポリエチレングリコール 4000 (メルク社製)を用いて、常法に従って細胞融合させた。融合細胞は、100単位/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン、NCTC-109 培地(以上インビトロジェン社製)を含む G I T 培地(和光純薬社製)に懸濁し、96ウェルプレートに100 μ L/ウェルの割合で播種、37、5%CO₂条件下で培養した。融合の翌日からは、上述の培地に H A T S u p p l e m e n t (インビトロジェン社製)を加えた培地に交換して、融合後13日間培養を継続した。その結果、約700クローンのハイブリドーマのコロニーを得た。

20

【0058】

(5) ヒト EP4 安定発現 NS0 細胞株の構築

(1)で述べた pDONR-hEP4 から pEF-DEST51 ベクター(インビトロジェン社製)へ Gateway システムによる配列の組み換えを行い、pEF-DEST51-hEP4 プラスミドを得た。このプラスミドから発現するヒト EP4 は、C 末端に V5 と 6xHIS タグが付加された融合タンパク質である。

30

10%のウシ胎児血清と、100単位/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン(インビトロジェン社製)を含む R P M I 培地で培養した、マウスミエローマ NS0 細胞(理化学研究所細胞バンク)1 \times 10⁷細胞に、Lipofectamin LTX (インビトロジェン社製)35 μ L と Plus Reagent (インビトロジェン社製)14 μ L を使って、使用説明書に従って pEF-DEST51-hEP4 プラスミド 14 μ g を遺伝子導入した。遺伝子導入の翌日からは、2.5 μ g/mL の抗生物質ブラストシジン(インビトロジェン社製)を加えた R P M I 培地で、3日目ごとに培地を交換しながら2週間培養した。形成されたコロニーからペニシリンキャップ法により、ブラストシジン耐性 NS0 細胞をクローニングした。

40

得られたブラストシジン耐性 NS0 細胞を、Fc Block (ベクトン・ディッキンソン社製)で4~15分間ブロッキングした後、(2)と同様の方法でフローサイトメリーにより EP4 融合タンパク質の発現を確認した。その結果、得られたブラストシジン耐性 NS0 細胞がヒト EP4 を安定発現していることが確認できた。

【0059】

(6) 抗 EP4 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

(5)で作製したヒト EP4 安定発現 NS0 細胞株 2 \times 10⁵細胞を、(2)と同様の方法で染色しフローサイトメーターによる解析を行った。細胞膜透過処理は施さず、1

50

次抗体として、(4)で得られたハイブリドーマの培養上清50 μ Lを使用した。その結果、21ウェルの上清でAlexa488蛍光陽性の反応が見られた。陽性だったウェルの細胞は限界希釈法によりクローニングし、2週間後の培養上清についても同様の方法で、フローサイトメトリーによるヒトEP4安定発現NS0細胞株との結合試験を行った。同様のクローニングと結合試験を再度繰り返し、最終的に2クローンの抗EP4抗体産生ハイブリドーマを得た。これらのハイブリドーマを、それぞれNBG016-mAb14、NBG016-mAb21と名付けた。

得られたハイブリドーマ細胞NBG016-mAb14、NBG016-mAb21は、2010年6月29日(原寄託日)付で、茨城県つくば市東1丁目1番地1つくばセンター中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、それぞれ受託番号FERM P-21978及びFERM P-21979として、寄託された。その後、ブダペスト条約に基づき、原寄託より国際寄託に移管された(「原寄託についての受託証」及び「生存に関する証明書」の通知日; 2011年9月5日)。受託番号はそれぞれFERM BP-11402及びFERM BP-11403である。

【0060】

(7) 抗EP4抗体の精製

ハイブリドーマ細胞NBG016-mAb14、NBG016-mAb21それぞれを、無血清のCD-Hybridoma Medium(インビトロジェン社製)中で、細胞の約9割が死滅するまで培養を継続し、抗体を産生させた。この培養上清100mLから遠心操作(1,500rpm、15分間)により細胞をとり除いた後、HiTrap Protein G HPカラム(GEヘルスケア・ジャパン社製)に通すことでIgGを精製・濃縮した。得られた精製IgGについて、IsoStripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)を用いてサブクラスと軽鎖の種類を決定したところ、共に(IgG2a、)であった。以降、NBG016-mAb14、NBG016-mAb21とはこれらの精製抗体のことを指し、ハイブリドーマもしくは細胞と記載した場合はこれらの抗体を産生するハイブリドーマのことを指す。

(2)、(3)、(4)、(6)と同様に、サブクラスの異なる抗EP4抗体産生ハイブリドーマ細胞を取得した。このハイブリドーマの培養上清から、(7)と同様にしてサブクラスと軽鎖の種類が(IgG1、)である精製IgGを得た。この精製抗体をNBG016-mAb9とした。

【0061】

(8) ヒトEP4安定発現CHO細胞株の作製

pDONR-hEP4から、GatewayシステムでpEF5/FRT/V5-DESTベクター(インビトロジェン社製)にヒトEP4遺伝子を乗せ換え、pEF-FRT-hEP4を得た。このプラスミドから発現するヒトEP4は、C末端にV5と6xHISタグを付加した融合タンパク質である。

10%のウシ胎児血清と、100単位/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシンを含むHam's F-12培地(インビトロジェン社製)で培養した、Flp-In-CHO細胞(インビトロジェン社製)に、リポフェクトアミン2000を用いてpEF-FRT-hEP4プラスミドとpOG44プラスミド(インビトロジェン社製)を同時に遺伝子導入した。遺伝子導入の翌日から、500 μ g/mLの抗生物質ハイグロマイシン(インビトロジェン社製)を加えたHam's F-12培地に培地を交換し、3日目ごとに培地を交換しながら2週間培養した。形成されたコロニーから、ペニシリンキャップ法によりハイグロマイシン耐性細胞をクローニングした。

(2)に記載した方法で、2次抗体としてはフィコエリスリン(PE)標識抗マウスIgG抗体(ベックマン・コールター社)を使用し、得られたハイグロマイシン耐性細胞と抗V5タグ抗体との結合をフローサイトメーターで解析した。その結果、得られたハイグロマイシン耐性Flp-In-CHO細胞がPE陽性を示したことから、ヒトEP4を

安定発現していることが確認できた。この細胞を以下、ヒトEP4 安定発現CHO細胞株と記載する。

【0062】

(9) 抗ヒトEP4抗体とヒトEP4発現細胞の結合試験

抗ヒトEP4抗体と、ヒトEP4 安定発現CHO細胞株の結合試験を(6)に記載した方法でフローサイトメトリーにより実施した。ヒトEP4 安定発現CHO細胞株もしくは親株Flp-In-CHO細胞を 5×10^5 使用し、1次抗体としては $1 \mu\text{g}$ のNBG016-mAb14、NBG016-mAb21もしくはマウスアイソタイプコントロール抗体(BioReagent社製)を、2次抗体としてはPE標識抗マウスIgG抗体を使用した。

図1にその結果を示す。親株Flp-In-CHO細胞を灰色に塗りつぶしたヒストグラムで、ヒトEP4安定発現株細胞を黒の実線で示している。NBG016-mAb14、NBG016-mAb21が共に、ヒトEP4安定発現CHO細胞株にのみ結合していることから、これらの抗体がヒトEP4に特異的に結合することが示された。

同様にしてNBG016-mAb9についても、ヒトEP4 安定発現CHO細胞株との結合試験を行った。結果を図2に示す。この結果よりNBG016-mAb9もヒトEP4に特異的に結合することが示された。

【0063】

(10) PGE₂によるcAMP産生に対する抗体の阻害試験

ヒトEP4 安定発現CHO細胞株もしくは親株Flp-In-CHO細胞を、アセチルサリチル酸1mMを含む培地で18時間培養した後、細胞解離バッファーで細胞培養ディッシュから回収して、Cultured Plate-96(パーキンエルマー社製)に1ウェルあたり2,500個分注した。各ウェルにNBG016-mAb14、NBG016-mAb21もしくはマウスアイソタイプコントロール抗体を $0.05 \sim 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加え、室温で15分間静置した。次にPGE₂(Cayman社製)を $5 \times 10^{-11} \text{M}$ になるように加え、さらに室温で30分間静置した。細胞内で産生されたcAMP量は、LANCET Ultra cAMP Kit(パーキンエルマー社製)を用いて、使用説明書に従った反応を行い、プレートリーダーARVO 1420 HTS(パーキンエルマー社製)で測定した。

その結果を図3に示す。マウスアイソタイプコントロール抗体を加えても、PGE₂により誘導されたcAMP産生量に関して有意な阻害効果が見られなかったのに対し、NBG016-mAb14、NBG016-mAb21を加えた場合には、抗体濃度依存的にcAMP産生阻害効果が見られた。データ解析ソフトウェアOriginPro 8.1(OriGeneLab社製)を用いてロジスティック関数による解析を行ったところ、IC₅₀値はNBG016-mAb14では $0.15 \mu\text{g}/\text{mL}$ (約 1.0nM)、NBG016-mAb21では $0.24 \mu\text{g}/\text{mL}$ (約 1.6nM)であった。この結果からNBG016-mAb14、NBG016-mAb21はヒトEP4に対するアンタゴニスト活性を有する機能性抗体であり、ヒトEP4に対するアンタゴニスト活性を有する既存の物質(例えば低分子化合物)に比して同等以上の強い受容体機能阻害活性を有していることが示された。

同様にしてNBG016-mAb9について、PGE₂を $1.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 添加して行った試験の結果を図4に示す。上述の解析を行ったところ、NBG016-mAb9のIC₅₀値は $4.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ (約 28.8nM)であった。この結果から、NBG016-mAb9もヒトEP4に対するアンタゴニスト活性を有する機能性抗体であることが示された。

【0064】

(11) ヒトEP1~4、マウスEP1~4の発現ベクター作製

ヒトEP1(GenBank登録番号NM__000955)、ヒトEP2(GenBank登録番号NM__000956)ヒトEP3a1(GenBank登録番号X83857)、マウスEP1(GenBank登録番号NM__013641)、マウスEP2(G

10

20

30

40

50

enBank登録番号NM__008964)、マウスEP3(GenBank登録番号NM__011196)、マウスEP4(GenBank登録番号NM__008965)の終止コドンを除くORF配列の5'末端に、CACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGAC配列(配列番号32)を付加したDNA断片を、KOD FX(東洋紡績社製)を用いて常法に従ってPCR増幅した。増幅したDNAは、pENTR/D-TOPベクター(インビトロジェン社製)に組み込み、それぞれpENTR-hEP1、pENTR-hEP2、pENTR-hEP3、pENTR-mEP1、pENTR-mEP2、pENTR-mEP3、pENTR-mEP4とした。インサートの塩基配列は常法に従って決定し、配列に誤りがないことを確認した。これら7種類のプラスミドと、(1)で作製したpDONR-hEP4プラスミドを用いて、GatewayシステムによりそれぞれのインサートをpcDNA-DEST47ベクター(インビトロジェン社製)に組み替えた。その結果、pcDNA-DEST47-hEP1、pcDNA-DEST47-hEP2、pcDNA-DEST47-hEP3、pcDNA-DEST47-hEP4、pcDNA-DEST47-mEP1、pcDNA-DEST47-mEP2、pcDNA-DEST47-mEP3、pcDNA-DEST47-mEP4を得た。これらのプラスミドからは、それぞれのPGE₂受容体のC末端にCycle 3 Green Fluorescent Protein(GFP)を付加した融合タンパク質が発現される。

10

【0065】

(12) 抗EP4抗体の結合特異性試験

20

(11)で作製した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10μgを、リポフェクトアミン2000を使用して293FT細胞に遺伝子導入した。その翌日に細胞をHBSSで洗浄し、酵素不含細胞解離バッファーによって細胞培養用ディッシュから剥がし取り、遠心操作により回収した。これらの細胞をEP一過性発現293FT細胞と記載する。

本発明の抗EP4抗体と、EP一過性発現293FT細胞の結合試験を(6)に記載した方法でフローサイトメトリーにより実施した。8種類のPGE₂受容体サブタイプそれぞれの一過性発現293FT細胞は 5×10^5 個使用し、1次抗体としては1μgの抗EP4抗体NBG016-mAb14、NBG016-mAb21もしくはマウスアイソタイプコントロール抗体(BioReagent社製)を、2次抗体としてはPE標識抗マウスIgG抗体を使用した。

30

例としてNBG016-mAb14の結果を図5に示す。GFP由来の蛍光陽性細胞が存在することから、それぞれのPGE₂受容体が293FT細胞上に発現していることが確認できた。しかし8種類の細胞の中でPE蛍光陽性を示したのは、ヒトEP4の発現細胞のみであった。NBG016-mAb21も同様の結果であったことから、本発明の抗EP4抗体はヒト型のEP4に強い特異性を有することが分かった。PGE₂受容体サブタイプ結合特異性が、ヒトEP4に対するアンタゴニスト活性を有する既存の物質よりも高いことが示された。

40

同様にNBG016-mAb9の結合特異性を調べた結果を図6に示す。8種類のPGE₂受容体サブタイプをそれぞれ発現する細胞のうち、PE蛍光陽性を示したのはヒトEP4の発現細胞のみであった。この結果から、NBG016-mAb9もヒト型のEP4に強い特異性を有することが分かった。

【0066】

(13) ヒトリンパ球と抗EP4抗体の結合性試験

凍結ヒト末梢血単核細胞(Cellular Technology Ltd.社製)は、使用説明書に従ってCTL-Anti-Aggregate-Wash Supplement(Cellular Technology Ltd.社製)を使用して解凍

50

、調製した。

ヒトリンパ球と本発明の抗EP4抗体の結合性試験は、(6)に記載した方法でフローサイトメトリーにより実施した。調製したヒト末梢血単核細胞 9×10^5 個に、1次抗体としてNBG016-mAb14、NBG016-mAb21もしくはマウスアイソタイプコントロール抗体を $1.5 \mu\text{g}$ 使用し、2次抗体にはAlexa488標識抗マウスIgG抗体を使用した。フローサイトメーターによる解析の際には、前方散乱光と側方散乱光のドットプロットに基づき、細胞集団をリンパ球画分と単核球・マクロファージ画分とに区分して、リンパ球画分のAlexa488蛍光強度を調べた。

フローサイトメトリーによる解析結果を図7に示す。マウスアイソタイプコントロール抗体による結果を灰色で塗りつぶしたヒストグラムで、抗EP4抗体による結果を黒の実線で示している。抗EP4抗体と反応させた場合にのみ、ヒトリンパ球画分の大部分がAlexa488陽性を示したことから、ヒトリンパ球と抗EP4抗体が結合していることが分かる。この結果より、本発明の抗EP4抗体はヒトの内在性EP4に結合する能力を有していることが明らかとなった。

NBG016-mAb9についても同様に、ヒトリンパ球との結合確認実験を行った。ヒト新鮮末梢血からLymphoprep (AXIS SHIELD社製)を使用して、使用説明書に従いヒト末梢血単核細胞を単離した後、抗ヒトCD14マイクロビーズ (Miltenyi Biotec社製)を使用してCD14陰性の細胞画分を分取し、ヒトリンパ球画分とした。以降の結合確認実験は2次抗体としてフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗マウスIgG抗体(ベックマン・コールター社製)を用いて、上述の通り行った。図8に示した通り、ヒトリンパ球の大部分がNBG016-mAb9と結合しており、NBG016-mAb9もまたヒトの内在性EP4に結合できることがわかった。

【0067】

(14) PMA刺激THP1の抗EP4抗体による免疫染色

ヒト単球系THP1細胞株は、PMA (Phorbol 12-myristate 13?acetate、シグマ・アルドリッチ社製) 100 nM を含むRPMI培地で、4ウェルカルチャースライド(ベクトン・ディッキンソン社製)に1ウェルあたり 1.5×10^5 細胞になるように播種し、3日間培養してマクロファージ様に分化させた。培地を除いてからPBSで3回洗浄し、1%パラホルムアルデヒド溶液 $200 \mu\text{L}$ により細胞を固定(4で30分間静置)した。再度PBSで3回洗浄した後、ヒトガンマグロブリン(和光純薬社製) 1 mg/mL を含む1%BSA (Bovine Serum Albumin, 和光純薬社製)を $300 \mu\text{L}$ 加えてブロッキングした(室温、20分間静置)。次に0.1%Tween20 (MPバイオ社製)を含むPBS(以下、免染洗浄バッファーと記載する)で3回洗浄してから、 1 mg/mL に調製したNBG016-mAb14、NBG016-mAb21もしくはマウスアイソタイプコントロール抗体を $200 \mu\text{L}$ 加えて、4で1時間インキュベートした。免染洗浄バッファーで3回洗浄後、2次抗体のFITC標識抗マウスIgG抗体によって染色(4、1時間)した。免染洗浄バッファーで3回洗浄したスライドは、最後にPropidium Iodide (PI)を含むVECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories社製)で封入した。作製したスライドは蛍光顕微鏡を用いて観察した。

免疫染色したTHP1細胞の蛍光顕微鏡観察像を図9に示す。左の像は、マウスアイソタイプコントロール抗体での染色像で、中央にPIで染められた細胞核(灰色)のみが観察できる。右の像は抗EP4抗体での染色像で、細胞核の周辺にFITCの蛍光(白色)が粒状に観察された。この結果から、THP1細胞株をPMAによって分化させたマクロファージ様細胞の細胞膜表面上の天然型EP4に本発明の抗体が結合することが分かった。

【0068】

(15) PGE₂によるサイトカイン抑制効果の抗EP4抗体による阻害

PGE₂は、マクロファージにおいてLPS刺激によるサイトカイン産生をEP4あるいはEP2を介して抑制することが知られている。本発明の抗体が、EP4を介したPG

10

20

30

40

50

E₂によるサイトカイン産生抑制を回復させるかを、EP4受容体を発現しているPMA分化THP1を用いて調べた。THP1細胞株は、PMA 100 nMを含むRPMI培地で48ウェル細胞培養プレートに1ウェルあたり 2.5×10^5 細胞播種した。3日間培養後、NBG016-mAb14、NBG016-mAb21、マウスアイソタイプコントロール抗体 $3.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ を含むRPMI培地に培地交換し、30分間インキュベートした。次に、PGE₂を20 nMになるように加えてさらに30分間インキュベートした。さらにLPSを100 ng/mLになるように加えてから18時間培養した。培養上清を回収し、TNF Human DuoSet Kit (R&Dシステムズ社製)を使用して使用説明書に従い、培養上清中のTNFの量を測定した。

一方、培養上清を回収した後の細胞には、RPMI培地で10倍希釈したアラマープルー (MorphoSys社製)を0.5 mL加えた。4時間インキュベートした後に、励起波長535 nm、検出波長595 nmの条件でプレートリーダーARVO 1420 HTSで蛍光測定した。このアラマープルーでの測定結果を基に、各ウェル間の相対的な生存細胞数比を求め、生存細胞数比当たりのTNF生産量を算出した。本発明の抗体が、どの程度PGE₂によるサイトカイン産生抑制を回復するかは、以下の基準に基づいて算出した。すなわち、LPS刺激のみを加えたウェルのTNF量を回復率100%、LPS刺激とPGE₂を加えたウェルのTNF量を回復率0%として、LPS刺激とPGE₂と当該抗体を加えた場合の回復率を算出した。

【0069】

試験結果を表1に示した。マウスアイソタイプコントロール抗体を加えても、PGE₂によるTNF産生抑制に有意な変化は見られなかった。しかしNBG016-mAb14、NBG016-mAb21を加えた場合には、PGE₂によるTNF産生抑制を約50%程度回復することが分かった。独立した2回の試験で同様の結果を得た。以上よりNBG016-mAb14、NBG016-mAb21はヒト内在性EP4に対してアンタゴニスト活性を有する機能性抗体であることが明らかになった。

【0070】

10

20

【表 1】

試験 1

LPS	PGE ₂	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF α 濃度 \pm SD (pg/mL)	回復率 \pm SD (%)
-	-	-	177.1	
+	-	-	550.0 \pm 21.8	
+	+	-	286.1 \pm 16.7	10
+	+	NBG016-mAb14	423.4 \pm 33.9	52.0 \pm 12.9
+	+	NBG016-mAb21	469.1 \pm 48.1	69.3 \pm 18.2
+	+	アイソタイプコントロール	275.9 \pm 11.1	-3.9 \pm 4.2

試験 2

LPS	PGE ₂	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF α 濃度 \pm SD (pg/mL)	回復率 \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
+	+	アイソタイプコントロール	148.9 \pm 15.4	-7.6 \pm 6.5

【0071】

(16) 抗EP4抗体の可変領域をコードするcDNAの単離、解析

抗EP4抗体を産生するハイブリドーマ(NBG016-mAb14、NBG016-mAb21)約 1×10^7 個よりRneasy Mini Kit(キアゲン社製)を用いて、添付の使用説明書に従ってTotal RNAの抽出を行った。5'/3' RACEキット、2nd ジェネレーション(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)にて5'-RACE(rapid amplification of cDNA ends)法によるPCRを行い、重鎖または軽鎖の可変領域の増幅を行った。3'プライマーはマウス定常領域 1と に相当するプライマーを使用した。重鎖可変領域増幅のための3'プライマーは5'-AGGGGCCAGTGGATAGACCGATG-3'(配列番号33)と5'-GGCTGTTGTTTGGCTGCAGAGAC-3'(配列番号34)である。軽鎖可変領域増幅のための3'プライマーは5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGGATAC-3'(配列番号35)と5'-TGGATACAGTTGGTGCAGCATCAG-3'(配列番号36)である。次に、得られた増幅断片をアガロースゲルによって電気泳動し、バンドを切り出し、ゲルを溶かし出すことによってDNAの精製を行った。精製したDNAをT-Vector pMD20(タカラバイオ社製)に組み込み、塩基配列を解析してアミノ酸配列を決定した。シーケンス反応はABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits Version 3.1(アプライドバイオ

10

20

30

40

50

システムズ社)を使用し、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer(アプライドバイオシステムズ社)により塩基配列を決定した。塩基配列を解析した結果、NBG016-mAb14の重鎖可変領域をコードする核酸配列として配列番号1、軽鎖可変領域をコードする核酸配列として配列番号3であった。また重鎖可変領域のアミノ酸配列として配列番号2、軽鎖可変領域のアミノ酸配列として配列番号4が得られた。

さらに、NBG016-mAb21の重鎖可変領域をコードする核酸配列として配列番号11、軽鎖可変領域をコードする核酸配列として配列番号13であった。また重鎖可変領域のアミノ酸配列として配列番号12、軽鎖可変領域のアミノ酸配列として配列番号14が得られた。

【0072】

以上の結果から、Kabat((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth edition U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office)により定義されるCDR領域のアミノ酸配列が明らかとなった。

NBG016-mAb14の重鎖CDR1~3はそれぞれ、配列番号5~7であった。また軽鎖CDR1~3はそれぞれ配列番号8~10であった。また、NBG016-mAb21の重鎖CDR1~3はそれぞれ、配列番号15~17であった。また軽鎖CDR1~3はそれぞれ配列番号18~20であった。重鎖CDRについて両クローンは完全一致していた。

NBG016-mAb9に関しても上述の方法に従って、重鎖可変領域は配列番号33と配列番号34のプライマーを、軽鎖可変領域は配列番号35と配列番号36のプライマーを用いて増幅し、可変領域の配列を決定した。NBG016-mAb9の重鎖可変領域をコードする核酸配列として配列番号41、軽鎖可変領域をコードする核酸配列として配列番号42であった。また重鎖可変領域のアミノ酸配列として配列番号43、軽鎖可変領域のアミノ酸配列として配列番号44が得られた。

NBG016-mAb9の重鎖CDR1~3はそれぞれ、配列番号45~47であった。また軽鎖CDR1~3はそれぞれ配列番号48~50であった。

【0073】

(17) 抗EP4抗体遺伝子のクローニング

First Strand cDNA Synthesis Kit For RT-PCR (AMV) (ロシュ・ダイアグノスティクス社製)に付属のOligo-dT Primerを用いて、使用説明書に従ってcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として、本発明の抗EP4抗体の重鎖および軽鎖遺伝子全長をPCR増幅した。重鎖及び軽鎖の5'末端側は5'-RACEで判明した塩基配列を参考に、3'末端側は定常領域特異的配列を参考に設計した。重鎖遺伝子増幅のための5'プライマーは5'-CACTGACCCTACGCGTATGGAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3'(配列番号37)、3'プライマーは5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCAAGGAGAGTGGGAGAG-3'(配列番号38)である。軽鎖可変領域増幅のための5'プライマーは5'-TTGCAGCCAGGAACGCGTATGGACATGAGGACCCCTGCT-3'(配列番号39)と5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCT-3'(配列番号40)である。得られた重鎖および軽鎖増幅断片は制限酵素MluIとNotIで切断し、重鎖はpEHX1.1(東洋紡績社製)、軽鎖はpELX2.1(東洋紡績社製)のMluIとNotIサイトに組み込み、塩基配列を解析してアミノ酸配列を決定した。

塩基配列を解析した結果、NBG016-mAb14の重鎖をコードする核酸配列として配列番号22、軽鎖をコードする核酸配列として配列番号24となった。また重鎖のアミノ酸配列として配列番号23、軽鎖のアミノ酸配列として配列番号25が得られた。

NBG016-mAb21の重鎖をコードする核酸配列として配列番号26、軽鎖をコ

10

20

30

40

50

ードする核酸配列として配列番号28となった。また重鎖のアミノ酸配列として配列番号27、軽鎖のアミノ酸配列として配列番号29が得られた。

重鎖ならびに軽鎖可変領域のアミノ酸配列は上記5'-RACE法で解析したアミノ酸配列と同一であった。

NBG016-mAb9に関して、上述の方法に従ってcDNAを合成し、それを鋳型としてNBG016 mAb9の重鎖および軽鎖遺伝子全長をPCR増幅した。重鎖遺伝子増幅のための5'プライマーは5'-CACTAGAGCCCCCATACGCGTATGGCTGTCTCTGGTGTCTGTTCC-3'(配列番号51)、3'プライマーは5'-ATAAGAATGCGGCGCTCATTTACCCGGAGAGTGGGAGAG-3'(配列番号52)である。軽鎖遺伝子増幅のための5'プライマーは5'-TCCTCAGGTTGCCTCACGCGTATGAAGTTGCCTGTTAG-3'(配列番号53)と5'-ATAAGAATGCGGCGCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCT-3'(配列番号40)である。得られた重鎖および軽鎖増幅断片は制限酵素MluIとNotIで切断し、重鎖はpEHX1.1(東洋紡績社製)、軽鎖はpELX2.1(東洋紡績社製)のMluIとNotIサイトに組み込み、塩基配列を解析してアミノ酸配列を決定した。

NBG016-mAb9の重鎖をコードする核酸配列として配列番号54、軽鎖をコードする核酸配列として配列番号55となった。また重鎖のアミノ酸配列として配列番号56、軽鎖のアミノ酸配列として配列番号57が得られた。

【0074】

(18)得られた抗体遺伝子配列が抗EP4抗体をコードしていることの確認

NBG016-mAb14、NBG016-mAb21のリコンビナント抗体は、Mammalian PowerExpress System(東洋紡績社製)を用いて生産した。軽鎖遺伝子が挿入されたpELX2.1を制限酵素EcoRIとBglIIで切断し、アガロースゲルによって電気泳動して軽鎖遺伝子を含む断片を精製した。精製した軽鎖遺伝子断片を、重鎖遺伝子を挿入されたpEHX1.1のEcoRI-BglIIサイトに組み込み、軽鎖および重鎖両方の遺伝子を保持するプラスミドを作製した。このプラスミドをリポフェクトアミン2000を用いて293FT細胞に形質導入し、一過性での抗体発現を行った。

形質導入から72時間後の細胞培養上清を採取し、ヒトEP4安定発現CHO細胞株との結合試験を(6)に記載した方法でフローサイトメトリーにより実施した。コントロールとしては抗体遺伝子未導入の293FT細胞の培養上清を使用した。その結果、培養上清中に分泌されたリコンビナント抗体NBG016-mAb14、NBG016-mAb21は、ヒトEP4に対する結合性を保持していた。このことから、(17)で得られた抗体遺伝子配列は、抗EP4抗体をコードしていることが確認できた。

NBG016 mAb9のリコンビナント抗体も、上述の方法と同様に生産した。軽鎖遺伝子が挿入されたpELX2.1は制限酵素SalIとSpeIで切断し、アガロースゲルによって電気泳動して軽鎖遺伝子を含む断片を精製した。精製した軽鎖遺伝子断片を、重鎖遺伝子が挿入されたpEHX1.1のSalI-SpeIサイトに組み込み、軽鎖および重鎖両方の遺伝子を保持するプラスミドを作製した。このプラスミドを293FT細胞に形質導入し、一過性での抗体発現を行った。

形質導入から72時間後の細胞培養上清を採取し、ヒトEP4安定発現CHO細胞株との結合試験を(6)に記載した方法でフローサイトメトリーにより実施した。コントロールとしては抗体遺伝子未導入の293FT細胞の培養上清を使用した。結果を図10に示す。親株Flp-In-CHO細胞を灰色に塗りつぶしたヒストグラムで、ヒトEP4安定発現CHO細胞株を黒の実線で示している。培養上清中に分泌されたリコンビナント抗体NBG016 mAb9がヒトEP4に対する結合性を保持していたことから、(17)で得られたNBG016 mAb9の抗体遺伝子配列は、抗EP4抗体をコードしていることが確認できた。

【0075】

10

20

30

40

50

(19) リコンビナント抗EP4抗体安定発現CHO細胞の作製

(18)で作製した、NB G 0 1 6 - m A b 1 4、NB G 0 1 6 - m A b 2 1の軽鎖および重鎖の遺伝子を保持するベクターを制限酵素SspIで切断し、エタノール沈殿法で精製した。リポフェクトアミン2000を用いてCHO-K1細胞(理化学研究所細胞バンク)に形質導入し、10%ウシ胎児血清を含むHam's F12培地で24時間培養した。24時間後、10%ウシ胎児血清および10μg/mLピューロマイシンを含むHam's F12培地に交換し、3日毎に培地交換をしながら12日間培養した。12日後にペニシリンキャップ法でコロニーを分離した。

分離したCHO-K1細胞を24well plateに播種し、10μg/mLピューロマイシンを含むHam's F12培地で3日間培養した。3日後に10μg/mLピューロマイシンを含むHam's F12培地(ウシ胎児血清無添加)に交換し、72時間培養後の培養上清を回収した。

培養上清中のマウスIgGはELISA法により検出した。PBSを用いて培養上清の希釈系列を作製し、Maxisorp 96well plate(Nunc社製)に分注して4℃で一晩静置した。翌日、3%BSA(Sigma社製)を含むPBSを加えて室温で1時間静置してブロッキングした。0.1%Tween 20を含むPBSで洗浄した後、1%BSAを含むPBSで4,000倍に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG抗体(ミリポア社製)を加え、室温で1時間静置した。0.1%Tween 20を含むPBSで洗浄した後、発色試薬(Sureblue TMB microwell peroxidase substrate, Kirkegaard & Perry Laboratories社製)を100μL加えて室温で5分静置した後、100μLの1N硫酸を加えて反応を停止し、450nmの吸光度を測定した。その結果、軽鎖および重鎖の遺伝子を保持するベクターを導入して株化したCHO-K1細胞の上清で、IgGの発現を確認した。

【0076】

(20) リコンビナント抗EP4抗体とヒトEP4安定発現CHO細胞株の結合試験

(19)で樹立した細胞株培養上清から(7)と同様にして、リコンビナント抗体NB G 0 1 6 - m A b 1 4、リコンビナント抗体NB G 0 1 6 - m A b 2 1を精製した。得られた精製リコンビナント抗EP4抗体と、ヒトEP4安定発現CHO細胞株の結合試験を(6)に記載した方法でフローサイトメトリーにより実施した。精製リコンビナント抗EP4抗体もしくはマウスアイソタイプコントロール抗体は細胞 5×10^5 個あたり1μgを使用した。2次抗体にはPE標識抗マウスIgG抗体を使用した。

図11にその結果を示す。親株Flp-In-CHO細胞を灰色に塗りつぶしたヒストグラムで、ヒトEP4安定発現CHO細胞株を黒の実線で示している。リコンビナント抗体NB G 0 1 6 - m A b 1 4、リコンビナント抗体NB G 0 1 6 - m A b 2 1が共に、ヒトEP4安定発現CHO細胞株にのみ結合していることから、精製リコンビナント抗EP4抗体が、ヒトEP4に対する結合性を保持していることが確認された。

【0077】

(21) マウスIgG1型抗体NB G 0 1 6 - m A b 2 1発現ベクターの作製

(7)で精製したNB G 0 1 6 - m A b 2 1はサブクラスがIgG2aであった。そこで、NB G 0 1 6 - m A b 2 1のサブクラスをIgG1に改変し、マウスIgG1型抗体NB G 0 1 6 - m A b 2 1を作製した。マウスIgG1型抗体NB G 0 1 6 - m A b 2 1遺伝子はOverlapping PCR法で以下の通り作製した。NB G 0 1 6 m A b 2 1の重鎖遺伝子を鋳型として、5'-CACTGACCCCTACGCGTATGGAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3'(配列番号37)と5'-GACAGATGGGGGTGTCGTTTATGCGCTAGAGACAGTGACCAAGAGTCCC-3'(配列番号58)を用い、NB G 0 1 6 m A b 2 1の可変領域遺伝子をPCR増幅した。一方で、マウスIgG1を産生するハイブリドーマのTotal RNAから合成したcDNAを鋳型にして、5'-GGGACTCTGGTCACTGTCCTCTAGCGCTAAACGACACCCCCATCTGTC-3'(配列番号59

)と5' - A T A A G A A T G C G G C C G C T C A T T T A C C A G G A G A G T G G G A G A G - 3' (配列番号38)を用い、マウスIgG1のCH1から定常領域遺伝子までをPCR増幅した。増幅して得られた重鎖可変領域遺伝子とCH1定常領域遺伝子断片を混合し、配列番号37と配列番号38のプライマーを用いてPCR増幅した。増幅して得られたDNA断片を制限酵素MluIとNotIで切断し、発現ベクターpEHX1.1のMluI-NotIサイトに挿入した。得られた発現ベクターを制限酵素EcoRIとBglIIで切断し、NBG016-mAb21の軽鎖遺伝子断片(EcoRI-BglII断片)を挿入してマウスIgG1型抗体NBG016-mAb21発現ベクターとした。

【0078】

(22) マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21安定発現株作製方法

8mMグルタミンを含むEX-CELL CD CHO培地(SAFC Bioscience社製)で培養した浮遊CHO-K1細胞(東洋紡績社)(2.5×10^5 cells/ml)を24穴プレートの2ウェルに1mlずつ分注した。Opti-MEM 136 μ l、リポフェクトアミン2000 15 μ l、および制限酵素SspIで切断したマウスIgG1型抗体NBG016-mAb21発現ベクター4 μ gを混合し、室温で20分放置した後、CHO-K1を入れたウェルに68 μ lずつ添加し、CO₂インキュベーターで24時間インキュベートした。24時間後の細胞を8mMグルタミンを含むEX-CELL CD CHO培地8mlに細胞を懸濁し、6穴プレートの2ウェルに4mlずつ分注した。一方のウェルに10mg/mlのピューロマイシンを3 μ l、もう一方のウェルに4 μ l添加し、3日または4日毎に培地を交換しながら18日間培養した。増殖したウェルの細胞を回収して、5cells/mlになるようにConditioned medium(1l当たりEX-CELL CD CHO培地700ml、浮遊CHO-K1細胞培養上清300ml、10mg/mlピューロマイシン1mlまたは0.75mlを混合した培地)に懸濁して、96穴プレートに200 μ lずつ分注した。1週間後にConditioned mediumを100 μ l添加し、さらに1週間培養した。数回継代培養した後、薬剤耐性細胞(4×10^4 cells/ml)を24穴プレートに500 μ l入れ、5日間培養した。5日後にMouse IgG EIA Kit(タカラバイオ社製)を用いて上清中の抗体量を定量して抗体生産細胞をスクリーニングした。この細胞をマウスIgG1型抗体NBG016-mAb21安定発現CHO細胞株とした。

【0079】

(23) マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21の精製

マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21安定発現CHO細胞株を、8mMグルタミン、7.5 μ g/mlピューロマイシンを含むEX-CELL CD CHO培地で10日間培養して抗体を産生させた。この培養上清200mlから(7)と同様にして精製IgGを得た。以降、得られた精製IgGをマウスIgG1型抗体NBG016-mAb21とした。

【0080】

(24) マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21とヒトEP4の結合試験

マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21と、ヒトEP4安定発現CHO細胞株の結合試験を(9)と同様に実施した。結果を図12(A)に示す。親株Flp-In-CHO細胞を灰色に塗りつぶしたヒストグラムで、ヒトEP4安定発現CHO細胞株を黒の実線で示している。マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21がヒトEP4安定発現CHO細胞株にのみ結合していることから、作製したマウスIgG1型抗体NBG016-mAb21が、ヒトEP4に対する結合性を保持していることが確認された。

【0081】

(25) PGE₂によるcAMP産生に対するマウスIgG1型抗体NBG016-mAb21の阻害試験

マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21が、PGE₂によるcAMP産生を

10

20

30

40

50

阻害するかを(10)と同様に調べた。細胞と抗体を室温で15分間反応させた後、 $PG E_2$ を 1.5×10^{-10} Mになるように加え、さらに室温で30分間静置した。cAMP量は、LANCER Ultra cAMP Kit(パーキンエルマー社製)を用いて、使用説明書に従った反応を行って測定した。

その結果を図12(B)に示す。マウスアイソタイプコントロール抗体を加えても、 $PG E_2$ により誘導されたcAMP産生量に関して有意な阻害効果が見られなかったのに対し、マウスIgG1型抗体NBG016-mAb21を加えた場合には、その抗体濃度に依存的なcAMP産生阻害効果が見られた。IC₅₀値は $1.1 \mu g/mL$ (約6.9 nM)であった。この結果からNBG016-mAb21をマウスIgG1型抗体に改変してもEP4に対するアンタゴニスト活性を保持していることが示された。

10

【0082】

(26) ヒトキメラ型抗体NBG016 mAb14および21の作製

NBG016 mAb14および21のCH1領域以降をヒト抗体遺伝子に置換したヒトキメラ型抗体は、Mammalian Power Express System(東洋紡績社製)を用いて生産した。NBG016 mAb14および21の重鎖可変領域遺伝子を、5'-CACTGACCCCTAAGCTTATGGAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3'(配列番号60)と5'-GGCTGTTGTGCTAGCTG CAGAGACAGTGACCAAGAGT-3'(配列番号61)を用いてPCR増幅した。得られた重鎖遺伝子断片は制限酵素HindIIIとNheIで切断し、発現ベクターpEH X1.1のHindIII-NheIサイトに挿入した。一方で、NBG016 mAb14および21の軽鎖可変領域遺伝子を5'-ATTGCAGCCAGGAGAATTCATGGACATGAGGACCCCTGCT-3'(配列番号62)と5'-GGTGCAGCATCCGTACGTTTATTTC CA ACTTTGTCCCC-3'(配列番号63)を用いてPCR増幅した。得られた軽鎖遺伝子断片は制限酵素BsiWIとEcoRIで切断し、発現ベクターpEL X2.1のBsiWI-EcoRIサイトに挿入した。

20

軽鎖遺伝子が挿入されたpEL 2.1を制限酵素BglII、NotI、ScaIで切断し、アガロースゲルによって電気泳動して軽鎖遺伝子を含む断片を精製した。精製した軽鎖遺伝子断片を、重鎖遺伝子が挿入されたpEH X1.1のBglII NotIサイトに組み込み、軽鎖および重鎖両方の遺伝子を保持するプラスミドを作製した。このプラスミドをリポフェクトアミン2000を用いて293FT細胞に形質導入し、一過性での抗体発現を行った。

30

形質導入から72時間後の細胞培養上清を採取し、ヒトEP4安定発現CHO細胞株との結合試験を(6)に記載した方法でフローサイトメトリーにより実施した。コントロールとしては抗体遺伝子未導入の293FT細胞の培養上清を、2次抗体としてはPE標識抗ヒトIgG抗体(アブカム社製)を使用した。図13に結果を示す。親株Flp-In-CHO細胞を灰色に塗りつぶしたヒストグラムで、ヒトEP4安定発現CHO細胞株を黒の実線で示している。この結果より、培養上清中に分泌されたヒトキメラ型抗体NBG016 mAb14および21は、ヒトEP4に対する結合性を保持していることが確認された。

40

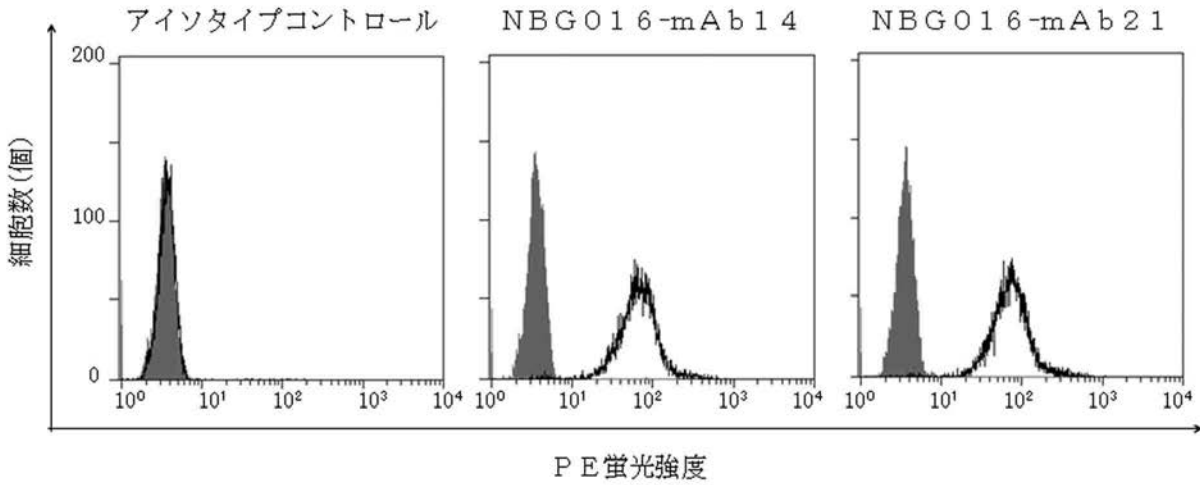
これらの結果から、本発明により提供される抗体をコードする核酸配列を用いて、その機能を保持するリコンビナント抗体(例えば、キメラ抗体、ヒト型化抗体及びヒト抗体等)の生産が可能であることが示された。

【産業上の利用可能性】

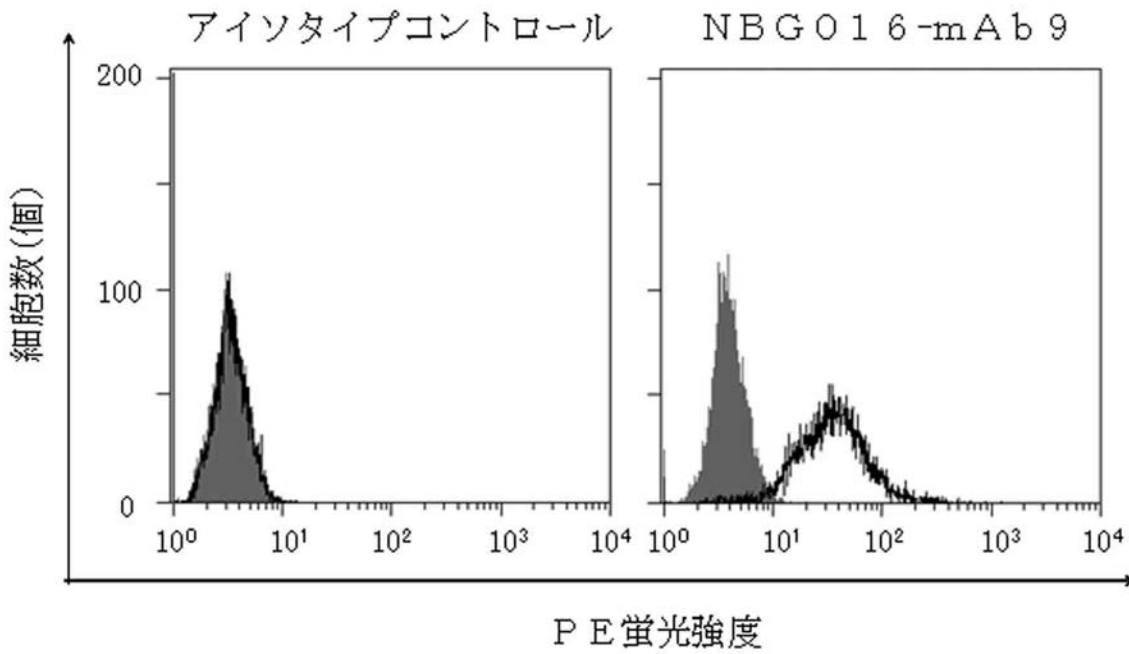
【0083】

本発明により提供される抗体は、ヒト $PG E_2$ 受容体サブタイプEP4の機能を特異的に抑制することから、EP4に関連する疾患の予防又は治療方法の提供や、該疾患の予防又は治療剤の開発において重要な役割を果たすことが期待される。

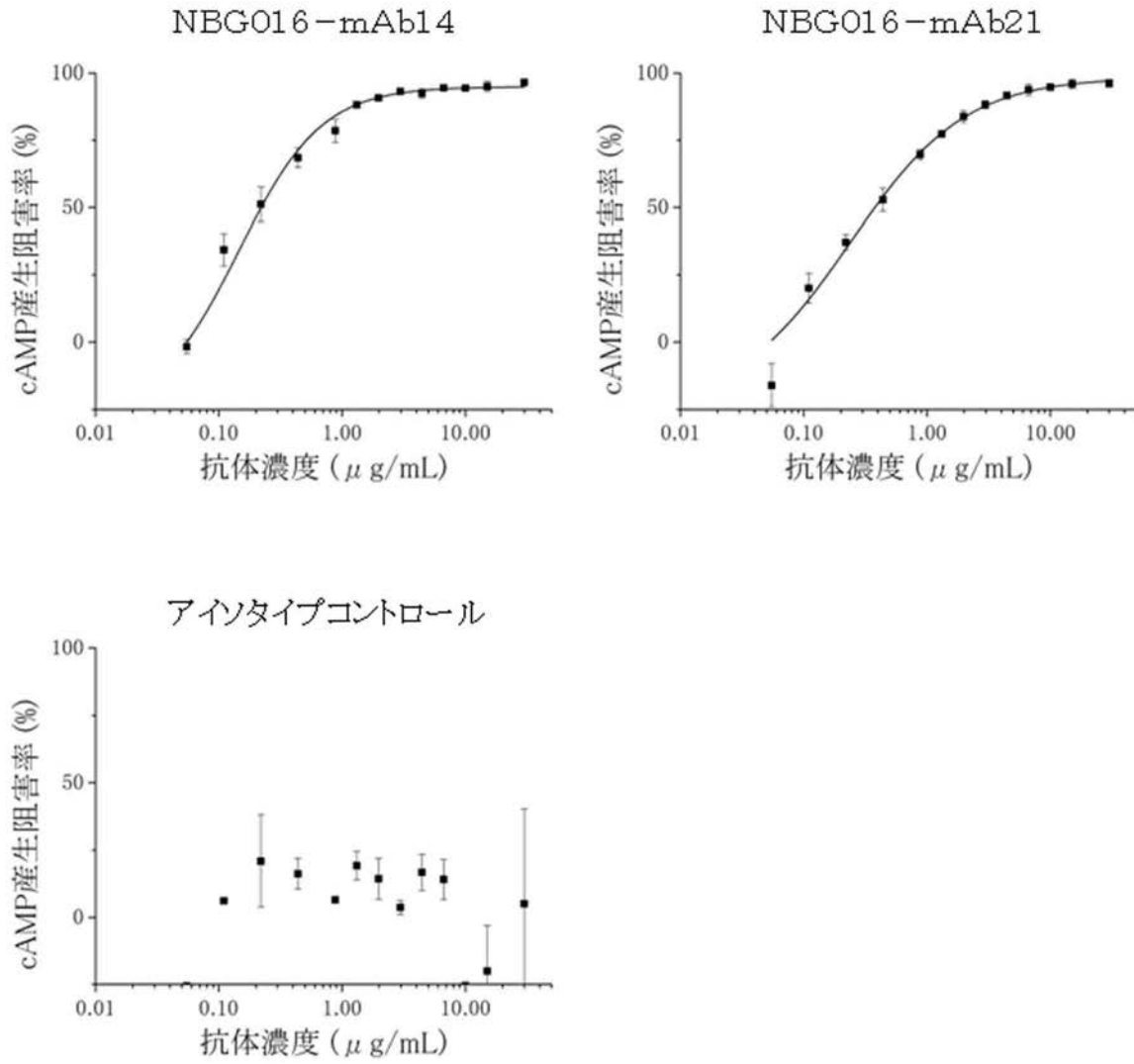
【 図 1 】



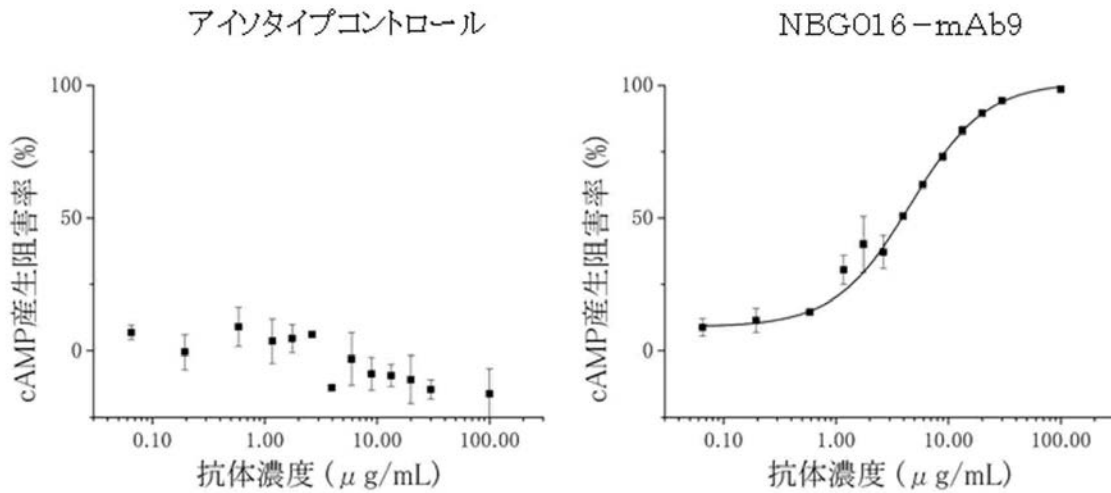
【 図 2 】



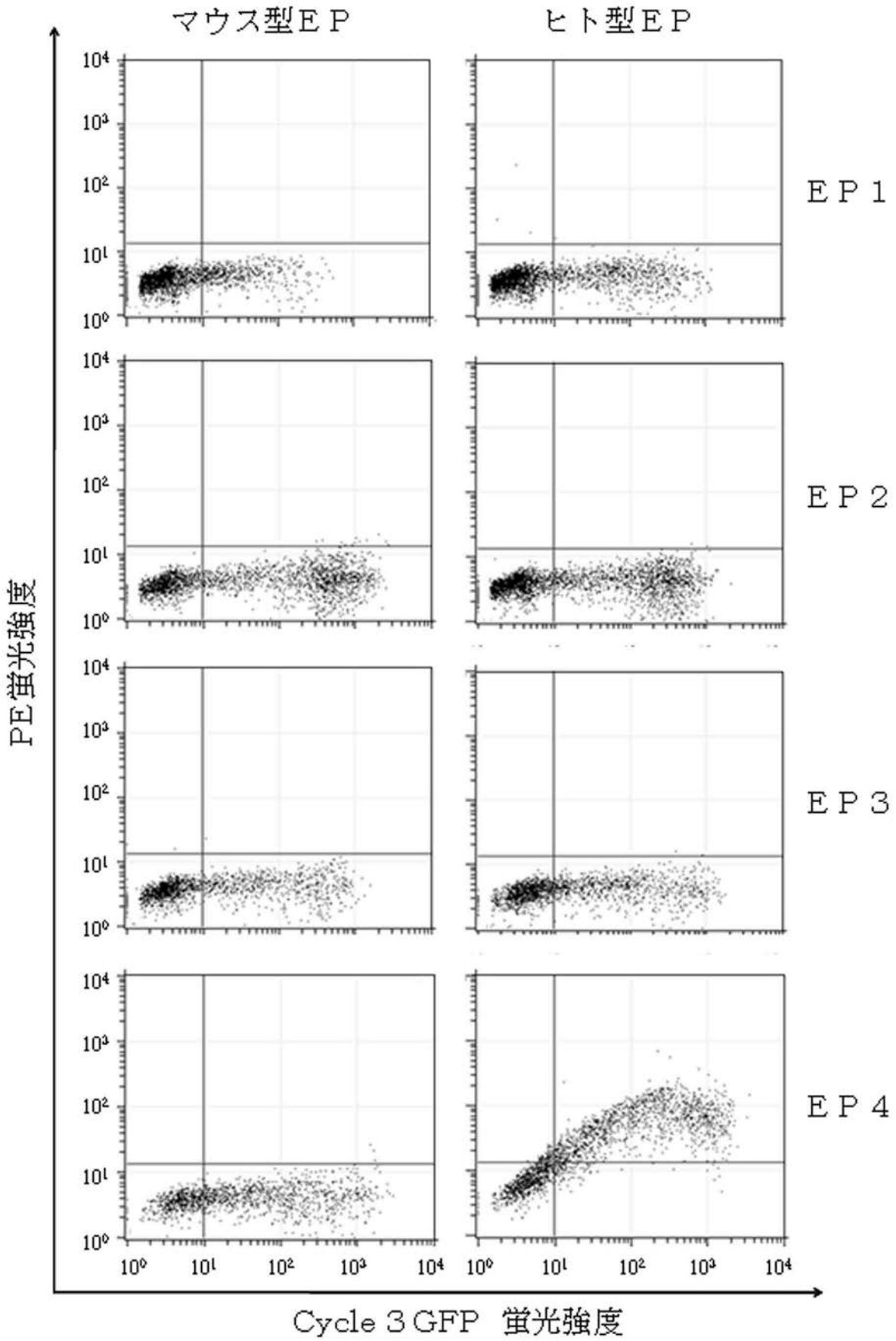
【 図 3 】



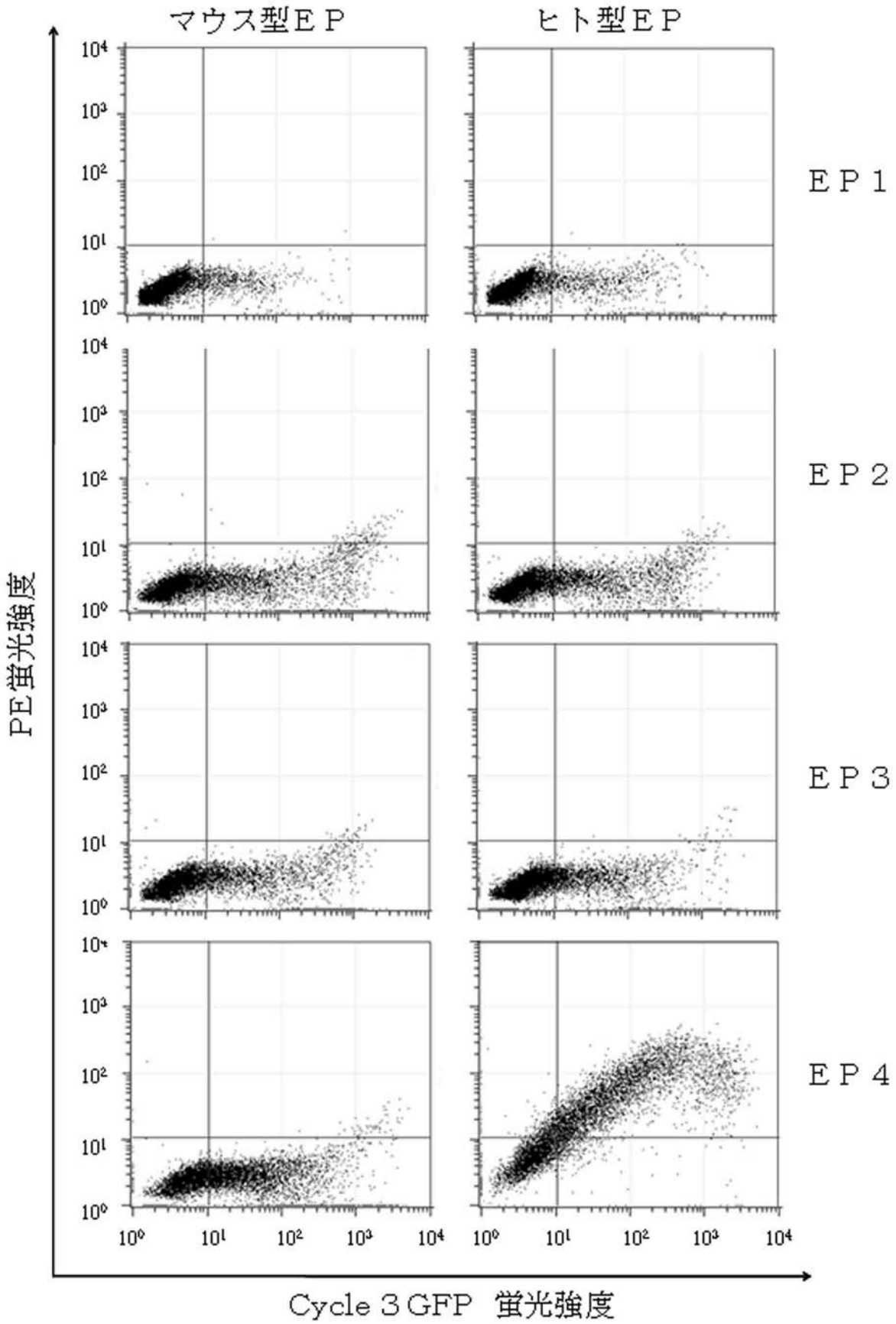
【 図 4 】



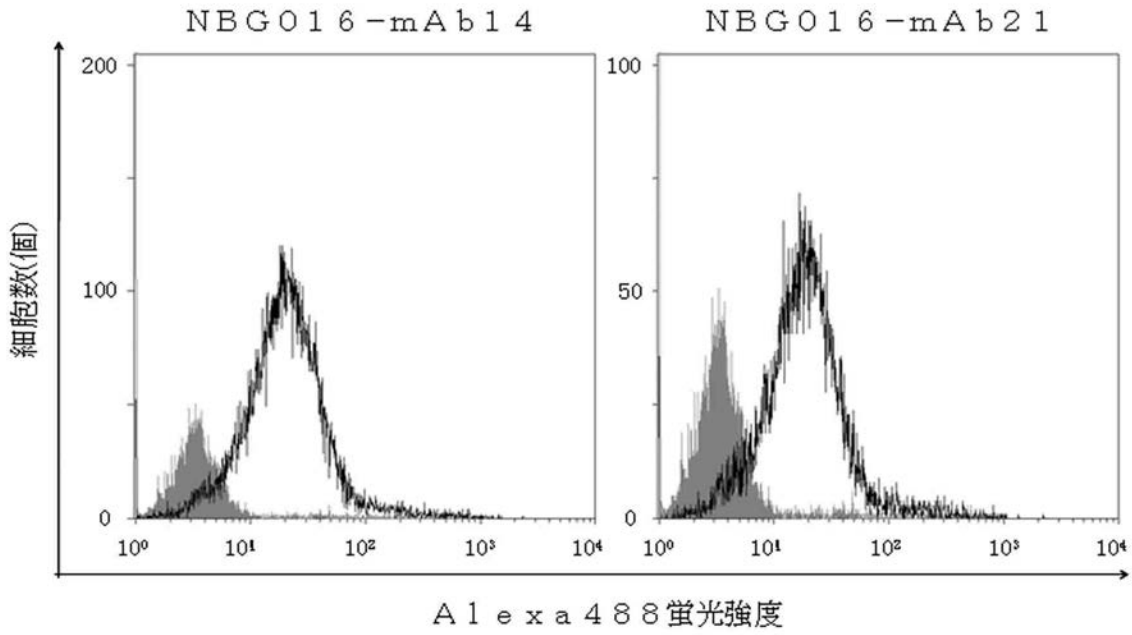
【 図 5 】



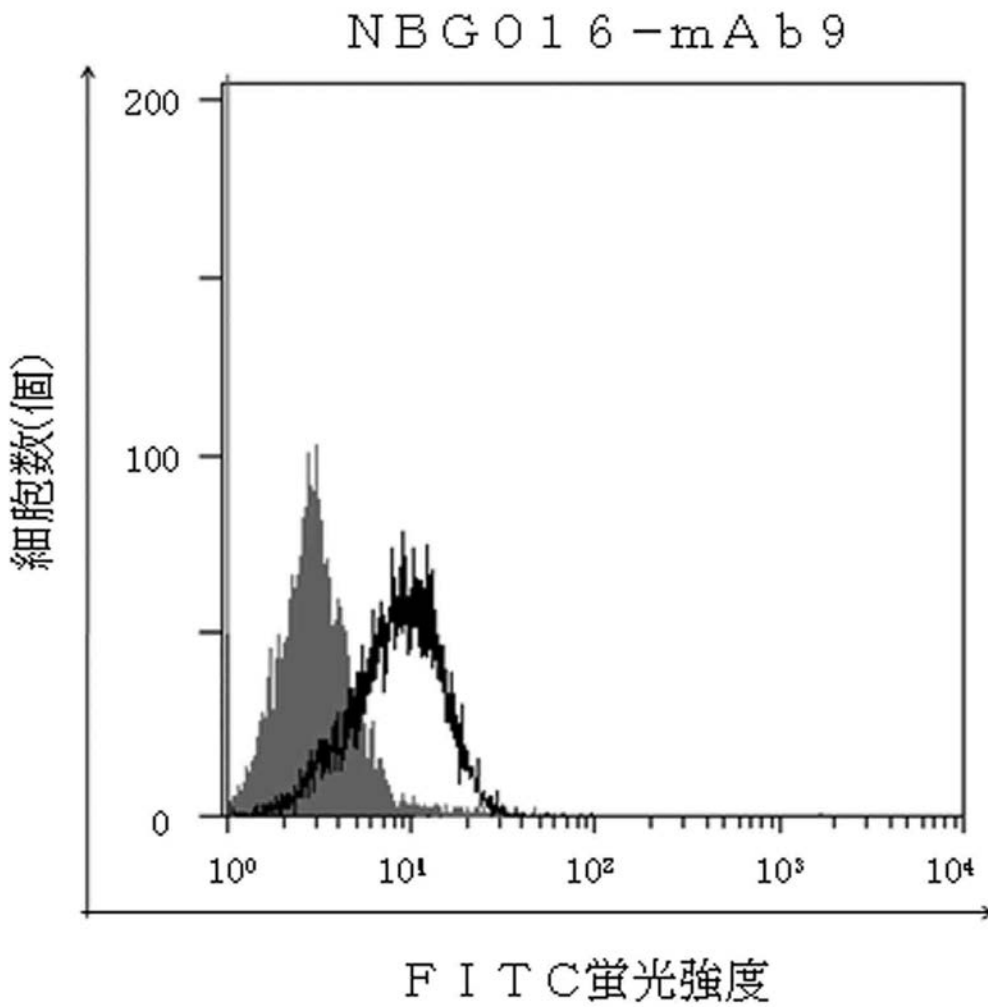
【 図 6 】



【 図 7 】



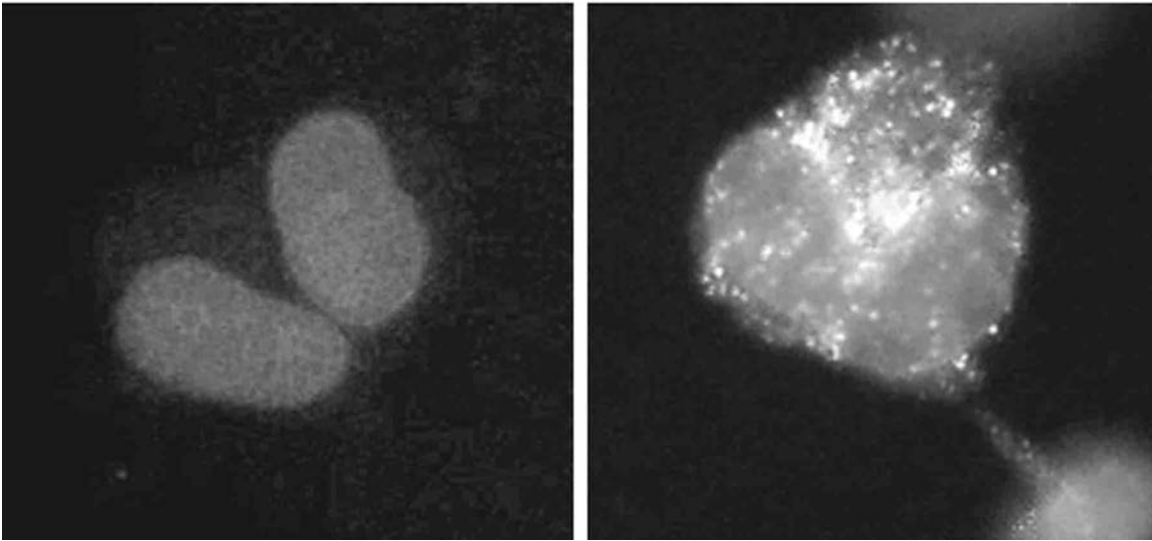
【 図 8 】



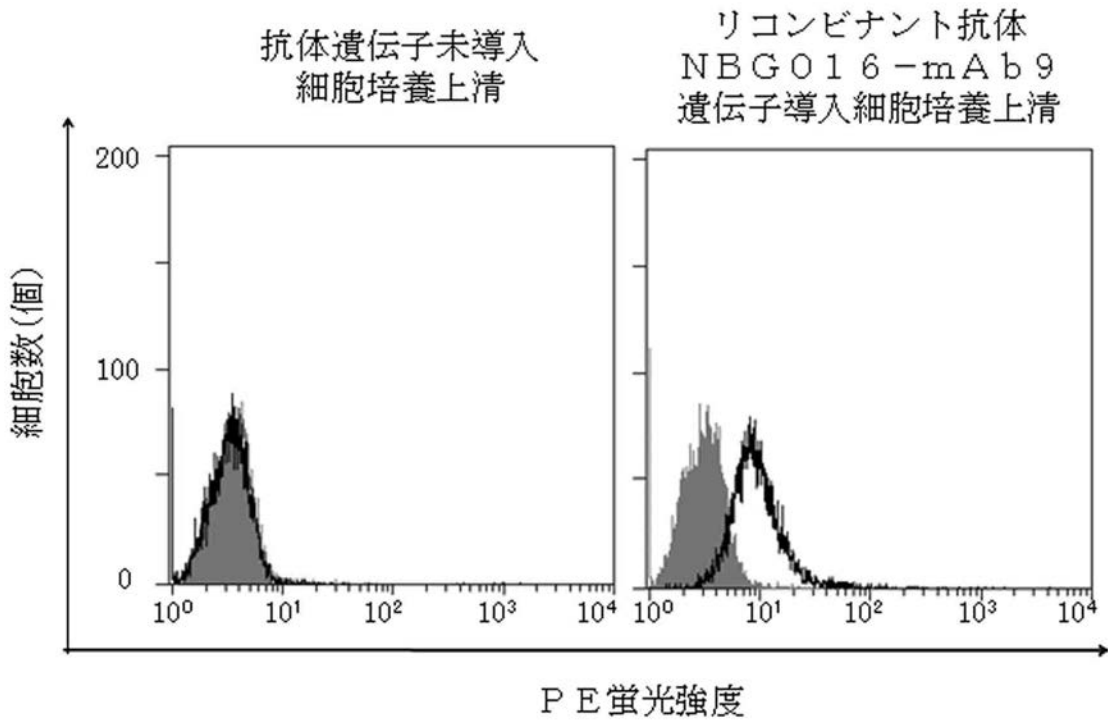
【図9】

アイソタイプコントロール

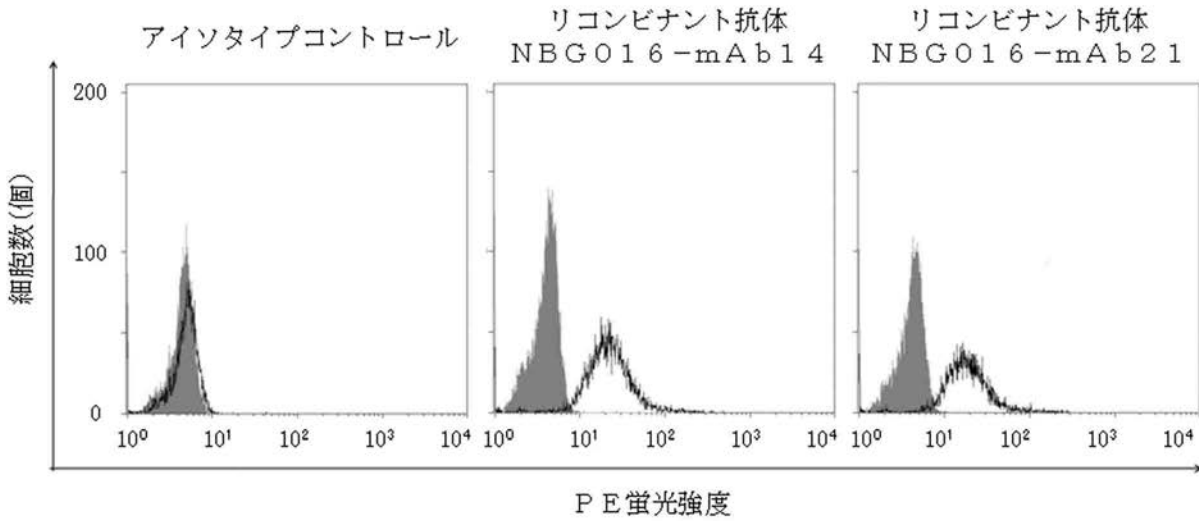
NBG016-mAb14



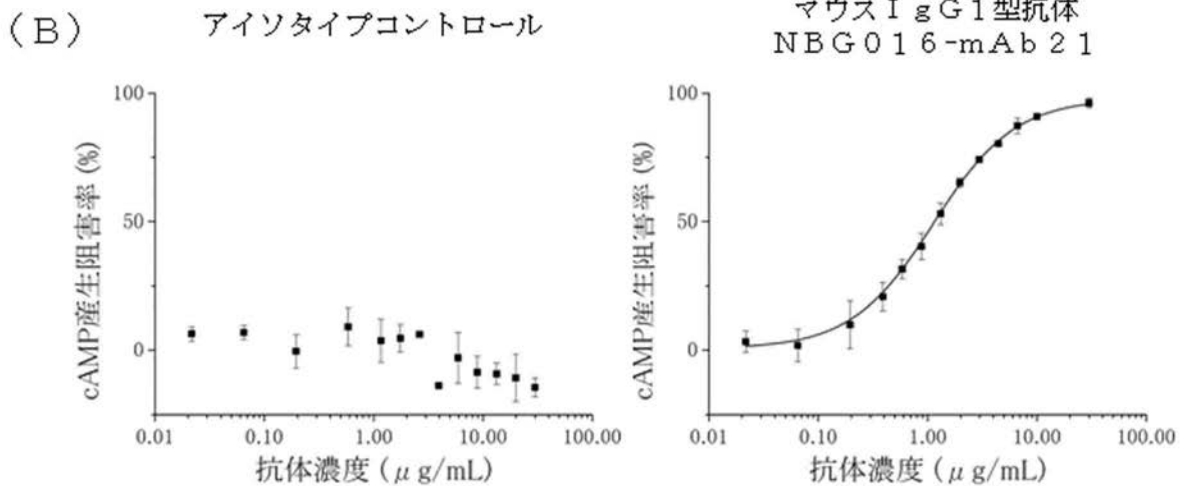
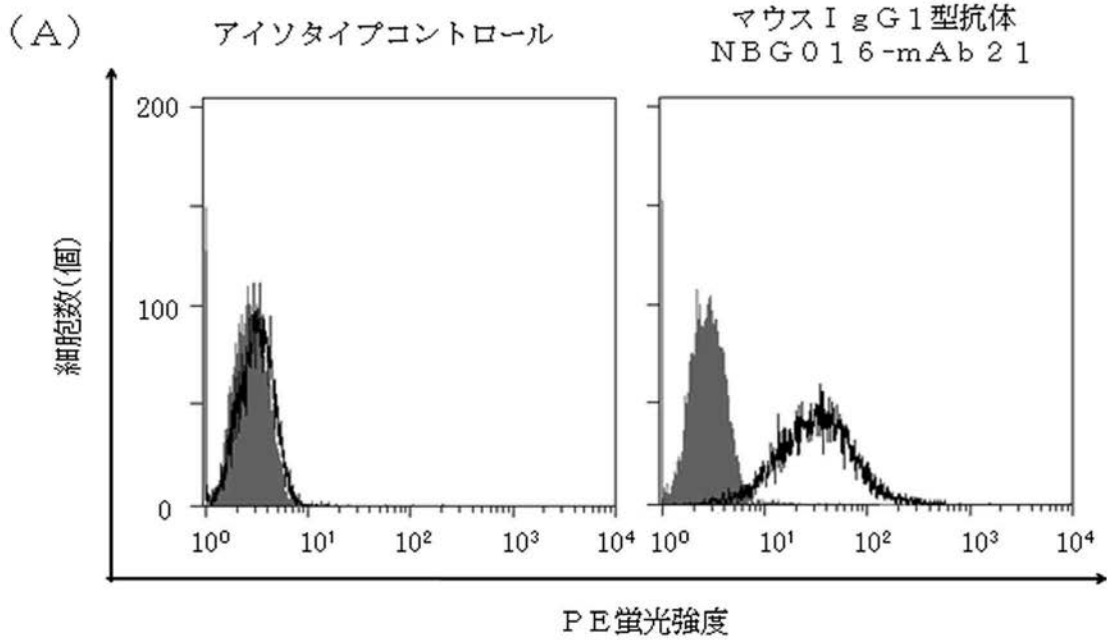
【図10】



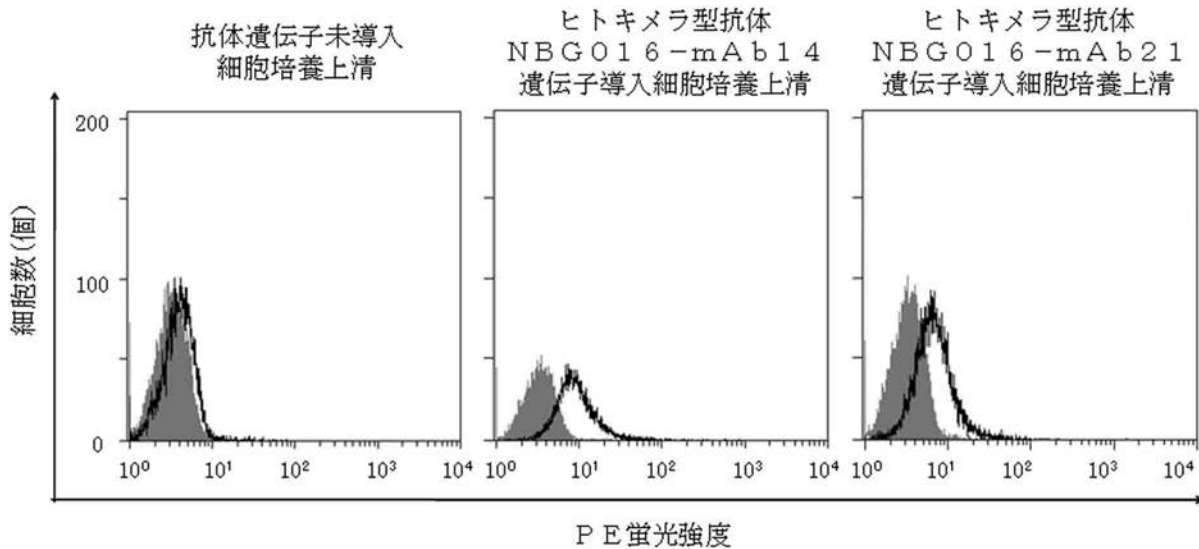
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【図 13】



【配列表】

2012043634000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年3月13日(2013.3.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

国際寄託受託番号 FERM BP - 11402 (NBG016-mAb14)、受託番号 FERM BP - 11403 (NBG016-mAb21) のハイブリドーマから産生されることを特徴とする抗体又はその抗原結合断片。

【請求項2】

PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 の細胞外ドメインに結合し、EP4 特異的にその機能を抑制し、かつ、EP1、EP2、EP3 には結合しないことを特徴とする抗体であって、その相補性決定領域 1～3 (CDR1～3) のアミノ酸配列について、下記 (A)、(B) 又は (C) のいずれかを満たすことを特徴とする抗体又はその抗原結合断片。

(A) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、及び配列番号 10 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

(B) 配列番号 15 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、配列番号 18 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、配列番号 19 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、及び配列番号 20 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

(C) 配列番号 45 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、配列番号 46 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、配列番号 47 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、

配列番号 48 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 49 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、及び
配列番号 50 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

【請求項 3】

PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 の細胞外ドメインに結合し、EP4 特異的にその機能を抑制し、かつ、EP1、EP2、EP3 には結合しないことを特徴とする抗体であって、その重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列について、下記 (a)、(b) 又は (c) のいずれかを満たすことを特徴とする請求項 2 に記載の抗体又はその抗原結合断片。
(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。
(b) 配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 14 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。
(c) 配列番号 43 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 44 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。

【請求項 4】

PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 の細胞外ドメインに結合し、EP4 特異的にその機能を抑制し、かつ、EP1、EP2、EP3 には結合しない抗体であって、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の抗体と受容体との結合を競合阻害する抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

ヒト化抗体又はキメラ抗体であることを特徴とする請求項 2 乃至 4 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記 EP4 の機能が、細胞内 cAMP 濃度を上昇させることである、請求項 2 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 7】

Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、一本鎖抗体、scFv、scFv 二量体若しくは dsFv であることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の抗原結合断片

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物。

【請求項 9】

PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 の機能異常によって発症及び/又は進展する疾患の予防あるいは治療に用いられる、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

治療対象疾患が、免疫疾患であることを特徴とする請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

治療対象疾患が、腫瘍であることを特徴とする請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

治療対象疾患が、疼痛であることを特徴とする請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合断片が担体に固定化されてなる抗体固定化担体。

【請求項 14】

PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 発現細胞を含む血液を接触させて、前記血液から該 EP4 発現細胞を除去するために用いられることを特徴とする請求項 13 に記載の抗体固定化担体。

【請求項 15】

請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、細胞表面上の PGE₂ 受容体サブタイプ EP4 発現量を測定するキット。

【請求項 16】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 4 1、配列番号 4 2
であらわされる請求項 2 又は 3 に記載の抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードする
核酸。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載のベクターが導入された細胞。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/072190
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
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) 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		
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) CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FORTIER, I. et al., Immunolocalization of the prostaglandin E ₂ receptor subtypes in human bone tissue: differences in foetal, adult normal, osteoporotic and pagetic bone, Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2004, Vol.70, pp.431-439	1-21
Y	BISWAS, S. et al., Prostaglandin E ₂ receptor subtypes, EP ₁ , EP ₂ , EP ₃ and EP ₄ in human and mouse ocular tissues-a comparative immunohistochemical study, Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2004, Vol.71, pp.277-288	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 13 October, 2011 (13.10.11)		Date of mailing of the international search report 25 October, 2011 (25.10.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072190

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STILLMAN, B. A. et al., A conserved threonine in the second extracellular loop of the human EP ₂ and EP ₄ receptors is required for ligand binding, <i>European Journal of Pharmacology</i> , 1998, Vol.357, pp.73-82	1-21
Y	FEDYK, E. R. et al., Prostaglandin E ₂ receptors of the EP ₂ and EP ₄ subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 1996, Vol.93, pp.10978-10983	1-21
Y	TAKITA, M. et al., Prostaglandin E receptor EP ₄ antagonist suppresses osteolysis due to bone metastasis of mouse malignant melanoma cells, <i>FEBS Letters</i> , 2007, Vol.581, pp.565-571	1-21
Y	LIN, C. et al., Prostaglandin E ₂ receptor EP ₄ contributes to inflammatory pain hypersensitivity, <i>The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics</i> , 2006, Vol.319, No.3, pp.1096-1103	1-21
Y	WO 2010/013498 A1 (St. Marianna University, School of Medicine), 04 February 2010 (04.02.2010), paragraph [0049] & JP 4560822 B1 & EP 2322220 A1 & CA 2732715 A	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072190

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i,
C07K17/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i,
C12P21/08(2006.01)n

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/072190	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 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			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	FORTIER, I. et al., Immunolocalization of the prostaglandin E ₂ receptor subtypes in human bone tissue: differences in foetal, adult normal, osteoporotic and pagetic bone, Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2004, Vol. 70, pp. 431-439	1-21	
Y	BISWAS, S. et al., Prostaglandin E ₂ receptor subtypes, EP ₁ , EP ₂ , EP ₃ and EP ₄ in human and mouse ocular tissues-a comparative immunohistochemical study, Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2004, Vol. 71, pp. 277-288	1-21	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 13. 10. 2011		国際調査報告の発送日 25. 10. 2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 藤井 美穂	4 N 4434
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 2 1 9 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	STILLMAN, B. A. et al., A conserved threonine in the second extracellular loop of the human EP ₂ and EP ₄ receptors is required for ligand binding, European Journal of Pharmacology, 1998, Vol.357, pp.73-82	1-21
Y	FEDYK, E. R. et al., Prostaglandin E ₂ receptors of the EP ₂ and EP ₄ subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol.93, pp.10978-10983	1-21
Y	TAKITA, M. et al., Prostaglandin E receptor EP4 antagonist suppresses osteolysis due to bone metastasis of mouse malignant melanoma cells, FEBS Letters, 2007, Vol.581, pp.565-571	1-21
Y	LIN, C. et al., Prostaglandin E ₂ receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006, Vol.319, No.3, pp.1096-1103	1-21
Y	WO 2010/013498 A1 (学校法人聖マリアンナ医科大学) 2010.02.04, 【O O 4 9】 & JP 4560822 B1 & EP 2322220 A1 & CA 2732715 A	1-21

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/072190

発明の属する分野の分類

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P37/02(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i,
C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i,
C12P21/08(2006.01)n

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 清水 朋子
北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目2 株式会社エヌビー健康研究所

(72)発明者 漆畑 祐司
北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目2 株式会社エヌビー健康研究所

(72)発明者 杉本 幸彦
熊本県熊本市中央区大江本町5番1号 国立大学法人熊本大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA01 GA11 HA01
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA91Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA16 BB36 BB41 BB43 CC02 CC23 DD62 DD88
EE01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	人类前列腺素e2受体ep4的抗体		
公开(公告)号	JPWO2012043634A1	公开(公告)日	2014-02-24
申请号	JP2012536508	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)	株式会社工ヌビィー健康研究所 国立大学法人熊本		
[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 C07K16/28 C07K17/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P37/02 A61P35/00 A61P29/00 G01N33/53 G01N33/577 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		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K17/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.N A61P37/02 A61P35/00 A61P29/00 A61K39/395.D G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2010218158 2010-09-29 JP		
其他公开文献	JP5273689B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供与人PGE 2受体亚型EP4结合并抑制EP4的功能或其功能片段的抗体。本发明的另一个目的是提供包含上述抗体或其功能片段的药物。用人PGE 2受体亚型EP4免疫小鼠，并筛选出抑制EP4诱导的细胞内cAMP水平升高的单克隆抗体。另外，确定获得的单克隆抗体的CDR序列。

【図2】

