



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106046158 A

(43)申请公布日 2016. 10. 26

(21)申请号 201610161807.2

(22)申请日 2011.09.28

(30)优先权数据

2010-218158 2010.09.29 JP

(62)分案原申请数据

201180046998.3 2011.09.28

(83)生物保藏信息

FERM BP-11402 2010.06.29

FERM BP-11403 2010.06.29

(71)申请人 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 苗堃 金世煜

(51)Int.Cl.

*G07K 16/28*(2006.01)

*A61K 39/395*(2006.01)

*A61P 29/00*(2006.01)

*A61P 35/00*(2006.01)

*A61P 37/02*(2006.01)

*G07K 17/00*(2006.01)

*G01N 33/68*(2006.01)

*G01N 33/53*(2006.01)

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PGE<sub>2</sub>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PGE<sub>2</sub>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。

1. 一种单克隆抗体或其功能片段,其对下述抗体或其功能片段与PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4的结合进行竞争抑制,且其与PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4的胞外域特异性结合,不与EP1、EP2、EP3结合,抑制使细胞内cAMP浓度上升的PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4的功能,

所述抗体或其功能片段与PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4的胞外域特异性地结合,且不与EP1、EP2、EP3结合,抑制使细胞内cAMP浓度上升的PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4的功能,其互补性决定区域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,互补性决定区域3即CDR3的氨基酸序列由序列编号7表示。

3. 根据权利要求1或2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。

4. 根据权利要求1或2所述的抗体或其功能片段,其特征在于,是人抗体。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的功能片段,其特征在于,是Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、单链抗体、scFv、scFv二聚体或dsFv。

6. 一种医药组合物,其包含权利要求1~5中任一项所述的抗体或其功能片段。

7. 根据权利要求6所述的医药组合物,用于预防或治疗因PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4的功能异常而发病和/或进展的疾病。

8. 根据权利要求7所述的医药组合物,其特征在于,治疗对象疾病为免疫疾病。

9. 根据权利要求7所述的医药组合物,其特征在于,治疗对象疾病为肿瘤。

10. 根据权利要求7所述的医药组合物,其特征在于,治疗对象疾病为疼痛。

11. 一种抗体固定化担载体,是权利要求1~5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。

12. 根据权利要求11所述的抗体固定化担载体,其特征在于,用于与含有PGE<sub>2</sub>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。

13. 一种试剂盒,含有权利要求1~5中任一项所述的抗体,测定细胞表面上的PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4表达量。

## 针对人前列腺素E<sub>2</sub>受体EP<sub>4</sub>的抗体

[0001] 本申请是申请号为201180046998.3、申请日为2011年9月28日、发明名称为“针对人前列腺素E<sub>2</sub>受体EP<sub>4</sub>的抗体”的发明申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及对人前列腺素E<sub>2</sub>受体亚型EP<sub>4</sub>的单克隆抗体。

### 背景技术

[0003] 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A<sub>2</sub>由从膜磷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PGE<sub>1</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGE<sub>3</sub>各组。

[0004] 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PGG<sub>2</sub>而产生PGH<sub>2</sub>,其后,根据氧原子间键的断裂的不同,产生PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>等。进而,由PGE<sub>2</sub>产生PGA<sub>2</sub>、PGC<sub>2</sub>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。

[0005] 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。PGE<sub>2</sub>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。PGE<sub>2</sub>受体简称为EP,已知存在4种亚型(EP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>、EP<sub>4</sub>)。各亚型在生物体内,EP<sub>1</sub>与细胞内Ca<sup>2+</sup>的上升相关,EP<sub>2</sub>和EP<sub>4</sub>与cAMP的上升相关,EP<sub>3</sub>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。

[0006] 报道了将对EP<sub>4</sub>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TH<sub>1</sub>和TH<sub>17</sub>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,PGE<sub>2</sub>由于EP<sub>4</sub>的活化所致的cAMP上升而使IL-23的产生亢进。另外,示出了在TH<sub>17</sub>细胞中,PGE<sub>2</sub>与IL-23协调地导致TH<sub>17</sub>细胞的增殖。示出了在TH<sub>17</sub>细胞中,EP<sub>4</sub>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,PGE<sub>2</sub>受体、特别是EP<sub>4</sub>选择性拮抗剂对治疗因TH<sub>1</sub>或TH<sub>17</sub>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)。

[0007] 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PGE<sub>2</sub>对癌组织或周边组织起作用,与癌的发展有关。例如,示出了PGE<sub>2</sub>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,PGE<sub>2</sub>介由EP<sub>4</sub>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。

[0008] 已知NK细胞具有直接攻击癌细胞的作用,但PGE<sub>2</sub>抑制该作用。作为PGE<sub>2</sub>抑制NK细胞活性的机制,显示有EP<sub>4</sub>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EP<sub>4</sub>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,PGE<sub>2</sub>对癌的发展很重要。因此,尝试了与PGE<sub>2</sub>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。PGE<sub>2</sub>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。

[0009] 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PGE<sub>2</sub>会使痛觉的过敏性增强。特别是利用多个动物试验证明了PGE<sub>2</sub>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。

[0010] 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PGE<sub>2</sub>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。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 现有技术文献

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献1:日本专利第3118460号

[0017] 非专利文献

[0018] 非专利文献1:Sugimoto等,J.Biol.Chem.,282,11613-11617 2007

[0019] 非专利文献2:Yao等,Nat.Med.,15,633-640 2009

[0020] 非专利文献3:Sakata等,J Pharmacol Sci.,112(1):175.2010

- [0021] 非专利文献4:Robertson FM Cancer.2010Jun 1;116(11Suppl):2806-14.
- [0022] 非专利文献5:Martinet L.Biochem Pharmacol.2010Sep 15;80(6):838-45.
- [0023] 非专利文献6:Sharma SD,MoI Cancer Ther.2010Mar;9(3):569-80.
- [0024] 非专利文献7:Sharma S等Cancer Res.2005Jun 15;65(12):5211-20
- [0025] 非专利文献8:Lin C.-R.等J Pharmacology and Experimental Therapeutics 2006 319:3(1096-1103)
- [0026] 非专利文献9:Popp L.等European Journal of Pain.2009 13:7(691-703)

## 发明内容

- [0027] 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PGE<sub>2</sub>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。
- [0028] 本发明人等尝试了针对人PGE<sub>2</sub>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。
- [0029] 即,本发明是以下的(1)~(21)。
- [0030] (1)一种抗体或其功能片段,其与PGE<sub>2</sub>受体亚型EP4的胞外域结合,抑制EP4的功能。
- [0031] (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。
- [0032] (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。
- [0033] (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。
- [0034] (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。
- [0035] (A)具有:
- [0036] 包含序列编号5表示的氨基酸序列的重链CDR1,
- [0037] 包含序列编号6表示的氨基酸序列的重链CDR2,
- [0038] 包含序列编号7表示的氨基酸序列的重链CDR3,
- [0039] 包含序列编号8表示的氨基酸序列的轻链CDR1,
- [0040] 包含序列编号9表示的氨基酸序列的轻链CDR2,以及
- [0041] 包含序列编号10表示的氨基酸序列的轻链CDR3,
- [0042] (B)具有:
- [0043] 包含序列编号15表示的氨基酸序列的重链CDR1,
- [0044] 包含序列编号16表示的氨基酸序列的重链CDR2,
- [0045] 包含序列编号17表示的氨基酸序列的重链CDR3,
- [0046] 包含序列编号18表示的氨基酸序列的轻链CDR1,
- [0047] 包含序列编号19表示的氨基酸序列的轻链CDR2,以及
- [0048] 包含序列编号20表示的氨基酸序列的轻链CDR3。

- [0049] (C)具有：
- [0050] 包含序列编号45表示的氨基酸序列的重链CDR1，
- [0051] 包含序列编号46表示的氨基酸序列的重链CDR2，
- [0052] 包含序列编号47表示的氨基酸序列的重链CDR3，
- [0053] 包含序列编号48表示的氨基酸序列的轻链CDR1，
- [0054] 包含序列编号49表示的氨基酸序列的轻链CDR2，以及
- [0055] 包含序列编号50表示的氨基酸序列的轻链CDR3。
- [0056] (6)根据上述(1)~(5)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在于，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。
- [0057] (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，
- [0058] (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。
- [0059] (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。
- [0060] (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。
- [0061] (8)根据上述(1)~(7)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在于，是人源化抗体或嵌合抗体。
- [0062] (9)根据上述(1)~(7)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在于，是人抗体。
- [0063] (10)根据上述(1)~(9)中任一项所述的抗体或其功能片段，其特征在于，是抗体片段、单链抗体、或双体抗体。
- [0064] (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。
- [0065] (12)一种载体，其包含上述(11)所述的核酸。
- [0066] (13)一种细胞，其导入了上述(12)所述的载体。
- [0067] (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。
- [0068] (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。
- [0069] (16)根据上述(15)所述的医药组合物，其特征在于，治疗对象疾病为免疫疾病。
- [0070] (17)根据上述(15)所述的医药组合物，其特征在于，治疗对象疾病为肿瘤。
- [0071] (18)根据上述(15)所述的医药组合物，其特征在于，治疗对象疾病为疼痛。
- [0072] (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。
- [0073] (20)根据上述(19)所述的抗体固定化担载体，其特征在于，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。
- [0074] (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。

[0075] 根据本发明,首先提供特异性抑制EP4的功能的抗体。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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

[0079] 图1是解析小鼠同型对照抗体和NBG016-mAb14、NBG016-mAb21对母株FIp-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2是解析小鼠同型对照抗体和NBG016-mAb9对母株FIp-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。

[0081] 图3是解析小鼠同型对照抗体和NBG016-mAb14、NBG016-mAb21对PGE<sub>2</sub>诱发的cAMP上升的抑制效果的结果。

[0082] 图4是解析小鼠同型对照抗体和NBG016-mAb9对PGE<sub>2</sub>诱发的cAMP上升的抑制效果的结果。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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FIp-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FIp-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。

[0090] 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FIp-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PGE<sub>2</sub>诱发的cAMP上升的抑制效果的结果。

[0091] 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FIp-

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

[0092] 本发明是与人PGE<sub>2</sub>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。

[0093] EP4蛋白质的定义

[0094] 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。

[0095] 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)。

[0096] 1~19:N末端结构域

[0097] 44~54:细胞内第1环状结构域

[0098] 80~96:细胞外第1环状结构域

[0099] 116~135:细胞内第2环状结构域

[0100] 161~184:细胞外第2环状结构域

[0101] 212~267:细胞内第3环状结构域

[0102] 296~312:细胞外第3环状结构域

[0103] 333~488:C末端结构域

[0104] 抗体或功能性抗体的定义

[0105] 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')<sub>2</sub>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内。

[0106] 对EP4的特异性功能性抗体的定义和评价方法

[0107] 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PGE<sub>2</sub>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。

[0108] 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0.01~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与人EP4表达宿主细胞接触后,进一步以 $10^{-12}$ ~ $10^{-6}\text{M}$ 的浓度使PGE<sub>2</sub>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<sub>2</sub>而诱发的cAMP的上升。

[0109] 另外,使抗体以0.01~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与天然表达人EP4的细胞株(例如人巨噬细胞)接触后,使PGE<sub>2</sub>以 $10^{-12}$ ~ $10^{-6}\text{M}$ 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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。

[0110] 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>所致的细胞的增殖性的增加为指标可评价功能抑制。

[0111] 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 $10^6$ ~ $10^7$ 个的细胞数进行接种。接种之后立刻将本发明的抗体以0.1~0.5mg/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。

[0112] 本发明的抗体的详细定义

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 与本发明的抗体相同的抗原表位的定义

[0116] 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。

[0117] 本发明的抗体的取得方法

[0118] 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, Nature 256:495 (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., Nature 352:624-628 (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),抗体变异体,以及其功能片段(美国专利第4816567号; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 作为载体的种类,没有特别限定,根据其后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。

[0126] 本发明的嵌合抗体的定义和生产方法

[0127] 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.NatI.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,根据其后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。

[0128] 本发明的人型抗体的定义和生产方法

[0129] 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.NatI.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。

[0130] 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。

[0131] 本发明的人抗体的定义和生产方法

[0132] 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.NatI.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 OpthaImoIogy&VisuaI Science.,(2002)43(7),2301-8;Carmen,S.et.al.,Briefings in FunctionaI Genomics and Proteomics,(2002)1(2),189-203;Siriwardena,D.et.al., OpthaImoIogy,(2002)109(3),427-431等)。

[0133] 本发明的抗体的功能片段

[0134] 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')<sub>2</sub>、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。

[0135] 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。

[0136] 另外,F(ab')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>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。

[0137] Fab'是切断上述F(ab')<sub>2</sub>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。

[0138] 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。

[0139] 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式scFv的cDNA,利用基因工程的方法而制成。

[0140] 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。

[0141] 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的肽可以直接或介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,根据其后导入的宿主细胞的种类等适当地进行选择即可。可以通过为了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(芴甲基氧基羰基法)和tBoc法(叔丁基氧基羰基法)等的化学合成法进行制造。

[0142] 本发明的抗体的精制

[0143] 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的亲色谱法进行简便地精制。

[0144] 包含本发明的抗体的医药

[0145] 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。

[0146] 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。

[0147] 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、变形性关节炎、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。

[0148] 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。

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 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,以及口腔溃疡、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。

[0154] 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。

[0155] 含有本发明的抗体的医药组合物

[0156] 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、 $\delta$ -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。

[0157] 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。

[0158] 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。

[0159] 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。

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] 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。

[0163] 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)。

[0164] 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。

[0165] 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。

[0166] 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材料构成。

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] 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。

[0172] 本发明的抗体固定化担载体

[0173] 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。

[0174] 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。

[0175] 作为担载体的形状,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担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。

[0176] 组合本发明的抗体固定化担载体和其它的构成要素,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。

[0177] 含有本发明的抗EP4抗体的诊断用试剂盒

[0178] 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、E1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。

[0179] 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。

[0180] 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。

[0181] 实施例

[0182] (1)人EP4表达载体pcDNA-DEST40-hEP4的制作

[0183] 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'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC-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 $\alpha$ 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。

[0184] (2)人EP4表达293FT细胞的制备

[0185] 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Lipofectamine 2000(Invitrogen公司制)25 $\mu$ L基于使用说明书将上述的pcDNA-DEST40-hEP4质粒DNA10 $\mu$ 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℃,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。

[0186] 因此,将该人EP4表达293FT细胞作为致敏抗原使用。

[0187] (3)免疫

[0188] 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。

[0189] (4)杂交瘤的制作

[0190] 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、100μg/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100μL/孔的比例接种,在37℃、5%CO<sub>2</sub>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。

[0191] (5)人EP4稳定表达NS0细胞株的构建

[0192] 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×HIS标签的融合蛋白质。

[0193] 对在含有10%的牛胎儿血清、100单位/mL青霉素、100μg/mL链霉素(Invitrogen公司制)的RPM1培养基中培养的小鼠骨髓瘤NS0细胞(理化学研究所细胞库)1×10<sup>7</sup>细胞,使用Lipofectamin LTX(Invitrogen公司制)35μL和PlusReagent(Invitrogen公司制)14μL,根据使用说明书将pEF-DEST51-hEP4质粒14μg进行基因导入。从基因导入的次日开始,在加入了2.5μg/mL的抗物质杀稻瘟菌素(Invitrogen公司制)的RPM1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。

[0194] 将得到的杀稻瘟菌素耐性NS0细胞用FcBlock(Becton Dickinson公司制)在4℃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。

[0195] (6)抗EP4抗体产生杂交瘤的筛选

[0196] 将(5)中制成的人EP4稳定表达NS0细胞株2×10<sup>5</sup>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50μL。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。

[0197] 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FERM BP-11403。

[0198] (7)抗EP4抗体的精制

[0199] 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, $\kappa$ )。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。

[0200] 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, $\kappa$ )的精制IgG。该精制抗体为NBG016-mAb9。

[0201] (8)人EP4稳定表达CHO细胞株的制作

[0202] 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×His标签的融合蛋白质。

[0203] 对在含有10%的牛胎儿血清和100单位/mL青霉素、100 $\mu$ 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Lipofectamine 2000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 $\mu$ 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。

[0204] 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。

[0205] (9)抗人EP4抗体与人EP4表达细胞的结合试验

[0206] 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 $5 \times 10^5$ 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 $\mu$ 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。

[0207] 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。

[0208] 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。

[0209] (10)抗体对PGE<sub>2</sub>所致的cAMP产生的抑制试验

[0210] 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0.05~30 $\mu$ g/mL,在室温下精置15分钟。接着以成为 $5 \times 10^{-11}$ M的方式加入PGE<sub>2</sub>(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ARVO 1420HTS(Perkin Elmer公司制)进行测定。

[0211] 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<sub>2</sub>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OriginPro 8.1(OriginLab公司制)进行利用逻辑函数的解析,其结果1C<sub>50</sub>值,NBG016-mAb14为0.15 $\mu$ g/mL(约1.0nM),NBG016-mAb21为0.24 $\mu$ g/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。

[0212] 同样地对于NBG016-mAb9,将添加 $1.5 \times 10^{-10}$ PGE<sub>2</sub>进行的试验的结果示于图4。进行上述的解析后,NBG016-mAb9的1C<sub>50</sub>值为4.6 $\mu$ g/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。

[0213] (11)人EP1~4、小鼠EP1~4的表达载体制作

[0214] 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CACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGTTCCAGTTCCTGCTGCTGAC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-hEP2、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PGE<sub>2</sub>受体的C末端附加了Cycle 3Green Fluor escent Protein(GFP)的融合蛋白质。

[0215] (12)抗EP4抗体的结合特异性试验

[0216] 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 $\mu$ g使用Lipofectamine 2000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。

[0217] 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PGE<sub>2</sub>受体亚型各自的瞬时表达293FT细胞使用 $5 \times 10^5$ 个,作为一次抗体使用1 $\mu$ g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。

[0218] 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PGE<sub>2</sub>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PGE<sub>2</sub>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。

[0219] 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PGE<sub>2</sub>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。

[0220] (13)人淋巴细胞与抗EP4抗体的结合性试验

[0221] 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。

[0222] 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 $9 \times 10^5$ 个,作为一次抗体使用NBG016-mAb14、NBG016-mAb21或小鼠同型对照抗体1.5 $\mu$ g,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。

[0223] 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。

[0224] 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。

[0225] (14)PMA刺激THP1的利用抗EP4抗体的免疫染色

[0226] 人单核系THP1细胞株在含有PMA(Phorbol 12-myristate13-acetate,Sigma Aldrich公司制)100nM的RPM1培养基中,在4孔培养板(Becton Dickinson公司制)上以每孔有 $1.5 \times 10^5$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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(P1)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。

[0227] 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P1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。

[0228] (15)抗EP4抗体对PGE<sub>2</sub>所致的细胞因子抑制效果的抑制

[0229] 已知PGE<sub>2</sub>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PGE<sub>2</sub>所致的抑制细胞因子产生恢复。THP1细胞株在含有PMA 100nM的RPM1培养基中在48孔细胞培养板上每1孔接种2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>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 $\mu$ g/mL的RPM1培养基,孵育30分钟。接下来,以成为20nM的方式加入PGE<sub>2</sub>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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 的量。

[0230] 另一方面,向回收培养上清后的细胞中,加入以RPM1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ARVO 1420HTS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 $\alpha$ 生产量。本发明的抗体恢复PGE<sub>2</sub>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 $\alpha$ 量为恢复率100%,以加入LPS刺激和PGE<sub>2</sub>的孔的TNF $\alpha$ 量为恢复率0%,计算加入LPS刺激、PGE<sub>2</sub>和该抗体时的恢复率。

[0231] 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PGE<sub>2</sub>所致的抑制TNF $\alpha$ 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PGE<sub>2</sub>所致的抑制TNF $\alpha$ 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。

[0232] [表1]

[0233] 试验1

	LPS	PGE <sub>2</sub>	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF $\alpha$ 浓度 $\pm$ SD (pg/mL)	恢复率 $\pm$ SD (%)
[0234]	-	-	-	177.1	
	+	-	-	530.0 $\pm$ 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

## [0235] 试验2

	LPS	PGE <sub>2</sub>	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF $\alpha$ 浓度 $\pm$ SD (pg/mL)	恢复率 $\pm$ SD (%)
[0236]	-	-	-	68.2 $\pm$ 8.3	
	+	-	-	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 $\pm$ 8.5

## [0237] (16)编码抗EP4抗体的可变区域的cDNA的分离、解析

[0238] 由产生抗EP4抗体的杂交瘤(NBG016-mAb14、NBG016-mAb21)约 $1 \times 10^7$ 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 $\kappa$ 相当的引物。用于重链可变区域扩增的3'引物为5'-AGGGGCCAGTGGATAGACCGATG-3'(序列编号33)和5'-GGCTGTTGTTTGGCTGCAGAGAC-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。

[0239] 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。

[0240] 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。

[0241] 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。

[0242] 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。

[0243] 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。

[0244] (17)抗EP4抗体基因的克隆

[0245] 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'-CACTGACCCTACGCGTATGGAATGGAGATGGATCTTCTCTTC-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'-TTGCAGCCAGGAACGCGTATGGACATGAGGACCCCTGCT-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。

[0246] 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。

[0247] 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。

[0248] 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。

[0249] 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'-CACTAGAGCCCCATACGCGTATGGCTGTCCTGGTGCTGTTCC-3'(序列编号51),3'引物为5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCCGAGAGTGGGAGAG-3'(序列编号52)。用于轻链基因扩增的5'

引物为5'-TCCTCAGGTTGCCTCACGCGTATGAAGTTGCCTGTTAG-3'(序列编号53)和5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAACACTCATTCTGTTGAAGCT-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。

[0250] 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。

[0251] (18)得到的抗体基因序列编码抗EP4抗体的确认

[0252] 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BglII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-BglII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Lipofectamine 2000转导到293FT细胞,进行瞬时的抗体表达。

[0253] 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。

[0254] 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。

[0255] 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F1p-1n-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。

[0256] (19)重组抗EP4抗体稳定表达CHO细胞的制作

[0257] 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Lipofectamine 2000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 $\mu$ 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。

[0258] 将分离的CHO-K1细胞接种在24孔板上,在含有10 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

[0259] 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Maxisorp 96孔板(Nunc公司制),在4 $^{\circ}$ C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%Tween 20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%Tween 20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 $\mu$ L,在室温静置5分钟后,加入100 $\mu$ 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。

[0260] (20)重组抗EP4抗体与人EP4稳定表达CHO细胞株的结合试验

[0261] 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 $5 \times 10^5$ 个细胞使用1 $\mu$ g。二次抗体使用PE标记抗小鼠IgG抗体。

[0262] 图11示出其结果。将母株Flp-1n-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。

[0263] (21)小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21表达载体的制作

[0264] (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'-CACTGACCCTACGCGTATGGAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3'(序列编号37)和5'-GACAGATGGGGTGTCTTTTAGCGCTAGAGACAGTGACCAGAGTCCC-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'-GGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGCGCTAAAACGACACCCCATCTGTC-3'(序列编号59)和5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAG-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Mlu1和Not1切断扩增得到的DNA片段,插入到表达载体pEHX1.1的Mlu1-Not1位置。用限制酶EcoR1和Bg111切断得到的表达载体,插入NBG016-mAb21的轻链基因片段(EcoR1-Bg111片段),制成小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21表达载体。

[0265] (22)小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21稳定表达株制作方法

[0266] 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)( $2.5 \times 10^5$  cells/ml)分注到24孔板的2孔各1ml。将Opti-MEM 136 $\mu$ l、Lipofectamine 2000 15 $\mu$ l和用限制酶Ssp1切断的小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21表达载体4 $\mu$ 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 $\mu$ l,在CO<sub>2</sub>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的嘌呤霉素3 $\mu$ l,另一个孔中添加4 $\mu$ 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5 cells/ml的方式悬浮在Conditioned medium(每1l混合EX-CELL CD CHO培养基700ml、浮游CHO-K1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 $\mu$ l。1周后添加Conditioned medium100 $\mu$ l,进一步培养1周。多次继代培养后,在24孔板中加入500 $\mu$ l耐药性细胞( $4 \times 10^4$  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。

[0267] (23)小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21的精制

[0268] 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 $\mu$ g/ml嘌呤毒素的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。

[0269] (24)小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21与人EP4的结合试验

[0270] 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-1n-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。

[0271] (25)小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21对PGE<sub>2</sub>所致的cAMP产生的抑制试验

[0272] 与(10)同样地研究小鼠IgG1型抗体NBG016-mAb21是否抑制PGE<sub>2</sub>所致的cAMP产生。使细胞和抗体在室温反应15分钟后,以成为 $1.5 \times 10^{-10}$ M的方式加入PGE<sub>2</sub>,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。

[0273] 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<sub>2</sub>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。 $IC_{50}$ 值为 $1.1 \mu$ 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。

[0274] (26)人嵌合型抗体NBG016-mAb14和21的制作

[0275] 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'-CACTGACCCTAAGCTTATGGAATGGAGATGGATCTTTCTCTTC-3'(序列编号60)和5'-GGCTGTTGTGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT-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 $\gamma$ 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'-ATTGCAGCCAGGAGAATTCATGGACATGAGGACCCCTGCT-3'(序列编号62)和5'-GGTGCAGCATCCGTACGTTTTATTTCCAACCTTTGTCCC-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 $\kappa$ X2.1的BsiWI-EcoRI位置。

[0276] 用限制酶BgIII、NotI、ScaI切断插入了轻链基因的pEL $\kappa$ 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 $\gamma$ X1.1的BgIII-NotI位置,制成保持轻链和重链双方的基因的质粒。使用Lipofectamine 2000将该质粒转导到293FT细胞,进行瞬时的抗体表达。

[0277] 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-1n-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。

[0278] 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)。

[0279] 产业上的可利用性

[0280] 本发明提供的抗体特异性地抑制人PGE<sub>2</sub>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。

序列表

<110> 株式会社NB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> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 435

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 1

atggaatgga gatggatctt tccttctctc ctgtcaggaa ctacagggtg ccactctgag	60
atccagctgc agcagctctgg acctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaaggtatca	120
tgcaaggett ctggttctcc attttctacc tacaaeatat actgggtgat ccagagecat	180
ggaaagcgcc ttgagtggat tggataiait gatccttaca atggtggtac ttctacaac	240
cagaagttaa ggggcaagge cacattgact gttgacaagt cctccagcac agectacaig	300
cctctcaaca gactgacttc tgaggactct gcagctait actgtgcaag aagaigtgat	360
acttacgacg gggactggtt tgccttactgg ggccaagga cctgtgtcac tgtctctgca	420
gccaaaacaa cagcc	435

[0001]

<210> 2

<211> 145

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

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 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	

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 ggaccctgc tcagtttcit ggaatcttgt tgcctcgttt tccaggtatc 60  
 aaatgtgaca tcaagatgac ccagtetcca tcttccatgt atgtatctct aggagagaga 120  
 gteactatca cttgcaaggc gagtcaggac attaantaggt atttaagctg gticcagcag 180  
 aaaccaggga aatctcctaa gaccctgatc tctcgtgcaa acagattggt agatggagtc 240  
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg ctagattatt ctctcaccat cagcagcctg 300  
 gagtatgaag atatgggaaa ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc attcacgttc 360  
 ggctcgggga cnaagttgga aatanaacgg gctgatgctg caccaaactgt atcca 415

<210> 4  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

[0002]

<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

<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

[0003]

<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

<400> 11  
atggaatgga gatggatctt tctcttctctc ctgtcaggaa ctacaggtgt ccactctgag 60  
atccagctgc agcagctctgg acctgaactg gtgnagcctg ggccttcagt gaaggtatca 120  
tgcaaggctt ctggttttcc attctctacc tacaacatai actgggtgat ccagagccat 180  
ggaaagagcc ttgagtggat tggatatatt gatccttaca atggtggtac ttcctacaac 240  
cagaanttca ggggcaagcc cacattgact gttgacaagt cctccagcac agcctacatg 300  
catctcaaca gcttgacttc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag aagatggtat 360  
acttacgacg gggactgggt tgcttactgg ggccaagga ctctggtcac tgtctctgca 420  
gccaaaacaa cagcc 435

<210> 12  
<211> 145  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<220>  
<221> 结构域  
<222> (50)..(54)  
<223> CDR1

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

[0004]

<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

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  
 atggacaatga ggaccacctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgctctggtt tccaggtatc 60  
 aaatgtgaca tcaagatgac ccagttctca tcttccatgt atgtatctct aggagagaga 120  
 gtcactatca cttgcaaggc gagtcaggac afaaatagat atttaagctg gticcagcag 180  
 aaaccaggga aatctctctaa gaccctgac tctcgtgcaa acagaatgtt agatggggtc 240  
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg caagattatt ctctcaccat cagcagcctg 300  
 gaatacgaag ataatggaaa ttattatigt ctacagtatg atgagtticc tttcacgttc 360  
 ggcctcgsgga caaagtggga aataaaacgg gctgatgctg caccaactgt atcca 415

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

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

[0005]

<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



<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 20

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 488  
 <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

[0007]

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

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

[0008] 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 gatggatctt tctcttctc ctgtcaggaa ctacaggtgt ccactctgag 60

atcagctgc agcagctcgg acctgaactg gtaagcctg ggccttcagt gaaggtatea 120

tgcaaggcctt ctggttttcc attttctacc tacaacatat actgggtgat ccagagccat 180  
 ggaaaagcgc ttgagtggat tggatatatt gatccttaca atggtggtac ttctacaac 240  
 cagaagtca ggggcaaggc caeatgact gttgacaagt cctccagcac agcctacatg 300  
 catctcaaca gactgaette tgaggactct gcagctctatt actgtgcaag aagatgggat 360  
 acttacgacg gggactggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggteac tgtctctgca 420  
 gccaaaaaca cagecccatc ggctatcca ctggcccctg tgtgiggaga tacaactggc 480  
 tctctggta ctctaggatg cctggtaag ggttatitcc ctgagccagt gaccttgacc 540  
 tggaaactctg gatccctgtc cagtgggtg cacaccttc cagctgtcct gcagctgac 600  
 ctctacacc tcagcagctc agtgactgta acctcgagca cctggcccag ccagtccatc 660  
 acctgcaatg tggcccacc ggcaagcagc accaaggtg acaagaaaat tgagcccaga 720  
 ggcccacaa tcaagcccctg tctctcatgc aaatgcccag caactaaect ctgggtgga 780  
 ccatcctgt tcatcttccc tccaaagatc aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc 840  
 atagtcacat gtgtgggtgt ggatgtgagc gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg 900  
 ttigtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac 960  
 agtactctcc ggggtggtcag tgccttccc atccagcacc aggaactggat gactggcaag 1020  
 gacttcaaat gcaaggtaaa caacaaagac ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca 1080  
 aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct tgccttccc agaagaagag 1140  
 atgactaaga aacaggtaac tctgacctgc atggtaacag acttcatgac tgaagacatt 1200  
 tactgtgagt ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc 1260  
 ctggactctg atggttctta ctctatgtac agcaagctga gactggaaaa gaagaactgg 1320  
 gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gctctcacia tcaccacaag 1380  
 aetaagaget tctcccactc tcciggtaaa tga 1413

[0009]

<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

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

[0010] 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

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  
 465 470

<210> 24  
 <211> 711  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠

[0011]

<400> 24  
 atggacatga ggacccctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgctctgggt tccaggtatc 60  
 aaatgtgaca tcaagatgac ccagtcacca tcttccatgt atgtatctct aggagagaga 120  
 gtcactatca ctfgcaaggc gagtcaggac attaataggt atttaagctg gttccagcag 180  
 aaaccaggga aatctcctaa gaccctgac tategtgcaa acagattggt agatggagtc 240  
 ceatcaaggt tcagtgccag tggatctggg ctagattatt ctctcaccat cagcagcctg 300  
 gagtatgaag atatgggaaa ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc attcagftc 360  
 ggctcgggga cnaagttgga aataanaagg gctgatgctg caccnaactgt atccatcttc 420  
 ccaccatcca gtgagcagtt aacatetgga ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac 480  
 ttctacccca aagacatcaa tctcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc 540  
 gtctgaaca gtggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gacgagcacc 600  
 ctacagttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac 660  
 aagacatcaa ctccaccat tgtaagagc ttcaacagga atgagtgtta a 711

<210> 25  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 25  
 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 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 Glu  
165 170 175

Arg Glu 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

[0012] 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 gatggatctt tctcttcctc ctgtcaggaa ctacaggtgt ccactctgag	60
atccagctgc agcagctctgg acctgaactg gtgaagcctg ggcttcagt gaaggtatca	120
tgcaaggctt ctggttttcc attctctacc tacaacatat actgggtgat ccagagecat	180
gaaaagagcc ttgagtggat tggatatatt gatccttaca atggtggtac ttcctacaac	240
cagaaaitca gggcaaggc cacattgact gttgacaagt cctccageac agectacatg	300
catctcaaca gcctgacttc tgaggactct gcagctctatt actgtgcaag aagatggtat	360
acttacgaeg gggactggtt tgcctactgg ggccaaggga ctctggtcac tctctctgca	420
gccaaaacaa cagccccatc ggtctatcca ctggcccctg tgtgtggaga tacaactggc	480
tcctcggatg ctctaggatg cctggtcaag ggttatctcc ctgagccagt gaecttgacc	540
tggaactctg gatcctctgc cagtgtgtg cacaccttcc cagetgtect gcagctctgac	600
ctctacaacc tcagcagctc agtgactgta acctcgagca cctgcccag ccagtccatc	660
acctgcaatg tggcccaccc ggcaagcagc accaaggtgg acaagaaaat tgagcccaga	720

gggcccaaca teaagccctg tccctccatgc aaatgccag cacctaacct ctgggtgga 780  
 ccatecgtet tcatcttccc tccaaagatc aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc 840  
 atagtcacat gigtggtggt ggaigtgagc gaggatgacc cagatgteca gatcagctgg 900  
 ttigtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac 960  
 agtactctcc gggtagtcag tgccctcccc atccagcacc aggactggat gaggggcaag 1020  
 gagticaaat gcaaggtaaa caacaaagac ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca 1080  
 aaacccaaag ggteagtaag agctccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag 1140  
 atgaactaaga aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt 1200  
 tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaaact acaagaacac tgaaccagtc 1260  
 ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga gaggggaaaa gaagaactgg 1320  
 gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacagc 1380  
 actaagagct tctcccactc tccctgtaaa 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

[0013]

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

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

[0014] 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  
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

465 470

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

<400> 28  
 atggacatga ggacccctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgctctggtt tccaggtatc 60  
 aaatgtgaca tcaagaigac ccagtcacca tcctccatgt atgtatctct aggagagaga 120  
 gtcactatca ctigcaagge gagtcaggac attaatagat atttaagctg gttccagcag 180  
 aaacacggga aatctectaa gacctgata tatcgtgcaa acagaaigtg agatggggtc 240  
 ccatcaaggt tcagtggecag tggatctggg caagattatt ctctcaccat cagcagcctg 300  
 gaatacgaag atatgggaaa ttattatftg ctacagtatg atgagtttcc tticacgttc 360  
 ggetcgggga caaagttgga aataaaacgg gctgatgctg caccactgtt atccatcttc 420  
 ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tegtgtgctt cttgaacaac 480  
 ttctacccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc 540  
 gtctctgaaca gttgactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gacgagcacc 600  
 ctcacgttga ceaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac 660  
 aagacatcaa cttcaccat tgcaagagc ttcaacagga atgagtgita a 711

[0015]

<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

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  
 gggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccatgg agacagacac 60  
 actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tcacaggttcc actggtgac 109

[0016]

<210> 31  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 合成的 DNA

<400> 31  
 gaaccagctt tctgtacaa agtggtcctc 30

<210> 32  
 <211> 67  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 合成的 DNA

<400> 32  
 caacatggag acagacacac tctgtctatg ggtactgctg etctgggttc caggttccac 60  
 tggtgac 67

<210> 33  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 合成的 DNA

<400> 33

	aggggccagt ggatagaccg atg	23
	<210> 34	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的 DNA	
	<400> 34	
	ggctgttggt ttggctgcag agac	24
	<210> 35	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的 DNA	
	<400> 35	
	actggatggt ggggaagatgg atac	24
	<210> 36	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的 DNA	
[0017]	<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 accggtatgg aatggagatg gatctttctc ttc	43
	<210> 38	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的 DNA	
	<400> 38	
	ataagaatgc ggccgctcat ttaccaggag agtgggagag	40
	<210> 39	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 合成的 DNA	
	<400> 39	
	ttgcagccag gaacgcgtat ggacatgagg acccctgct	39

<210> 40  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 合成的 DNA  
 <400> 40  
 ataagaatgc ggccgcttaa cactcatfcc tgttgaagct 40

<210> 41  
 <211> 429  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠  
 <400> 41  
 atggctgtcc tgggtctggt cctctgcctg gttgcatttc caagctgtgt cctgtcccag 60  
 gtgcagctga aggagtcagg gcctggcctg gtggcgcctt cacagagcct ttccateact 120  
 tgcactgtct ctgggttttc attaagcagc tatactatac actgggttcg ccagectcca 180  
 ggaaggggtc tggagtggct gggagtgata tggctgggtg gaagcacaaa ctataattcg 240  
 gctcicatgt ctagactcgc cateagcaaa gacacctcca ggagccaagt ttctctaaaa 300  
 gtgaacagtc tgcaaacctg tgactcagcc atatactact gtgccagaaa tgacttcggc 360  
 tacgggtttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc caaaacaaca 420  
 gccaatcgg 429

[0018]

<210> 42  
 <211> 420  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠  
 <400> 42  
 atgaagtfgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagcgat 60  
 gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120  
 tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacat actactggaa acacctatit agaatggtat 180  
 ttgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttcccg ccgattttct 240  
 gsggtcccag acaggttcag tggcactgga tcaggacag atttcacact caggatcagc 300  
 agagtggagg ctgcgatctt gggaatttat tactgctttc aggttcaca tattctctct 360  
 acgttcggtg ctgggaccaa actggagcgg aaacgggctg atgctgcacc 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

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 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 Glu 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

[0019]

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

[0020]

<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 cccatncgcg tatggetgtc cfiggtgctgt tcc

43

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

<220>		
<223>	合成的 DNA	
<400>	52	
	ataagaatgc ggcgctcat ttaccggag agtgggagag	40
<210>	53	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	合成的 DNA	
<400>	53	
	tectcagggtt gcctcacgcg taigaagttg cctgtag	38
<210>	54	
<211>	1383	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	54	
	atggctgtcc tgggtctggt ccctgcctg gttgcaittc caagctgtgt cctgtcccag	60
	gtgcagctga aggagtcagg gccctggcctg gtggcgcctt cacagagcct ttccatcact	120
	tgcactgtct ctgggttttc attaagecgc tatactatac actgggttcg ccagcctcca	180
	ggaaggggtc tggagtgctt gggagtgata tggcctgggt gaagcacaac ctataattcg	240
	gctctcatgt ctgactgagc cctcagcaaa gacacctcca ggagccaagt tttcctaaaa	300
	gtgaacagtc tgcaaacatg tgactcagcc atatactact gtgccagaga tgactctggc	360
[0021]	tacgggtttg ctactctggg ccaaggagct ctggtcactg tctctgcagc caaacgaca	420
	ccccatctg tetatcact ggcccctgga tetgctccc aactaactc catggtgacc	480
	ctgggatgcc tggtaanggg ctatttccct gaccagatga cagtacactg gaactctgga	540
	tccctgtcca ggggtgtgca cacttccca gctgtctcgc agtctgacct ctacactctg	600
	agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgeaacgtt	660
	gccaccctgg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggga ttgtggttgt	720
	aagccttgcg tatgtacagt cccagaagta tcactctgtc tcactctccc cccaaagccc	780
	aaggatgtgc tcaccattac tetgactcct aaggteactg gtgtgtggt agacatcagc	840
	aaggatgate ccgaggtcca gttcagctgg ttgttagatg atgtggaggt gcacacagct	900
	cagacgcaac cccgggagga gcagttcaac agcacttccc gctcagtcag tgaacttccc	960
	atcatgcacc aggactggct caatggcaag gacttcaaat gcagggtcaa cagtgcagct	1020
	ttccctgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gcagaccgaa ggtcccacag	1080
	gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag atggccaagg ataaagtcag tctgaacctg	1140
	atgataacag acttcttccc tgaagacatt actgtggagt ggcagtgaa tggcagcca	1200
	ggggagaact acaagaacac tcagccctc atggacacag atggctctta ctctgtctac	1260
	agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg gaggcaggaa atactticac ctgctctgtg	1320
	ttacatgagg gcctgcacaa ccaccatact gagaagagcc tctcccactc tccgggtaaa	1380
	tga	1383
<210>	55	

<211> 717  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠

<400> 55  
 atgaagtggc ctgttaggct gttagctctg atgttctgga ttctctgcttc cagcagcgat 60  
 gttttgata cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120  
 tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacat actactggaa acacctatit agaatggat 180  
 ttgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aaatttcccg cegattttct 240  
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacagc atttcacact caggatcagc 300  
 agagtggagg ctggcgatct gggaatttat tactgttttc aggtttcaca fattctctct 360  
 acgttcggtg ctgggaccaa actggagcgg aaacggcctg atgetgcacc aactgtatcc 420  
 atcttcccac catccagatga gcagttaaca tctggagtg cctcagtcgt gtgettcttg 480  
 aacaacttct accccaaga catcaatgtc aagtgaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540  
 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaang acagcaccta cagcatgagc 600  
 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660  
 actcacaaga catcaacttc acccattgct aagagcttca acaggaatga gtgttaa 717

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

<400> 56

[0022]

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

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

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

[0023] 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



	<220>		
	<223>	合成的 DNA	
	<400>	58	
		gacagatggg ggtgtcgttt tagcgetaga gacagtgacc agagtccc	48
	<210>	59	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的 DNA	
	<400>	59	
		gggactctgg tcactgtctc tagcgetaaa acgacacccc catctgtc	48
	<210>	60	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的 DNA	
	<400>	60	
		cactgacctt aagcttatgg aatggagatg gatctttctc ttc	43
[0025]	<210>	61	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的 DNA	
	<400>	61	
		ggctgttctg ctagctgcag agacagtgac cagagt	36
	<210>	62	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的 DNA	
	<400>	62	
		attgcagecca ggagaattca tggacatgag gaeccttget	40
	<210>	63	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	合成的 DNA	
	<400>	63	
		gggtcagcat ccgtacgttt tatttccaac ttgtcccc	39

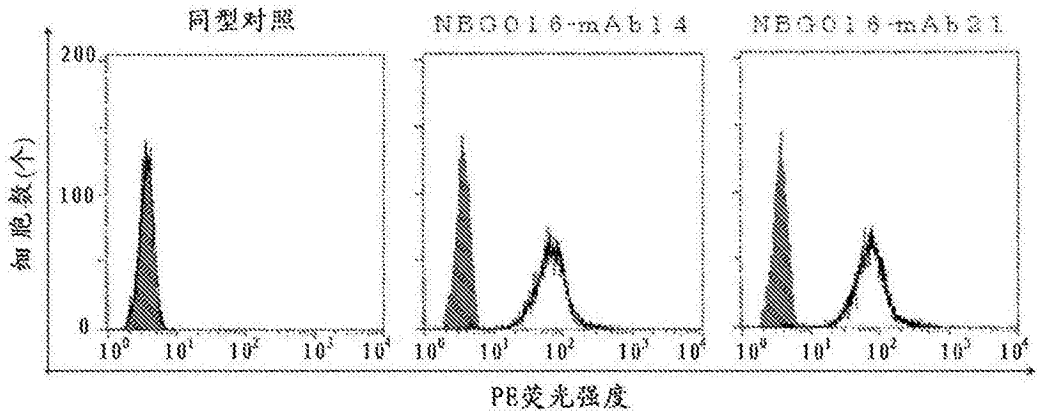


图1

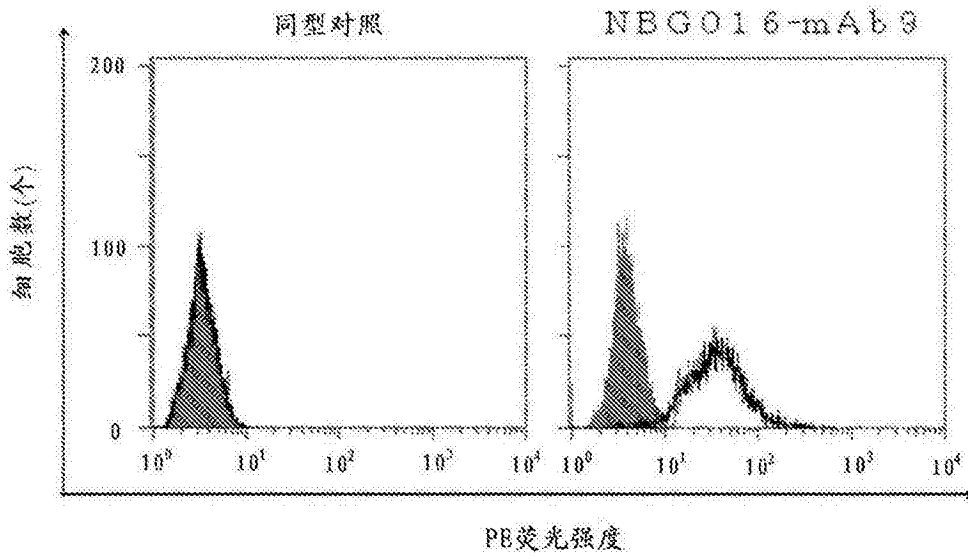


图2

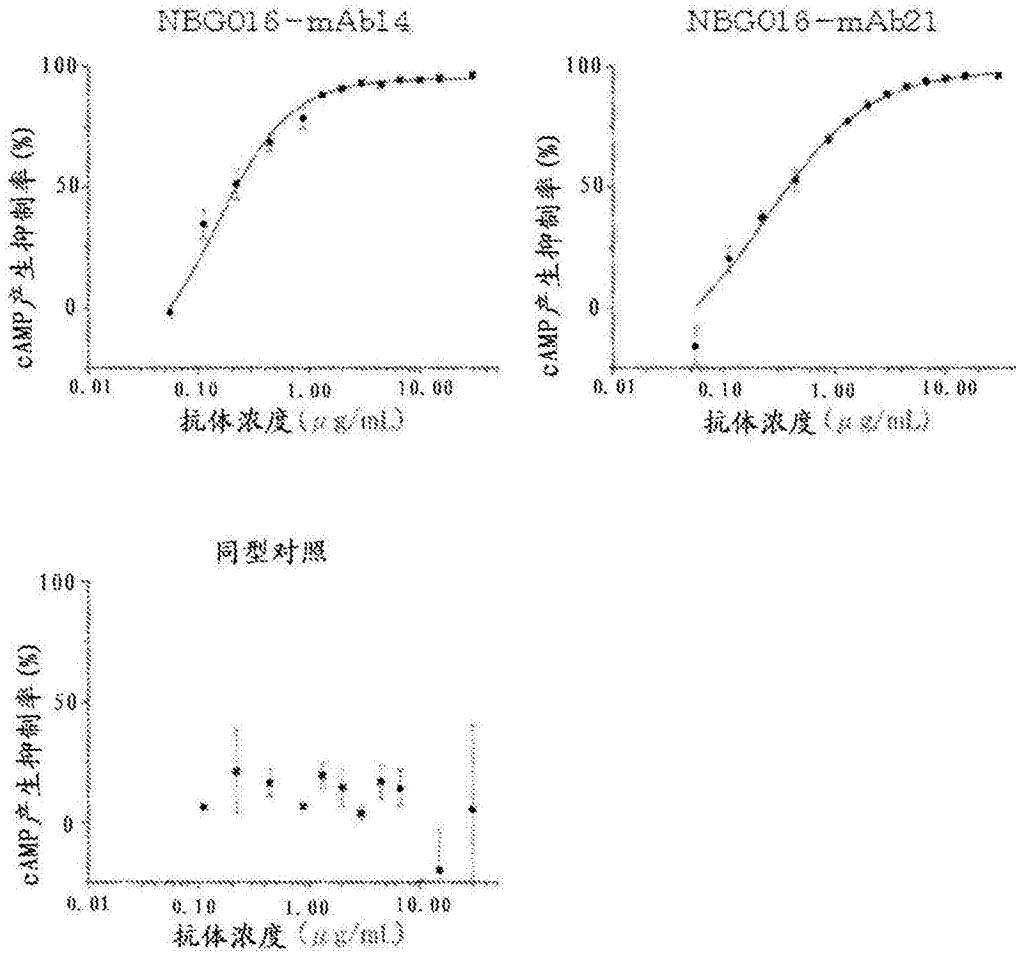


图3

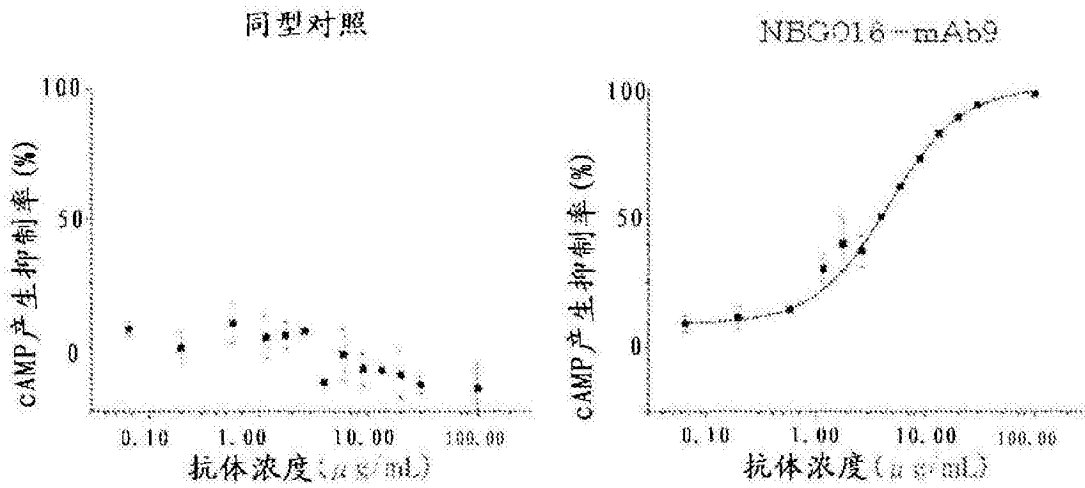


图4

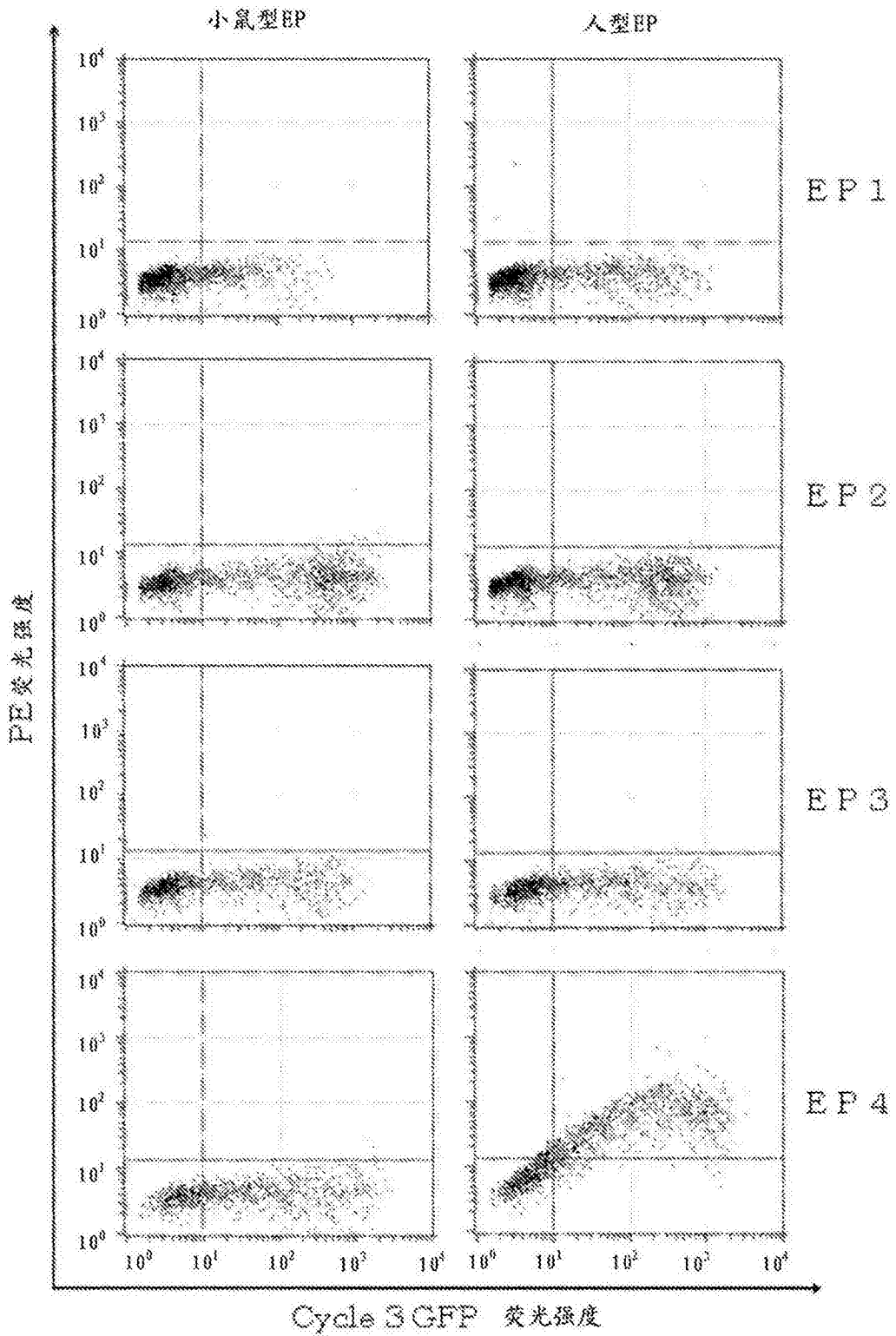


图5

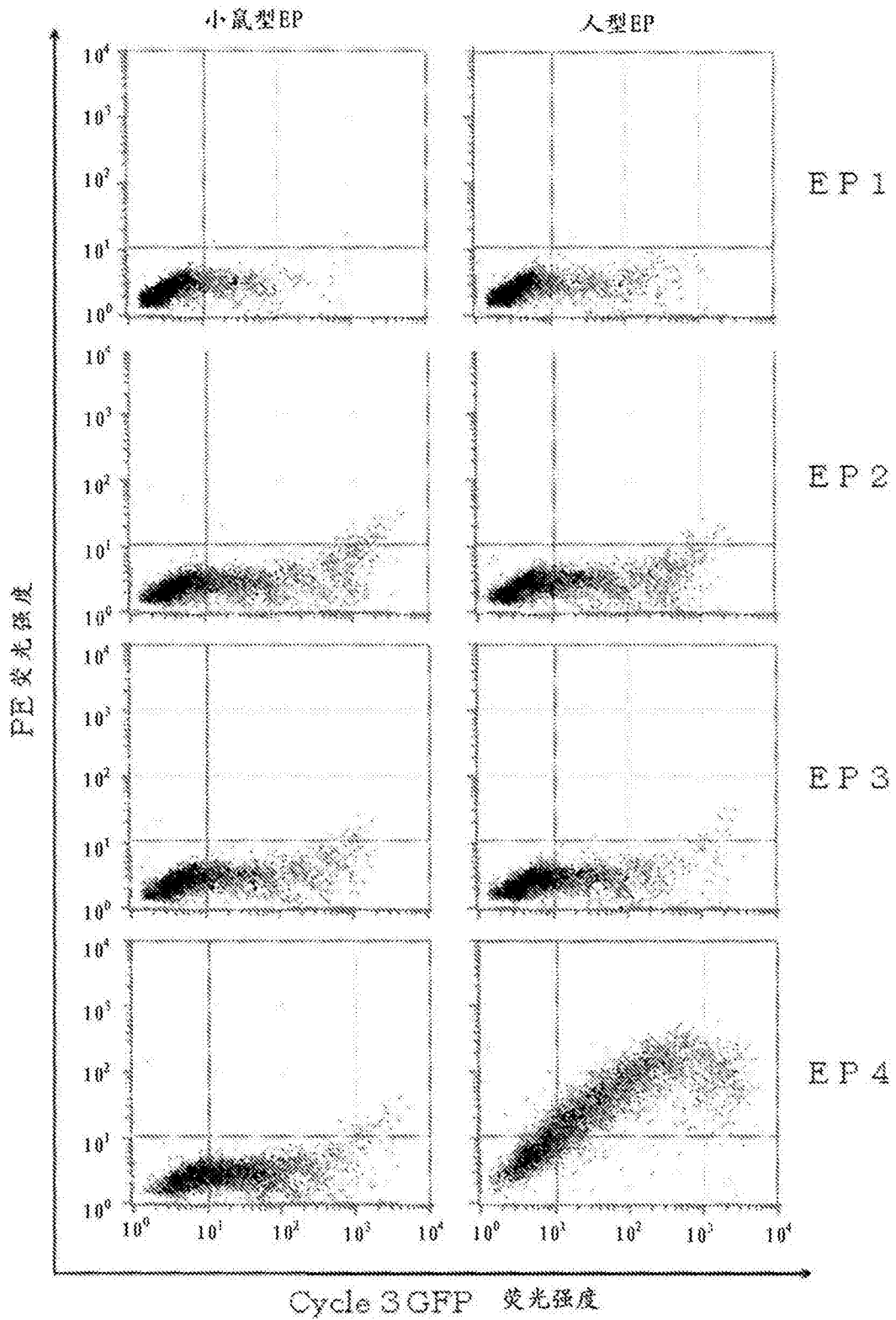


图6

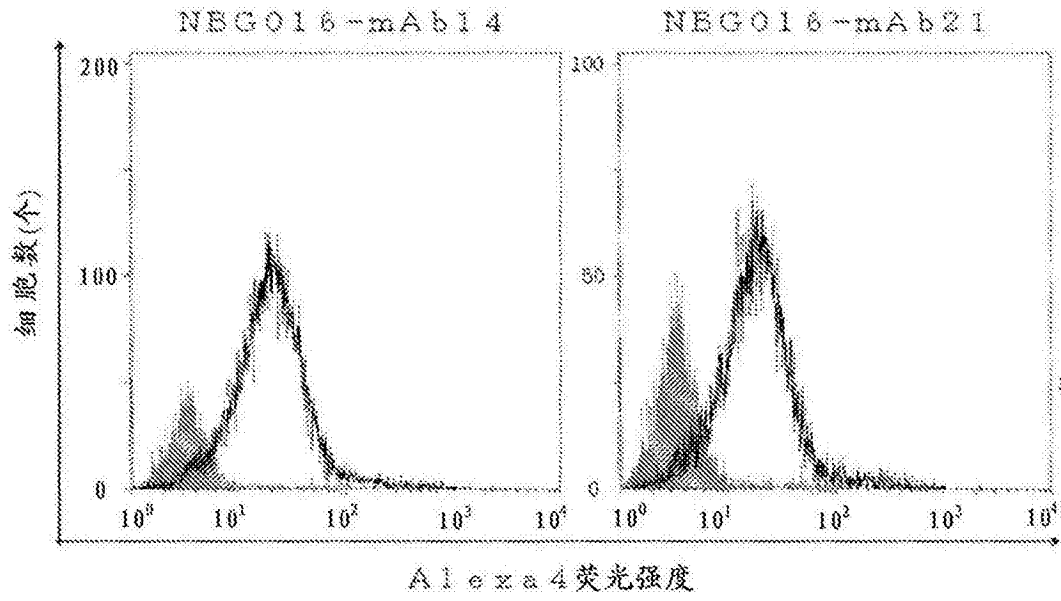


图7

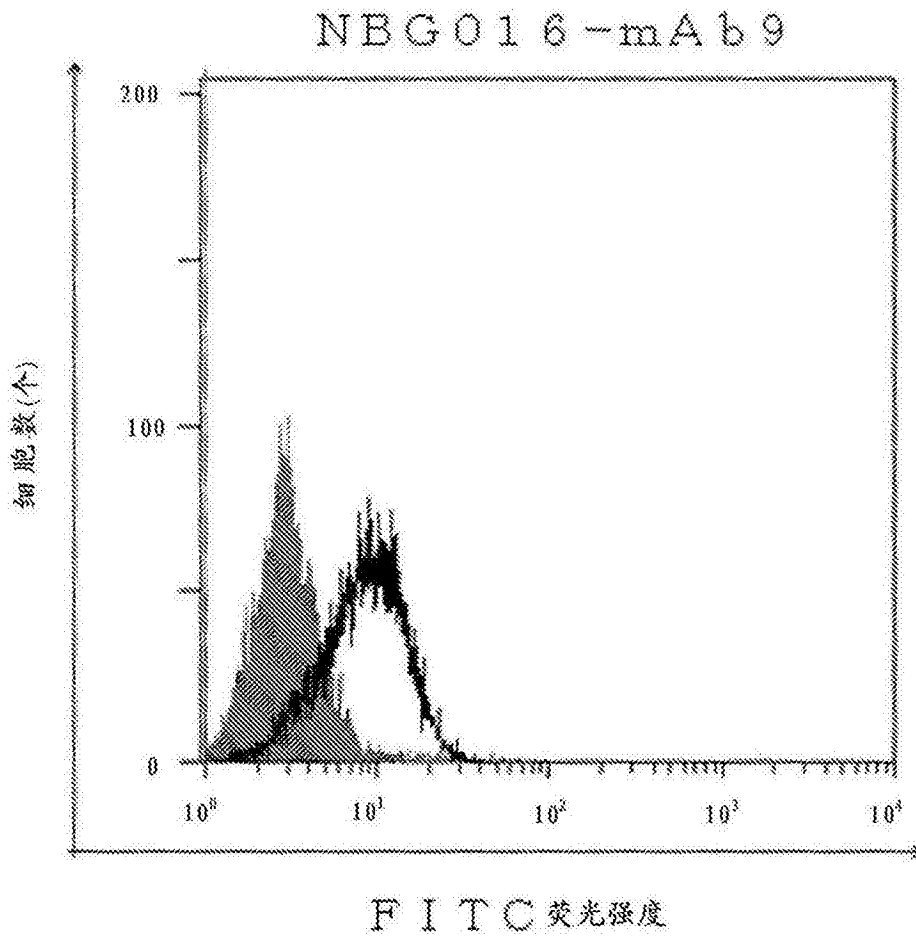


图8

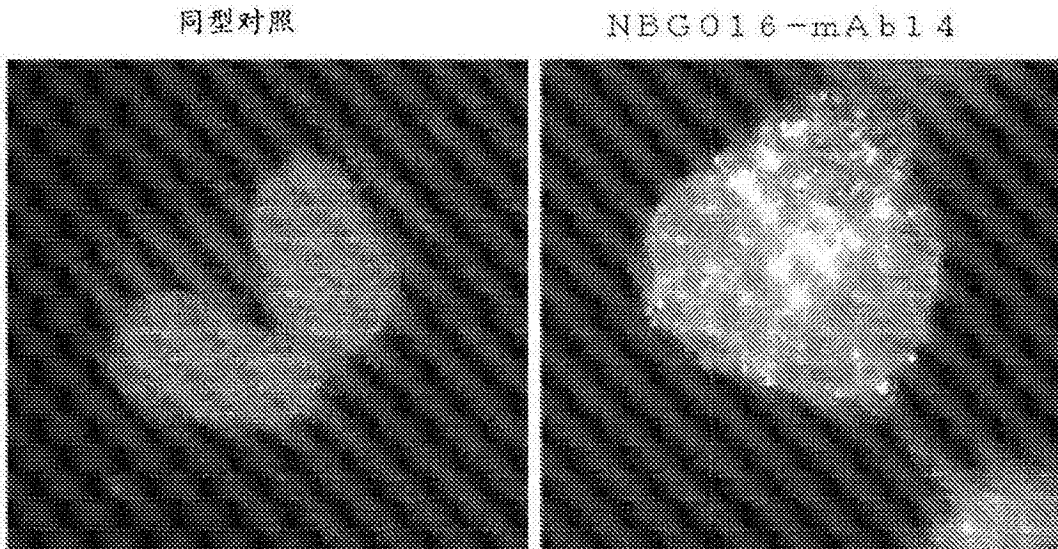


图9

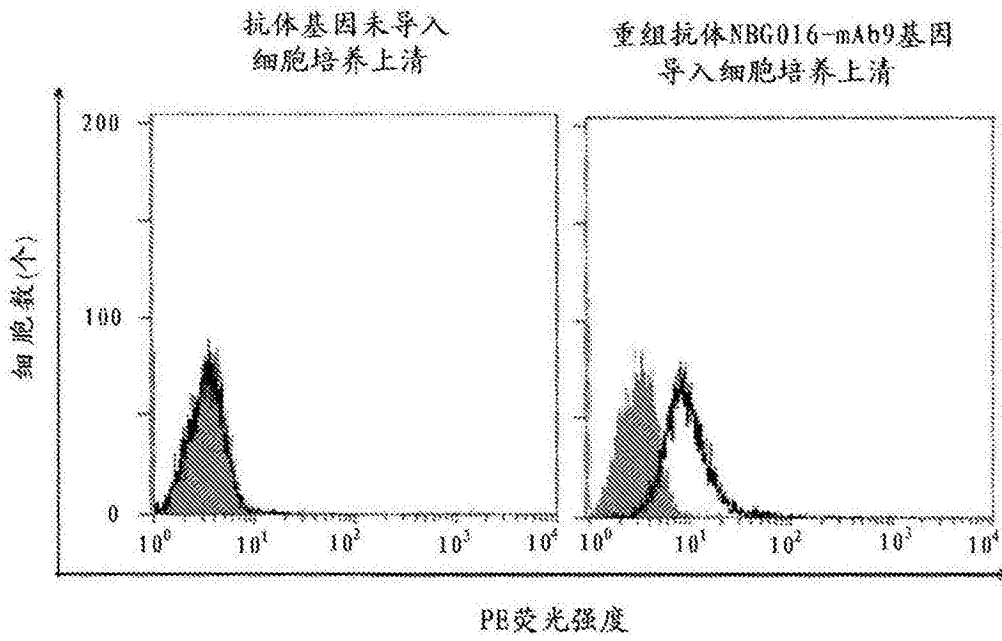


图10

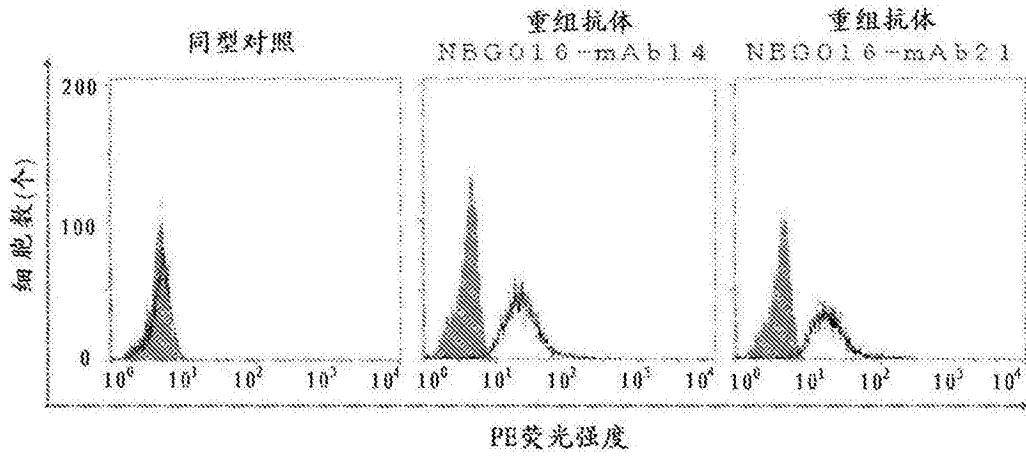


图11

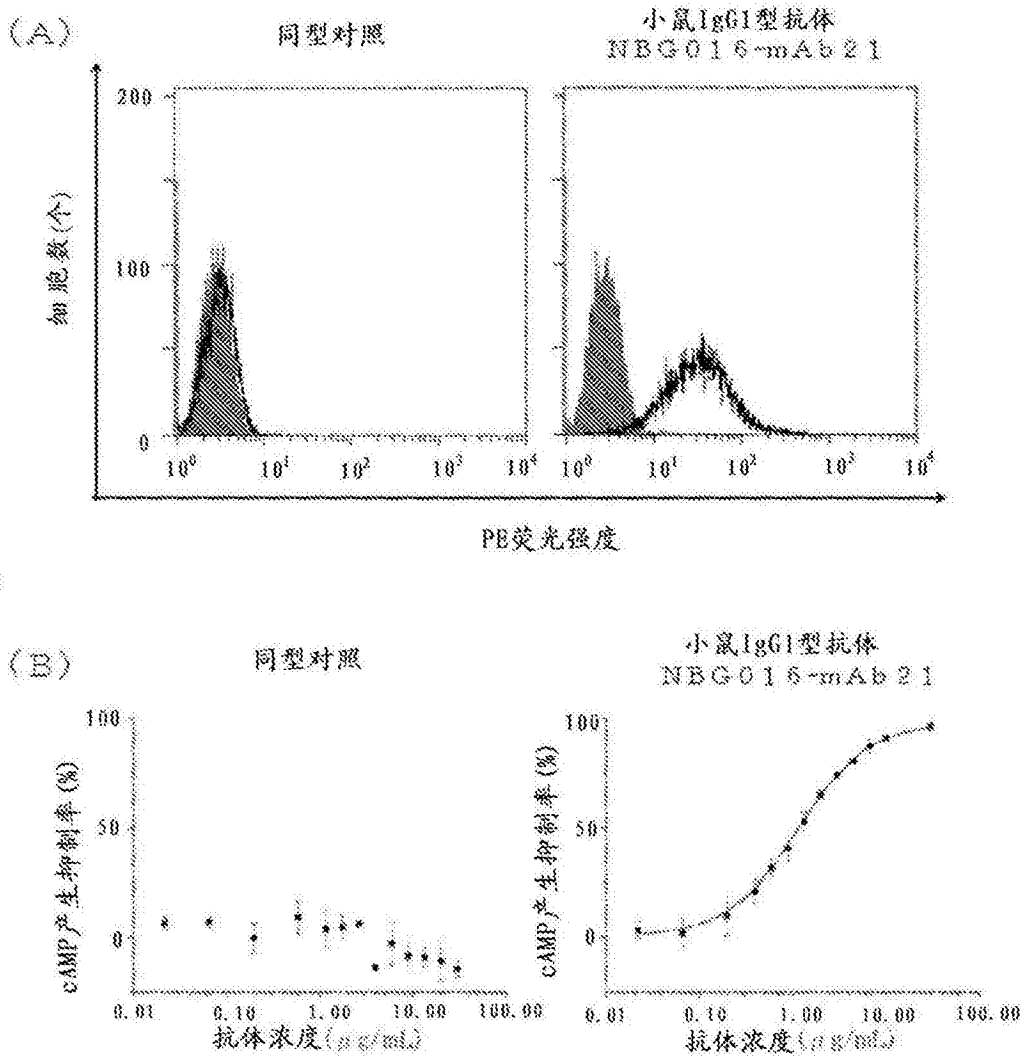


图12

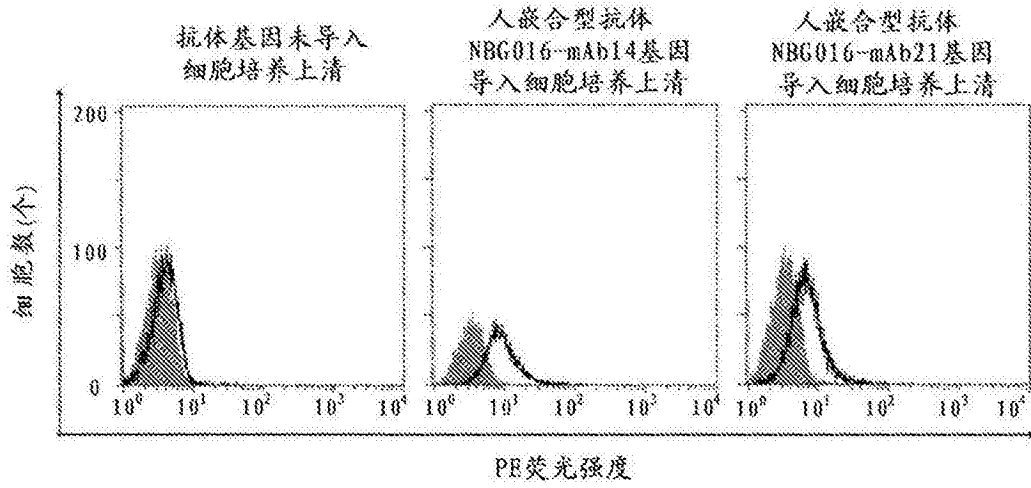


图13

专利名称(译)	针对人前列腺素E2 受体EP4 的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN106046158A</a>	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	CN201610161807.2	申请日	2011-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社NB健康研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社NB健康研究所		
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	C07K16/28 A61K39/395 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K17/00 G01N33/68 G01N33/53		
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		
优先权	2010218158 2010-09-29 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 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 <sub>2</sub>	抗体 (3.0 μg/mL)	TNF $\alpha$ 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