

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6309050号
(P6309050)

(45) 発行日 平成30年4月11日 (2018. 4. 11)

(24) 登録日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
 C O 7 K 16/28 (2006. 01)
 C O 7 K 16/46 (2006. 01)
 C 1 2 P 21/08 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C O 7 K 16/28
 C O 7 K 16/46
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 N 1/15

請求項の数 17 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-140458 (P2016-140458)
 (22) 出願日 平成28年7月15日 (2016. 7. 15)
 (65) 公開番号 特開2017-38592 (P2017-38592A)
 (43) 公開日 平成29年2月23日 (2017. 2. 23)
 審査請求日 平成29年12月22日 (2017. 12. 22)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-141633 (P2015-141633)
 (32) 優先日 平成27年7月15日 (2015. 7. 15)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000001029
 協和発酵キリン株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (74) 代理人 110002000
 特許業務法人栄光特許事務所
 (72) 発明者 亀山 直哉
 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協
 和発酵キリン株式会社本社内
 (72) 発明者 安藤 宗稔
 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協
 和発酵キリン株式会社本社内
 (72) 発明者 小川 進也
 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協
 和発酵キリン株式会社本社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトC R T H 2 に特異的に結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の192番目のグリシンおよび194番目のアスパラギン酸の少なくとも一方を認識し、結合する抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片であり、

以下の (a) ~ (e) からなる群から選ばれるいずれか1つである、抗体または該抗体断片。

(a) 抗体重鎖可変領域 (以下、V Hと略記する) の相補性決定領域 (以下、C D Rと略記する) 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号20 ~ 22で表されるアミノ酸配列を含み、かつ抗体軽鎖可変領域 (以下、V Lと略記する) のC D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号23 ~ 25で表されるアミノ酸配列を含む抗体、

(b) 配列番号49で表されるアミノ酸配列または配列番号49で表されるアミノ酸配列中の18番目のロイシンをメチオニンに、77番目のアスパラギンをセリンに、93番目のバリンをスレオニンに、および117番目のスレオニンをバリンに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含むV H並びに配列番号33で表されるアミノ酸配列または配列番号33で表されるアミノ酸配列中の2番目のイソロイシンをバリンに、4番目のメチオニンをロイシンに、15番目のプロリンをロイシンに、および85番目のアラニンをプロリンに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c) 配列番号49、51、53、55、57および59で表されるアミノ酸配列のいず

10

20

れか1つを含むVH並びに配列番号33、35、37、39、41、43、45および47で表されるアミノ酸配列のいずれか1つを含むVLを含む抗体、並びに

(d) 配列番号17で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号19で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体。

(e) (a) ~ (d) のいずれか1つの抗体の抗体断片であって、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabodyおよびdsFvから選ばれるいずれか1つである抗体断片。

【請求項2】

抗体が、配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の12番目のプロリン、13番目のイソロイシン、14番目のロイシン、15番目のグルタミン酸、177番目のアスパラギン酸、178番目のグリシン、179番目のアルギニン、180番目のイソロイシン、181番目のメチオニン、182番目のシステイン、183番目のチロシン、184番目のチロシン、185番目のアスパラギン、186番目のバリン、187番目のロイシン、188番目のロイシン、189番目のロイシン、195番目のアルギニン、196番目のアスパラギン酸、197番目のアラニン、および198番目のスレオニンからなる群から選ばれるアミノ酸残基の少なくとも1つを認識し、結合する抗体である請求項1に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

【請求項3】

抗体が、以下の(a) ~ (g) からなる群から選ばれるアミノ酸残基の少なくとも1つを認識する抗体である、請求項1または2に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

(a) 配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の12番目のプロリン、14番目のロイシンおよび15番目のグルタミン酸、

(b) 配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の177番目のアスパラギン酸、178番目のグリシン、および179番目のアルギニン、

(c) 配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の180番目のイソロイシンおよび181番目のメチオニン、

(d) 配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の183番目のチロシン、184番目のチロシンおよび185番目のアスパラギン、

(e) 配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の187番目のロイシン、188番目のロイシンおよび189番目のロイシン、

(f) 配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の195番目のアルギニン、並びに

(g) 配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の196番目のアスパラギン酸および198番目のスレオニン。

【請求項4】

抗体が、下記(a) ~ (h) からなる群から選ばれる少なくとも1つの特徴を有する抗体である請求項1 ~ 3のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

(a) ヒトCRTH2のリガンド存在下でヒトCRTH2に対する反応性が低下しない、

(b) 中和活性を有しない、

(c) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を有する、

(d) マスト細胞およびTh1細胞の少なくとも一方に反応しない、

(e) 好酸球、好塩基球、Th2細胞および2型自然リンパ球(ILC2)から選ばれる少なくとも一つの細胞に反応する。

(f) アゴニスト活性を有しない、

(g) ヒトCRTH2のリガンドによるシグナルを増強しない、並びに

(h) 活性化状態または不活性化状態のヒトCRTH2に対する反応性が変化しない。

【請求項5】

抗体が、ヒトFc領域を含む抗体である、請求項1 ~ 4のうちのいずれか1項に記載の

抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

【請求項 6】

抗体が、モノクローナル抗体である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

【請求項 7】

抗体が、遺伝子組換え抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

【請求項 8】

遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 C D R 移植抗体およびヒト抗体から選ばれるいずれか 1 つの遺伝子組換え抗体である、請求項 7 に記載の遺伝子組換え抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

10

【請求項 9】

抗体が、サル C R T H 2 に結合する抗体である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片を産生するハイブリドーマ。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片をコードする D N A。

20

【請求項 12】

請求項 11 に記載の D N A を含有する組換え体ベクター。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項 14】

請求項 10 に記載のハイブリドーマまたは請求項 13 に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片を生産蓄積させ、該培養物から抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片を採取することを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片の製造方法。

30

【請求項 15】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片を有効成分として含有する、ヒト C R T H 2 が関係する疾患の治療剤。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合活性を有する該抗体断片を有効成分として含有する、ヒト C R T H 2 が関係する疾患の診断剤。

【請求項 17】

C R T H 2 が関係する疾患がアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、T h 2 細胞の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、または 2 型自然リンパ球 (I L C 2) の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患である請求項 15 または 16 に記載の剤。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト C R T H 2 を特異的に認識し、結合する抗ヒト C R T H 2 抗体、該抗体断片、該抗体のアミノ酸配列をコードする D N A、該 D N A を含むベクター、該抗体を生産するハイブリドーマおよび抗体生産細胞、該抗体の製造方法、該抗体または抗体断片を含む組成物、該抗体または抗体断片を用いるアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多や機能亢進を伴う疾患、T h 2 細胞の増多や機能亢進を伴う疾患などの治療方法および診断方法、並びに該抗体または抗体断片を含む医薬および診断薬に関する。

50

【背景技術】

【0002】

ヒトCRTH2 (Chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells) は、GPR44、CD294、DP2などの別名でも知られる7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor、以下、GPCRと記す) であり、プロスタグランジンD2 (以下、PGD2と記す) に対する受容体の一つであることが知られている (非特許文献1)。CRTH2は、1996年にヒトTh2特異的タンパク質としてクローニングされ、B19と称して開示されている (特許文献1)。

【0003】

CRTH2は、リガンドであるPGD2および13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin D2 (以下、DKPGD2と記す) に代表されるPGD2代謝物と結合し、細胞内にG α iタンパク質を介したシグナルを伝達し、その結果、CRTH2発現細胞の遊走および活性化に関与することが知られている (非特許文献1)。

【0004】

ヒトCRTH2はTh2細胞、好酸球、好塩基球および2型自然リンパ球 (Type 2 innate lymphoid cells、以下、ILC2と記す) などに発現が認められている (非特許文献1、2)。CRTH2は、Th2サイトカイン産生細胞に特異的に発現する表面マーカーであることが報告されている (非特許文献3)。

【0005】

また、ILC2は2011年にヒトにおいて同定されたアレルギー応答に関与する新規細胞集団であり、本細胞を規定する特異的な表面マーカーとしてCRTH2が挙げられている (非特許文献2)。また、nonclassical monocyteやTh2/Th17細胞にCRTH2が発現していることが報告されている (非特許文献4、5)。

【0006】

喘息をはじめとするアレルギー疾患において、CRTH2発現細胞は病態に寄与することが知られている。喘息患者における気管支肺胞洗浄液中の細胞においては、健常人と比較して高頻度でCRTH2陽性T細胞が認められることが報告されており (非特許文献6)、アトピー性皮膚炎においては、重症度と相関してCRTH2陽性T細胞が増加することが報告されている (非特許文献7)。

【0007】

好酸球は細胞傷害性を有する顆粒蛋白質を含んでおり、該蛋白質の沈着が慢性気管支喘息患者の気道組織あるいはアトピー性皮膚炎患者の病変部位に認められることなどから、好酸球は慢性気管支喘息またはアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の病態形成において重要な働きをしているものと考えられている (非特許文献8、9)。

【0008】

好塩基球は細胞内にヒスタミンやロイコトリエンといった炎症性分子を貯留し、細胞表面に発現するFc ϵ 受容体やFc γ 受容体のクロスリンクにより、該分子を放出することにより、アレルギー反応の惹起に関わっている (非特許文献10)。

【0009】

ILC2は気道粘膜や皮膚といった局所に存在する細胞であり、組織障害に伴い産生されるインターロイキン (以下、ILと記す) - 25、IL-33といったサイトカインに応答し、大量のTh2サイトカインを産生するという特性を持ち、アレルギー疾患の病態形成に関与していると考えられている (非特許文献11)。

【0010】

CRTH2に対するモノクローナル抗体として、301108 (R&D社) が市販されている。またBM16が知られている (特許文献2)。これらはげっ歯類抗体であり医薬品としては開発されていない。

【0011】

10

20

30

40

50

さらに、クローン 19A2 に関する遺伝子組換えキメラ抗体およびヒト化抗体が、エフェクター活性により C R T H 2 発現細胞の除去を行うこと、クローン 8B1 に関するヒト化抗体やクローン 3C12 および 31A5 に関するマウス抗体が、C R T H 2 に対するアンタゴニスト活性を有することが示されている。

【0012】

またクローン 19A2 に関する抗体はヒトマスト細胞に対しても反応性を有することが示されている（特許文献 3）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

10

【特許文献 1】特許第 3144805 号公報

【特許文献 2】国際公開第 97 / 46677 号

【特許文献 3】国際公開第 2014 / 144865 号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献 1】The Journal of Experimental Medicine, 2001. 193(2):p.255-261.

【非特許文献 2】Nature Immunology, 2011. 12(11):p.1055-1062.

【非特許文献 3】European Journal of Immunology, 2000. 30(10):p.2972-2979.

【非特許文献 4】Blood, 2011. 118(5):e16-31.

【非特許文献 5】Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014.134(5):p. 1175-1186. e7. 20

【非特許文献 6】Clinical & Experimental Immunology, 2010. 161(1):p. 34-40.

【非特許文献 7】Journal of Investigative Dermatology, 2002. 119(3):p. 609-616.

【非特許文献 8】Advances in Immunology, 1986. 39:p. 177-253.

【非特許文献 9】Immunology Today, 1992. 13(12):p. 501-507.

【非特許文献 10】Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. 132(4):p. 789-801.

【非特許文献 11】Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014. 134(3):p. 671-678.

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

これまでに複数のヒト C R T H 2 抗体が確立されているが、種々のヒト免疫細胞への反応性や、ヒト C R T H 2 への特異的結合活性、またはヒト C R T H 2 リガンド依存的な活性への影響など、所望の活性を有する抗ヒト C R T H 2 抗体の確立が望まれていた。

【0016】

本発明の目的は、ヒト C R T H 2 の特徴的なエピトープを認識し、結合することで所望の活性を有する抗ヒト C R T H 2 抗体、該抗体断片、該抗体のアミノ酸配列をコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該抗体を生産するハイブリドーマおよび抗体生産細胞、該抗体の製造方法、該抗体または抗体断片を含む組成物、該抗体または抗体断片を用いるアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多や機能亢進を伴う疾患、T h 2 細胞の増多や機能亢進を伴う疾患などの治療方法および診断方法、並びに該抗体または抗体断片を含む医薬および診断薬を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、以下の（１）～（２６）に関する。

（１）配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 192 番目のグリシンおよび 194 番目のアスパラギン酸の少なくとも一方を認識し、結合する抗体または該抗体断片。

（２）抗体が、配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 12 番目のプロリ

50

ン、13番目のイソロイシン、14番目のロイシン、15番目のグルタミン酸、177番目のアスパラギン酸、178番目のグリシン、179番目のアルギニン、180番目のイソロイシン、181番目のメチオニン、182番目のシステイン、183番目のチロシン、184番目のチロシン、185番目のアスパラギン、186番目のバリン、187番目のロイシン、188番目のロイシン、189番目のロイシン、195番目のアルギニン、196番目のアスパラギン酸、197番目のアラニン、および198番目のスレオニンからなる群から選ばれるアミノ酸残基の少なくとも1つを認識し、結合する抗体である(1)に記載の抗体または該抗体断片。

(3) 抗体が、以下の(a)~(g)からなる群から選ばれるアミノ酸残基の少なくとも1つを認識する抗体である、(1)または(2)に記載の抗体または該抗体断片。

10

(a) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の12番目のプロリン、14番目のロイシンおよび15番目のグルタミン酸、

(b) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の177番目のアスパラギン酸、178番目のグリシン、および179番目のアルギニン、

(c) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の180番目のイソロイシンおよび181番目のメチオニン、

(d) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の183番目のチロシン、184番目のチロシンおよび185番目のアスパラギン、

(e) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の187番目のロイシン、188番目のロイシンおよび189番目のロイシン、

20

(f) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の195番目のアルギニン、並びに

(g) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の196番目のアスパラギン酸および198番目のスレオニン。

(4) 抗体が、以下の(a)~(d)からなる群から選ばれるいずれか1つの抗体である、(1)~(3)のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片。

(a) 抗体重鎖可変領域(以下、V Hと略記する)の相補性決定領域(以下、C D Rと略記する)1~3が、それぞれ配列番号20~22で表されるアミノ酸配列を含み、かつ抗体軽鎖可変領域(以下、V Lと略記する)のC D R 1~3が、それぞれ配列番号23~25で表されるアミノ酸配列を含む抗体、

30

(b) 配列番号49で表されるアミノ酸配列または配列番号49で表されるアミノ酸配列中の18番目のロイシンをメチオニンに、77番目のアスパラギンをセリンに、93番目のバリンをスレオニンに、および117番目のスレオニンをバリンに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含むV H並びに配列番号33で表されるアミノ酸配列または配列番号33で表されるアミノ酸配列中の2番目のイソロイシンをバリンに、4番目のメチオニンをロイシンに、15番目のプロリンをロイシンに、および85番目のアラニンをプロリンに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c) 配列番号49、51、53、55、57および59で表されるアミノ酸配列のいずれか1つを含むV H並びに配列番号33、35、37、39、41、43、45および47で表されるアミノ酸配列のいずれか1つを含むV Lを含む抗体、並びに

40

(d) 配列番号17で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号19で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体。

(5) 抗体が、下記(a)~(h)からなる群から選ばれる少なくとも1つの特徴を有する抗体である(1)~(4)のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片。

(a) ヒトC R T H 2のリガンド存在下でヒトC R T H 2に対する反応性が低下しない、

(b) 中和活性を有しない、

(c) 抗体依存性細胞傷害(A D C C)活性を有する、

(d) マスト細胞およびT h 1細胞の少なくとも一方に反応しない、

(e) 好酸球、好塩基球、T h 2細胞および2型自然リンパ球(I L C 2)から選ばれる

50

少なくとも一つの細胞に反応する。

(f) アゴニスト活性を有しない、

(g) ヒト C R T H 2 のリガンドによるシグナルを増強しない、並びに

(h) 活性化状態または不活性化状態のヒト C R T H 2 に対する反応性が変化しない。

(6) 抗体が、ヒト F c 領域を含む抗体である、(1) ~ (5) のうちのいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片。

(7) 抗体が、モノクローナル抗体である (1) ~ (6) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片。

(8) 抗体が、遺伝子組換え抗体である (1) ~ (7) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片。

10

(9) 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 C D R 移植抗体およびヒト抗体から選ばれるいずれか 1 つの遺伝子組換え抗体である、(8) に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(10) 抗体が、サル C R T H 2 に結合する抗体である (1) ~ (9) のいずれか 1 つに記載の抗体または該断片。

(11) F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d i a b o d y、d s F v および C D R を含むペプチドから選ばれるいずれか 1 つの抗体断片である (1) ~ (10) のいずれか 1 に記載の該抗体断片。

(12) (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片を産生するハイブリドーマ。

20

(13) (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片をコードする D N A。

(14) (13) に記載の D N A を含有する組換え体ベクター。

(15) (14) に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(16) (12) に記載のハイブリドーマまたは (15) に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片を生産蓄積させ、該培養物から抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

(17) (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片を有効成分として含有する、ヒト C R T H 2 が関係する疾患の治療剤。

30

(18) (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片を有効成分として含有する、ヒト C R T H 2 が関係する疾患の診断剤。

(19) C R T H 2 が関係する疾患がアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、T h 2 細胞の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、または 2 型自然リンパ球 (I L C 2) の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患である (17) または (18) に記載の剤。

(20) (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片の有効量を投与することを含む、ヒト C R T H 2 が関係する疾患の治療方法。

(21) (1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片の有効量を投与することを含む、ヒト C R T H 2 が関係する疾患の診断方法。

40

(22) ヒト C R T H 2 が関係する疾患がアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、T h 2 細胞の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、または I L C 2 の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患である (20) または (21) に記載の方法。

(23) ヒト C R T H 2 が関係する疾患の治療および診断の少なくとも一方に使用するための、(1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片。

(24) ヒト C R T H 2 が関係する疾患がアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、T h 2 細胞の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、または I L C 2 の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患である (23) に記載の抗体または該抗体断片。

50

(25) ヒト C R T H 2 が関係する疾患の治療および診断剤の少なくとも一方の製造のための、(1) ~ (11) のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(26) ヒト C R T H 2 が関係する疾患がアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、T h 2 細胞の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、または I L C 2 の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患である(25)に記載の使用。

【発明の効果】

【0018】

本発明により配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 192 番目のグリシンおよび 194 番目のアスパラギン酸の少なくとも一方を認識し、結合する抗体または該抗体断片などが提供される。

10

【0019】

本発明の抗体は、好酸球、好塩基球 T h 2 細胞、I L C 2 などの C R T H 2 を発現する細胞に特異的に反応し、高濃度のリガンド存在下においても C R T H 2 発現細胞に高い反応性を示すとともに、アゴニスト活性、中和活性、およびヒト C R T H 2 のリガンドによるシグナルの増強活性を有しない。したがって本発明の抗体または該抗体断片は、C R T H 2 が発現する好酸球、好塩基球、T h 2 細胞、I L C 2 などの C R T H 2 を発現する細胞を標的とする治療効果を発揮し得る。

【図面の簡単な説明】

【0020】

20

【図 1】図 1 は、シグナル配列を含まない L y m 2 抗体軽鎖可変領域及び各ヒト化 L y m 2 抗体軽鎖可変領域 (L V 0、L V 1、L V 2 a、L V 2 b、L V 2 c、L V 3 a、L V 3 b および L V 4) のアミノ酸配列を示す。各配列中の枠で囲まれた領域は、C D R 配列を示す。

【図 2】図 2 は、シグナル配列を含まない L y m 2 抗体重鎖可変領域及び各ヒト化 L y m 2 抗体重鎖可変領域 (H V 0、H V 1、H V 2 a、H V 2 b、H V 3 および H V 4) のアミノ酸配列を示す。各配列中の枠で囲まれた領域は、C D R 配列を示す。

【図 3】図 3 (A) ~ (C) は、ラット/ヒトキメラ型 L y m 2 抗体 (以下、c h L y m 2 と記す場合もある) およびヒト化 L y m 2 抗体のヒト好酸球およびヒト好塩基球に対する細胞傷害活性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。図 3 (A) ~ (C) において、それぞれ、左側の図はヒト好酸球に対する細胞傷害活性を、右側の図はヒト好塩基球に対する細胞傷害活性を示す。それぞれの図において縦軸はコントロールビーズ 2000 個あたりの各細胞の個数を、横軸は抗体濃度を示す。図 3 (A) ○ は c h L y m 2、● はヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 0、○ はアイソタイプコントロール抗体を示す。図 3 (B) ○ は c h L y m 2、■ はヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1、○ はアイソタイプコントロール抗体を示す。図 3 (C) ○ は c h L y m 2、▲ はヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 2 a、○ はアイソタイプコントロール抗体を示す。

30

【図 4】図 4 (A) はヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1、図 4 (B) は c h L y m 2 の各ヒト C R T H 2 アミノ酸置換体発現細胞に対する反応性をそれぞれ示したものである。それぞれの図において、縦軸はアザミグリーンタグの蛍光強度で、各抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の蛍光強度を補正した相対的蛍光強度に関して、野生型ヒト C R T H 2 発現細胞に対する反応性の値を 100% とした際の、各アミノ酸置換体発現細胞に対する反応性の値 (%) を示す。横軸において W T は野生型ヒト C R T H 2 を示し、それ以外は、アミノ酸置換体の種類を示す。* は野生型 C R T H 2 の相対的蛍光強度から 90% 以上の相対的蛍光強度の低下が認められたことを意味する。以下、図 5 ~ 図 7 も同様である。

40

【図 5】図 5 (A) は h u 19 A 2 v 5 2、図 5 (B) は h u 8 B 1 v 1 の各 C R T H 2 アミノ酸置換体に対する反応性をそれぞれ示したものである。

【図 6】図 6 (A) は c h 3 C 1 2、図 6 (B) は c h 3 1 A 5 の各 C R T H 2 アミノ酸置換体に対する反応性をそれぞれ示したものである。

【図 7】図 7 は、B M 1 6 の各 C R T H 2 アミノ酸置換体に対する反応性を示したもので

50

ある。

【図 8】図 8 は、ヒト好酸球に対する抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の反応性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。●は L y m 2 抗体、○は B M 1 6、▲は 3 0 1 1 0 8 を示し、縦軸は蛍光強度を、横軸は各抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の抗体濃度を示す。

【図 9】図 9 は、ヒト好塩基球に対する c h L y m 2 の反応性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。塗りつぶし部分がアイソタイプコントロール抗体の反応性、実線で囲まれた部分が c h L y m 2 の反応性を、それぞれ示し、縦軸は細胞数を、横軸は蛍光強度を示す。

【図 10】図 10 は、ヒト C D 4 陽性 T 細胞に対するヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1 の反応性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。Forward scatter (以下、F S C と記す) - Side scatter (以下、S S C と記す) 展開によりリンパ球を分画し、さらに C D 3 陽性かつ C D 4 陽性細胞で分画した細胞群に対する、ヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1 による蛍光染色の蛍光強度および C D 4 抗体による蛍光染色の蛍光強度をそれぞれ縦軸および横軸に示す。

【図 11】図 11 (A) および図 11 (B) は、抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体のヒト好酸球およびヒト好塩基球に対する細胞傷害活性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。上段はヒト好酸球、下段はヒト好塩基球に対する細胞傷害活性を示す。それぞれの図において、縦軸にコントロールピーズ 1 0 0 0 個あたりの各細胞の個数を、横軸に抗体濃度を示す。○はヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1、□は h u 1 9 A 2 v 5 2、▲は h u 8 B 1 v 1、△は c h 3 C 1 2、◇は c h 3 1 A 5、×はアイソタイプコントロール抗体を示す。

【図 12】図 12 (A) および図 12 (B) は、抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体のヒト T h 2 および T h 1 サイトカイン減少活性を解析した結果を示す。図 12 (A) は各抗体を添加した時の T h 2 サイトカインである I L - 5 または I L - 1 3 の濃度を縦軸に示す。また図 12 (B) は各抗体を添加した時の、T h 1 サイトカインである I F N - γ の濃度を縦軸に示す。

【図 13】図 13 (A) ~ 図 13 (C) は、C R T H 2 リガンドである D K P G D 2 存在下における抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の反応性変化を、ヒト C R T H 2 発現 2 9 3 E B N A 細胞を用いて、フローサイトメトリーで解析した結果を示す。凡例に示す抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の濃度が 0 . 3 μ g / m L、1 μ g / m L、および 3 μ g / m L における結果をそれぞれ図 13 (A)、図 13 (B) および図 13 (C) に示す。それぞれの図において、縦軸は D K P G D 2 非存在下での蛍光強度を 1 0 0 % としたときの蛍光強度の割合を示す。

【図 14】図 14 は、I g E およびクロスリンク抗体処理により刺激したヒト分化誘導マスト細胞に対する抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の反応性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。それぞれの図は、図の上に示す抗体の反応性を示しており、縦軸に細胞数を、横軸に蛍光強度を示す。塗りつぶし部分がアイソタイプコントロール抗体の反応性を、実線で囲まれた部分が抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の反応性を、それぞれ示す。

【図 15】図 15 は、ヒト分化誘導 T h 1 細胞に対する抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の反応性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。それぞれの図は、図の上に示す抗体の反応性を示しており、縦軸に細胞数を、横軸に蛍光強度を示す。塗りつぶし部分がアイソタイプコントロール抗体の反応性を、実線で囲まれた部分が抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体の反応性を、それぞれ示す。

【図 16】図 16 は、ヒト好酸球の形態変化を指標にした L y m 2 抗体のアнтаゴニスト活性評価の結果を示す。グラフの下に示す各抗体の存在下または非存在下で、凡例に示す濃度の D K P G D 2 を処理した際に、フローサイトメーター解析における高 F S C 領域に検出される好酸球の割合 (%) を縦軸に示す。

【図 17】図 17 は、ヒト好酸球の形態変化を指標にした L y m 2 抗体のアゴニスト活性

10

20

30

40

50

評価の結果を示す。凡例に示す濃度の L y m 2 抗体を処理した際に、高 F S C 領域に検出される好酸球の割合 (%) を縦軸に示す。

【図 1 8】図 1 8 (A) ~ 図 1 8 (C) はいずれも、ヒト好酸球の形態変化を指標にした抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体のアゴニスト活性、アンタゴニスト活性およびリガンドによる活性化の増強活性の評価の結果を示す。図 1 8 (A) はヒト化抗体またはキメラ抗体、図 1 8 (B) はラット抗体、図 1 8 (C) はマウス抗体についての結果をそれぞれ示す。各図において、縦軸は、D K P G D 2 の存在、または非存在下で、凡例に示す各抗ヒト C R T H 2 モノクローナル抗体またはアイソタイプ抗体を処理した際に、フローサイトメーター解析における高 F S C 領域に検出される好酸球の割合 (%) を示す。

【図 1 9】図 1 9 は C R T H 2 発現細胞の膜画分への G T P γ S または G D P 処理による、C R T H 2 のコンフォメーションの変化が C R T H 2 モノクローナル抗体の反応性に与える影響を、E L I S A 法により解析した結果を示す。縦軸は G T P γ S および G D P 未処理時の吸光度を 1 とした際の F o l d c h a n g e を示す。横軸は G T P γ S および G D P 処理の有無、および、評価抗体 (h u 1 9 A 2 v 5 2 およびヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1) を示す。

【図 2 0】図 2 0 は、アザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞およびカニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞におけるアザミグリーンの発現を、フローサイトメトリーで解析した結果を示す。縦軸に細胞数を、横軸にアザミグリーンの蛍光強度を示す。塗りつぶし部分が親細胞である C H O / D G 4 4 細胞における蛍光強度を、実線で囲まれた部分がアザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞における蛍光強度を、点線で囲まれた部分がアザミグリーン融合カニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞における蛍光強度をそれぞれ示す。

【図 2 1】アザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞およびカニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞に対するヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1 およびアイソタイプ抗体の反応性をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。○はアザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞に対する L V 0 H V 1 の反応性、●はアザミグリーン融合カニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞に対する L V 0 H V 1 の反応性、□はアザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞に対するアイソタイプ抗体の反応性、▲はアザミグリーン融合カニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞に対するアイソタイプ抗体の反応性を示し、縦軸は蛍光強度を、横軸は各抗体の抗体濃度を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明におけるヒト C R T H 2 としては、配列番号 2 または G e n B a n k アクセッション番号 B A A 7 4 5 1 8 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。配列番号 2 または G e n B a n k アクセッション番号 B A A 7 4 5 1 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒト C R T H 2 の機能を有するポリペプチド並びに配列番号 2 または G e n B a n k アクセッション番号 B A A 7 4 5 1 8 で表されるアミノ酸配列と 6 0 % 以上、好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上、最も好ましくは 9 8 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつヒト C R T H 2 の機能を有するポリペプチドも、本発明におけるヒト C R T H 2 に包含される。

【0022】

配列番号 2 または G e n B a n k アクセッション番号 B A A 7 4 5 1 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. US

10

20

30

40

50

A, 82, 488 (1985)] などを用いて、例えば配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは 1 個～数十個、例えば、1～20 個、より好ましくは 1 個～数個、例えば、1～5 個のアミノ酸である。

【 0 0 2 3 】

ヒト C R T H 2 をコードする遺伝子としては、GenBank アクセション番号 AB008535 または配列番号 1 で表される塩基配列が挙げられる。GenBank アクセション番号 AB008535 または配列番号 1 で表される塩基配列において、1 以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列からなり、かつヒト C R T H 2 の機能を有する蛋白質をコードする DNA を含む遺伝子、GenBank アクセション番号 AB008535 または配列番号 1 で表される塩基配列と少なくとも 60 % 以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは 80 % 以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは 95 % 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつヒト C R T H 2 の機能を有するポリペプチドをコードする DNA を含む遺伝子、並びに配列番号 1 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA からなり、かつヒト C R T H 2 の機能を有するポリペプチドをコードする DNA を含む遺伝子なども本発明の C R T H 2 をコードする遺伝子に包含される。

10

【 0 0 2 4 】

ストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA としては、配列番号 1 で表される塩基配列を有する DNA をプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、または DNA マイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能な DNA を意味する。

20

【 0 0 2 5 】

具体的には、ハイブリダイズしたコロニー若しくはブランク由来の DNA、または該配列を有する PCR 産物もしくはオリゴ DNA を固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、0.7～1.0 mol/L の塩化ナトリウム存在下、65℃ でハイブリダイゼーション [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)] を行った後、0.1～2 倍濃度の SSC 溶液 (1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150 mmol/L 塩化ナトリウム、15 mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65℃ 条件下でフィルターまたはスライドガラスを洗浄することにより同定できる DNA を挙げることができる。

30

【 0 0 2 6 】

ハイブリダイズ可能な DNA としては、GenBank アクセション番号 AB008535 または配列番号 1 で表される塩基配列と少なくとも 60 % 以上の相同性を有する DNA、好ましくは 80 % 以上の相同性を有する DNA、さらに好ましくは 95 % 以上の相同性を有する DNA を挙げることができる。

40

【 0 0 2 7 】

真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明のヒト C R T H 2 をコードする遺伝子に包含される。

【 0 0 2 8 】

本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST 2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo>

50

/information3.html]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

【0029】

デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap) が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、-E (Cost to extend gap) が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch) が-3、-r (reward for nucleotide match) が1、-e (expect value) が10、-W (word size) が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、-y [Dropoff (X) for blast extensions in bits] がblastn の場合は20、blastn以外のプログラムでは7、-X (X dropoff value for gapped alignment in bits) が15および-Z (final X dropoff value for gapped alignment in bits) がblastnの場合は50、blastn以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。 10

【0030】

配列番号2またはGenBankアクセッション番号BAA74518で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができる。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、上記の方法で作製されるポリペプチドまたはDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号2またはGenBankアクセッション番号BAA74518で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。さらに、配列番号2またはGenBankアクセッション番号BAA74518で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチド、または配列番号2またはGenBankアクセッション番号BAA74518で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 法、t-ブチルオキシカルボニル (tBoc) 法などの化学合成法 30 によって製造することもできる。

【0031】

ヒトCRTH2としての機能としては、そのリガンド、例えばPGD2との結合により、ヒトCRTH2依存的な細胞内シグナルが伝達され、ヒトCRTH2を発現する細胞の遊走、該細胞からのサイトカイン産生亢進、または細胞径、細胞表面積などの変化を伴う細胞形態変化が誘導されることなどが挙げられる。

【0032】

ヒトCRTH2の細胞外領域としては、配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の1~33番目のアミノ酸残基を含むN末領域、95~111番目のアミノ酸残基を含むループ1領域、169~206番目のアミノ酸残基を含むループ2領域および264~285番目のアミノ酸残基を含むループ3領域が挙げられる [J Immunol, 1999, 162 (3): p.1278-86.]。N末領域、ループ1領域、ループ2領域およびループ3領域として、具体的には、それぞれ、配列番号2で表されるアミノ酸配列における1~33番目、95~111番目、169~206番目および264~285番目のアミノ酸残基を含むポリペプチド部分が挙げられる。 40

【0033】

本発明における抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体等いずれの抗体であってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体が挙げられる。本発明の抗体として具体的には、ハイブリドーマにより産生される抗体、または遺伝子組換え技術によって産生される遺伝子組換え抗体を挙げることができる。また遺伝子組換え抗体としては、例え 50

ば、遺伝子組換え技術によって作製されるマウス抗体、ラット抗体、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体などが挙げられる。

【 0 0 3 4 】

モノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（１次構造）が均一である。

【 0 0 3 5 】

本発明においてモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される抗体など、遺伝子組換え技術によって作製される遺伝子組換え抗体を挙げることができる。

10

【 0 0 3 6 】

ポリクローナル抗体とは、２つ以上のモノクローナル抗体が含まれる抗体群であり、その抗体群を構成する複数の抗体によって複数のエピトープを認識することができる。

本発明においてエピトープとしては、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列およびアミノ酸配列からなる立体構造並びに翻訳後修飾により修飾されたアミノ酸配列および該アミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。

【 0 0 3 7 】

翻訳後修飾により修飾されたアミノ酸配列としては、糖鎖がOH置換基を有するスレオニンおよびセリンに結合したO結合型糖鎖、NH₂置換基を有するグルタミンおよびアスパラギンに結合したN結合型糖鎖並びに硫酸分子がOH置換基を有するスレオニンに結合した硫酸基などが結合したアミノ酸配列が挙げられる。

20

【 0 0 3 8 】

本発明の抗体が認識するヒトC R T H 2のエピトープは、ヒトC R T H 2の一部のドメインを欠失させた欠損体、ヒトC R T H 2の一部のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換させた変異体、他のタンパク質由来のドメインと置換させた変異体およびヒトC R T H 2の部分ペプチド断片等を用いた抗体の結合実験を行うことにより決定することができる。また、本発明の抗体が結合するヒトC R T H 2のエピトープは、タンパク質分解酵素にて消化したヒトC R T H 2に本発明の抗体を添加し、既知の質量分析法を用いたエピトープマッピングを行うことにより決定することができる。

【 0 0 3 9 】

30

本発明の抗体が認識するヒトC R T H 2のエピトープに含まれるアミノ酸残基としては、例えば該アミノ酸残基の置換により、本発明の抗体の反応性が消失するアミノ酸残基が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

本発明における抗体の反応性は、例えば、野生型ヒトC R T H 2受容体またはアミノ酸置換体を発現する細胞に対する抗体の結合量（野生型及び置換体の発現量に応じて補正される）をフローサイトメトリー等を用いて測定することによって求めることができる。また、抗体の結合量は、固相サンドイッチ法などを用いたラジオイムノアッセイ、または酵素免疫測定法（E L I S A）などを用いたヒトC R T H 2に対する公知の免疫学的検出法、またはB i a c o r eシステム（ジーイーヘルスケア社）などを用いた表面プラズモン共鳴などの方法で確認することができる。

40

【 0 0 4 1 】

また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック(1987)] などを組み合わせて確認することもできる。

【 0 0 4 2 】

本発明における抗体の反応性の消失とは、野生型ヒトC R T H 2を発現する細胞に対する抗体の反応性と比較して、アミノ酸置換体を発現する細胞に対する抗体の反応性が70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以

50

上低下することを示す。

【 0 0 4 3 】

本発明の抗体が結合するエピトープとしては、配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグリシンおよび 1 9 4 番目のアスパラギン酸の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を含むエピトープが挙げられる。

【 0 0 4 4 】

また、本発明の抗体が結合するエピトープとして、具体的には、下記の (a) ~ (c) のエピトープが挙げられる。

(a) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグリシンを含むエピトープ、

(b) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 4 番目のアスパラギン酸を含むエピトープ、

(c) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグリシンおよび 1 9 4 番目のアスパラギン酸を含むエピトープ。

【 0 0 4 5 】

また、本発明の抗体が結合するエピトープとしては、配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグリシンおよび 1 9 4 番目のアスパラギン酸の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を含み、かつ配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 2 番目のプロリン、1 4 番目のロイシン、1 5 番目のグルタミン酸、1 7 7 番目のアスパラギン酸、1 7 8 番目のグリシン、1 7 9 番目のアルギニン、1 8 0 番目のイソロイシン、1 8 1 番目のメチオニン、1 8 3 番目のチロシン、1 8 4 番目のチロシン、1 8 5 番目のアスパラギン、1 8 7 番目のロイシン、1 8 8 番目のロイシン、1 8 9 番目のロイシン、1 9 5 番目のアルギニン、1 9 6 番目のアスパラギン酸、および 1 9 8 番目のスレオニンからなる群から選ばれるアミノ酸残基の少なくとも 1 つを含むエピトープが挙げられる。

【 0 0 4 6 】

また、本発明の抗体が結合するエピトープとしては配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグリシンおよび 1 9 4 番目のアスパラギン酸の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を含み、かつ下記の (a) ~ (g) の少なくともいずれか 1 つを含むエピトープが挙げられる。

(a) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 2 番目のプロリン、1 4 番目のロイシンおよび 1 5 番目のグルタミン酸、

(b) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 7 7 番目のアスパラギン酸、1 7 8 番目のグリシン、および 1 7 9 番目のアルギニン、

(c) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 8 0 番目のイソロイシンおよび 1 8 1 番目のメチオニン、

(d) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 8 3 番目のチロシン、1 8 4 番目のチロシンおよび 1 8 5 番目のアスパラギン、

(e) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 8 7 番目のロイシン、1 8 8 番目のロイシンおよび 1 8 9 番目のロイシン、

(f) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 5 番目のアルギニン、並びに

(g) 配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 9 6 番目のアスパラギン酸および 1 9 8 番目のスレオニン。

【 0 0 4 7 】

また、本発明の抗体が結合するエピトープに含まれる他のアミノ酸残基としては、本発明の抗体が C R T H 2 へ結合する際に、配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列に存在し、かつ実質的に認識し結合しているアミノ酸残基であればいずれのアミノ酸残基でもよく、具体的には配列番号 2 で表されるヒト C R T H 2 のアミノ酸配列の 1 2 番目のプロリン、1 4 番目のロイシン、1 5 番目のグルタミン酸、1 7 7 番目のアスパラギ

10

20

30

40

50

ン酸、１７８番目のグリシン、１７９番目のアルギニン、１８０番目のイソロイシン、１８１番目のメチオニン、１８３番目のチロシン、１８４番目のチロシン、１８５番目のアスパラギン、１８７番目のロイシン、１８８番目のロイシン、１８９番目のロイシン、１９２番目のグリシン、１９４番目のアスパラギン酸、１９５番目のアルギニン、１９６番目のアスパラギン酸、および１９８番目のスレオニンからなる群から選ばれるアミノ酸残基と立体構造上近接して存在しているアミノ酸残基、並びに配列番号２で表されるヒトＣＲＴＨ２のアミノ酸配列の１２番目のプロリン、１４番目のロイシン、１５番目のグルタミン酸、１７７番目のアスパラギン酸、１７８番目のグリシン、１７９番目のアルギニン、１８０番目のイソロイシン、１８１番目のメチオニン、１８３番目のチロシン、１８４番目のチロシン、１８５番目のアスパラギン、１８７番目のロイシン、１８８番目のロイシン、１８９番目のロイシン、１９２番目のグリシン、１９４番目のアスパラギン酸、１９５番目のアルギニン、１９６番目のアスパラギン酸、および１９８番目のスレオニンからなる群から選ばれるアミノ酸から選ばれるアミノ酸残基と１次配列上近接しているアミノ酸残基などが挙げられる。

10

【００４８】

抗体分子はイムノグロブリン（以下、Ｉｇと表記する）とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４およびＩｇＭのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を総称してＩｇＧともいう。

【００４９】

20

抗体分子は重鎖（Heavy chain、以下Ｈ鎖と記す）および軽鎖（Light chain、以下Ｌ鎖と記す）と呼ばれるポリペプチドより構成される。また、Ｈ鎖はＮ末端側よりＨ鎖可変領域（VHとも表記される）、Ｈ鎖定常領域（CHとも表記される）、Ｌ鎖はＮ末端側よりＬ鎖可変領域（VLとも表記される）、Ｌ鎖定常領域（CLとも表記される）の各領域により、それぞれ構成される。

【００５０】

CHは各サブクラスごとに、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ 鎖がそれぞれ知られている。CHはさらに、Ｎ末端側よりCH１ドメイン、ヒンジドメイン、CH２ドメイン、CH３ドメインの各ドメインにより構成される。ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、CH２ドメインとCH３ドメインを併せてFc領域または単にFcという。CLは、C λ 鎖およびC κ 鎖が知られている。

30

【００５１】

本発明の抗体におけるCHとしては、Ｉｇに属すればいかなるものでもよいが、ＩｇＧクラスのもの好適であり、さらにＩｇＧクラスに属するＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。

【００５２】

本発明の抗体におけるCLのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のアミノ酸配列のいずれでもよいが、ヒト抗体のアミノ酸配列のC κ またはC λ が好ましい。

【００５３】

40

本発明の抗体は配列番号２で表されるヒトＣＲＴＨ２のアミノ酸配列の１９２番目のグリシンおよび１９４番目のアスパラギン酸の少なくとも一方のアミノ酸残基を認識し、結合する抗体である。

【００５４】

本発明の抗体として具体的には、下記の（ａ）～（ｃ）から選ばれる抗体が挙げられる。

（ａ）配列番号２で表されるヒトＣＲＴＨ２のアミノ酸配列の１９２番目のグリシンを認識し結合する抗体、

（ｂ）配列番号２で表されるヒトＣＲＴＨ２のアミノ酸配列の１９４番目のアスパラギン酸を認識し結合する抗体、

50

(c) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の192番目のグリシンおよび194番目のアスパラギン酸の両方を認識し、結合する抗体。

【0055】

また、本発明の抗体としては、配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の192番目のグリシンおよび194番目のアスパラギン酸の少なくとも1つのアミノ酸残基を認識し、かつ配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の12番目のプロリン、14番目のロイシン、15番目のグルタミン酸、177番目のアスパラギン酸、178番目のグリシン、179番目のアルギニン、180番目のイソロイシン、181番目のメチオニン、183番目のチロシン、184番目のチロシン、185番目のアスパラギン、187番目のロイシン、188番目のロイシン、189番目のロイシン、195番目のアルギニン、196番目のアスパラギン酸および198番目のスレオニンからなる群から選ばれるアミノ酸残基の少なくとも1つを認識し、結合する抗体が挙げられる。

10

【0056】

また、本発明の抗体としては配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の192番目のグリシンおよび194番目のアスパラギン酸の少なくとも1つのアミノ酸残基を認識し、かつ下記の(a)~(g)の少なくともいずれか1つを認識して結合する抗体が挙げられる。

(a) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の12番目のプロリン、14番目のロイシンおよび15番目のグルタミン酸、

(b) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の177番目のアスパラギン酸、178番目のグリシン、および179番目のアルギニン、

20

(c) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の180番目のイソロイシンおよび181番目のメチオニン、

(d) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の183番目のチロシン、184番目のチロシンおよび185番目のアスパラギン、

(e) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の187番目のロイシン、188番目のロイシンおよび189番目のロイシン、

(f) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の195番目のアルギニン、および

(g) 配列番号2で表されるヒトC R T H 2のアミノ酸配列の196番目のアスパラギン酸および198番目のスレオニン。

30

【0057】

また本発明の抗体として、具体的には、下記の(a)~(d)から選ばれる抗体が挙げられる。

(a) V Hの相補性決定領域 (c o m p l e m e n t a r y d e t e r m i n i n g r e g i o n ; C D R、以下C D Rと略記する) 1~3のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号20、21および22で表されるアミノ酸配列を含み、かつV LのC D R 1~3のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号23、24および25で表されるアミノ酸配列を含む抗体、

(b) 前記(a)に記載の抗体と競合してヒトC R T H 2に結合する抗体、

40

(c) 前記(a)に記載の抗体が結合するエピトープを含むエピトープに結合する抗体、および

(d) 前記(a)に記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

【0058】

本発明の上記(b)の抗体とは、上記(a)の抗体とヒトC R T H 2との結合を阻害する抗ヒトC R T H 2抗体のことを示す。また、本発明の上記(c)の抗体とは、上記(a)に記載の抗体を第1抗体、および第1抗体が結合するエピトープを第1エピトープとした場合、当該第1エピトープを含むエピトープに結合する抗体のことを示す。

【0059】

また本発明の抗体として、具体的には、下記の(a)~(c)から選ばれる抗体が挙げ

50

られる。

(a) 配列番号 49 で表されるアミノ酸配列または配列番号 49 で表されるアミノ酸配列中の 18 番目のロイシンをメチオニンに、77 番目のアスパラギンをセリンに、93 番目のバリンをスレオニンに、および 117 番目のスレオニンをバリンに置換する改変から選ばれる少なくとも 1 つの改変が導入されたアミノ酸配列を含む V H および配列番号 33 で表されるアミノ酸配列または配列番号 33 で表されるアミノ酸配列中の 2 番目のイソロイシンをバリンに、4 番目のメチオニンをロイシンに、15 番目のプロリンをロイシンに、および 85 番目のアラニンをプロリンに置換する改変から選ばれる少なくとも 1 つの改変が導入されたアミノ酸配列を含む V L を含む抗体、

(b) 配列番号 49、51、53、55、57 および 59 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む V H 並びに配列番号 33、35、37、39、41、43、45 および 47 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む V L を含む抗体、並びに

(c) 配列番号 17 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 19 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体。

【0060】

上記 (b) の抗体として、好ましくは以下の (1) ~ (3) から選ばれる抗体が挙げられる。

(1) 配列番号 49 で表されるアミノ酸配列を含む V H 並びに配列番号 33、35、37、39、41、43、45 および 47 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む V L を含む抗体、

(2) 配列番号 59 で表されるアミノ酸配列を含む V H 並びに配列番号 33、35、37、39、41、43、45 および 47 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む V L を含む抗体、並びに

(3) 配列番号 51、53、55 および 57 で表されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む V H 並びに配列番号 33 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体。

上記 (b) の抗体として、特に好ましくは、配列番号 51 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 33 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体が挙げられる。

【0061】

本発明の抗体としては、ヒト C R T H 2 の 192 番目のグリシンおよび 194 番目のアスパラギン酸の少なくとも一方をアラニンに置換したアミノ酸置換体に対し反応性が消失する抗体が挙げられる。

【0062】

また、本発明の抗体には、ヒト C R T H 2 のリガンド存在下で、ヒト C R T H 2 への反応性が低下しない抗体が包含される。ヒト C R T H 2 のリガンド存在下でヒト C R T H 2 への反応性が低下しない抗体は、ヒト C R T H 2 への反応性が低下する抗体に比べて、炎症局所のようにヒト C R T H 2 のリガンドが高濃度で存在する条件下でも、高い反応性を示すことができる。従って、ヒト C R T H 2 リガンド非依存的にヒト C R T H 2 へ特異的に結合することができ、薬効を発揮することができる。

【0063】

本発明において、ヒト C R T H 2 のリガンド存在下で抗体の反応性が低下するとは、ヒト C R T H 2 のリガンド非存在下でのヒト C R T H 2 発現細胞に対する抗体の反応性と比較して、ヒト C R T H 2 のリガンド存在下での該反応性が少なくとも 5 % 以上低下することを示す。より厳密には 10 % 以上低下することを示す。

【0064】

ヒト C R T H 2 のリガンドとしては、ヒト C R T H 2 に特異的に結合するものであればいずれも包含されるが、好ましくは P G D 2 または D K P G D 2 が挙げられる。より好ましくは D K P G D 2 が挙げられる。

本発明において、活性化状態または不活性化状態のヒト C R T H 2 に対する反応性が変化しないとは、グアノシン三リン酸 (G D P) もしくは G D P アナログまたはグアノシン三リン酸 (G T P) もしくは G T P アナログ存在下と非存在下で、抗体の、ヒト C R T H

10

20

30

40

50

2 に対する反応性が変化しないことをいう。

GDP アナログとしては例えばグアノシン 5'-O-(β -チオ)三リン酸 (GDP β S) が挙げられる。GTP アナログとしては、例えばグアノシン 5'-O-(γ -チオ)三リン酸 (GTP γ S) が挙げられる。

【0065】

本発明の抗体には、中和活性を有しない抗体、アゴニスト活性を有しない抗体、ヒト CRT H 2 のリガンドによるシグナルを増強しない抗体、または活性化状態または不活性化状態のヒト CRT H 2 に対する反応性が変化しない抗体が包含される。

【0066】

本発明において、抗体の中和活性とは、抗体が持つヒト CRT H 2 の生物活性を阻害する活性のことをいう。例えば、ヒト CRT H 2 とそのリガンドとの結合を阻害する活性や、ヒト CRT H 2 によるシグナル伝達を阻害する活性などのアンタゴニスト活性をいう。

【0067】

本発明において、アゴニスト活性とは、ヒト CRT H 2 のリガンドの生物学的活性を模倣する活性をいい、CRT H 2 の活性化及び、活性化に伴う種々の反応を誘導する活性をいう。本発明におけるアゴニスト活性として、具体的には細胞遊走活性、細胞の形態変化誘導活性などが挙げられる。

【0068】

本発明において、ヒト CRT H 2 のリガンドによるシグナルとは、ヒト CRT H 2 のリガンドがヒト CRT H 2 に結合し、ヒト CRT H 2 を活性化させることに伴うシグナルのことをいう。

【0069】

ヒト CRT H 2 のリガンドによるシグナルおよびアゴニスト活性は、ヒト CRT H 2 の活性化に伴う種々の反応を解析することにより評価できる。例えば、ヒト CRT H 2 発現細胞の形態変化を解析することにより評価できる。

【0070】

ヒト CRT H 2 発現細胞としては、ヒト CRT H 2 を発現していればいずれの細胞でもよいが、例えば、好酸球、好塩基球、Th 2 細胞、2 型自然リンパ球 (ILC 2)、non classical monocyte、Th 2 / Th 1 7 細胞などが挙げられる。

【0071】

本発明において、抗体がヒト CRT H 2 のリガンドによるシグナルを増強しないとは、ヒト CRT H 2 に対し、ヒト CRT H 2 のリガンドを単独で作用させたときと比べ、ヒト CRT H 2 のリガンドと抗体を共に作用させたときに、ヒト CRT H 2 の活性化及び、該活性化に伴う種々の反応を増強しないことを指す。

【0072】

本発明の抗体には、ヒト CRT H 2 発現細胞に対し細胞傷害活性を示す抗体が含まれる。本発明における細胞傷害活性としては、補体依存性細胞傷害活性 (以下、CDC 活性と表記する) あるいは抗体依存性細胞傷害活性 (以下、ADCC 活性と表記する) などが挙げられる。

【0073】

本発明における CDC 活性としては、細胞表面上のヒト CRT H 2 に結合した抗体分子が、Fc 部分を介して補体系の C 1 q に結合し、その結果、C 1 から C 9 の各補体成分が活性化し、最終的には C 5 から C 9 が膜侵襲複合体と呼ばれる孔形成重合体を細胞膜上で形成して細胞溶解を引き起こす反応が挙げられる [Immunol Today. 1999 Dec;20(12):576-82.]。

【0074】

本発明における ADCC 活性としては、細胞表面上のヒト CRT H 2 に結合した抗体分子が、Fc 部分を介して、Fc 受容体を発現した、例えば、ナチュラルキラー細胞 (以下、NK 細胞と表記する) などを活性化することによる、パーフォリンやグランザイムなどの細胞傷害性分子の放出や貪食作用の亢進などによって生じる細胞傷害反応が挙げられる

10

20

30

40

50

[Chemical Immunology, 65, 88 (1997) ; Immunol Today, 20, 576 (1999)]。

【 0 0 7 5 】

本発明の抗体にはマスト細胞に対する細胞傷害性を有しない抗体が含まれる。このような抗体は、マスト細胞の傷害に起因する炎症性メディエーターの遊離による副作用の懸念が無いという利点を有する。

【 0 0 7 6 】

本発明の抗体には抗体の F c 領域に N - グリコシド結合糖鎖が結合し、該 N - グリコシド結合糖鎖の還元末端の N - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない抗体が包含される。抗体の F c 領域に N - グリコシド結合糖鎖が結合し、該 N - グリコシド結合糖鎖の還元末端の N - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない抗体としては、例えば $\alpha 1, 6$ - フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO 細胞 (国際公開第 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6 号、国際公開第 0 2 / 3 1 1 4 0 号) を用いて作製される抗体が挙げられる。抗体の F c 領域に N - グリコシド結合糖鎖が結合し、該 N - グリコシド結合糖鎖の還元末端の N - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない本発明の抗体は、高い ADC C 活性を有する。

10

【 0 0 7 7 】

本発明の抗体には抗体の F c 領域のアミノ酸残基を、F c 受容体との結合活性が高くなるように改変した抗体が包含される。抗体の F c 領域のアミノ酸残基を、F c 受容体との結合活性が高くなるように改変した抗体としては、例えば米国特許第 7 3 1 7 0 9 1 号明細書記載の方法で作製された抗体分子を挙げることができる。

20

【 0 0 7 8 】

本発明の抗体には、抗体の可変領域を含むポリペプチドの表面電荷や早期エンドソーム内での pH における抗原結合活性を改変し血中半減期が伸びた抗体が包含される。

【 0 0 7 9 】

抗体分子の可変領域を含むポリペプチドの表面電荷や早期エンドソーム内での pH における抗原結合活性を改変し血中半減期が伸びた抗体としては、例えば特開 2 0 1 3 - 1 6 5 7 1 6 号公報、特開 2 0 1 2 - 0 2 1 0 0 4 号公報記載の方法で作製された抗体を挙げることができる。

【 0 0 8 0 】

本発明の抗体には、ヒト型キメラ抗体 (以下、単にキメラ抗体とも表記する)、ヒト型 C D R 移植抗体 (以下ヒト化抗体とも表記する) およびヒト抗体などの遺伝子組換え抗体が包含される。

30

【 0 0 8 1 】

キメラ抗体は、ヒト以外の動物 (非ヒト動物) の抗体の V H および V L とヒト抗体の C H とおよび C L からなる抗体をいう。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【 0 0 8 2 】

本発明のキメラ抗体は、ヒト C R T H 2 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の V H および V L をコードする c D N A を取得し、ヒト抗体の C H および C L をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してキメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

40

【 0 0 8 3 】

ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体の V H および V L の C D R をヒト抗体の V H および V L の適切な位置に移植した抗体を意味する。

【 0 0 8 4 】

本発明のヒト化抗体は、ヒト C R T H 2 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の V H および V L の C D R を任意のヒト抗体の V H および V L のフレームワーク (以下、F R と表記する) に移植した可変領域 (以下 V 領域とも表記する) をコードする c D N A を構築し、C H および C L をコードする D N A を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿

50

入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0085】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)などが挙げられる。

【0086】

これらのアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつヒトCRTH2と特異的に結合して、かつ、例えば、細胞傷害活性等の生物活性において同等の機能を有する抗体または該抗体断片も本発明の抗体に包含される。

【0087】

本発明の抗体にはサルCRTH2に結合する抗体が包含される。サルCRTH2としては例えばマーモセットCRTH2、カニクイザルCRTH2およびアカゲザルCRTH2が挙げられる。好ましくはカニクイザルCRTH2が挙げられる。

【0088】

本発明の抗体としては、Fcと抗体断片とが結合したFc融合タンパク質、Fcと天然に存在するリガンドまたは受容体とが結合したFc融合タンパク質(イムノアドヘシンともいう)、複数のFc領域を融合させたFc融合タンパク質等も本発明に包含される。また、抗体を安定化させるためまたは血中半減期を制御するためにアミノ酸残基置換を行ったアミノ酸残基改変を含む改変Fc領域なども本発明の抗体に用いることができる。

【0089】

本発明において、抗体断片とは、配列番号2で表されるヒトCRTH2のアミノ酸配列の192番目のグリシンおよび194番目のアスパラギン酸の少なくとも一方を認識し、結合する抗原結合ドメインを含み、且つ抗原結合活性を有する断片である。本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、single chain Fv(以下、scFvと記す)、diabody、dsFvおよび複数のCDRを含むペプチドなどが挙げられる。

【0090】

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0091】

本発明のFabは、本発明のヒトCRTH2に特異的に結合する抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0092】

F(ab')₂は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち(H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される)、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、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0093】

本発明のF(ab')₂は、本発明のヒトCRTH2に特異的に結合する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

【0094】

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分子量約

10

20

30

40

50

5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の F a b ' は、本発明のヒト C R T H 2 に特異的に結合する F (a b ')₂ 組成物を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の F a b ' 断片をコードする D N A を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【 0 0 9 5 】

s c F v は、1 本の V H と 1 本の V L とを 4 個の G l y および 1 個の S e r 残基からなるリンカー (G 4 S) を任意の個数つなげたリンカーペプチドなどの適当なペプチドリリンカー (P) を用いて連結した、V H - P - V L ないしは V L - P - V H ポリペプチドで、

10

【 0 0 9 6 】

本発明の s c F v は、本発明のヒト C R T H 2 に特異的に結合する抗体の V H および V L をコードする c D N A を取得し、s c F v をコードする D N A を構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【 0 0 9 7 】

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、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

20

【 0 0 9 8 】

本発明の d i a b o d y は、本発明のヒト C R T H 2 に特異的に結合する抗体の V H および V L をコードする c D N A を取得し、s c F v をコードする D N A を P のアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【 0 0 9 9 】

d s F v は、V H および V L 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 (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

30

【 0 1 0 0 】

本発明の d s F v は、本発明のヒト C R T H 2 に特異的に結合する抗体の V H および V L をコードする c D N A を取得し、d s F v をコードする D N A を構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【 0 1 0 1 】

C D R を含むペプチドは、V H または V L の C D R の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の C D R を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリリンカーを介して結合させることができる。

40

【 0 1 0 2 】

本発明の C D R を含むペプチドは、本発明のヒト C R T H 2 に特異的に結合する抗体の V H および V L の C D R をコードする D N A を構築し、該 D N A を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【 0 1 0 3 】

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) 、t B o c 法 (t - ブチルオキシカルボニル法) などの化学合成法によって製造することもできる。

50

【 0 1 0 4 】

上述の抗体または該抗体断片を構成するアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加され、かつ上述の抗体または該抗体断片と同様な活性を有するモノクローナル抗体または該抗体断片も、本発明の抗体または該抗体断片に包含される。欠失、置換、挿入または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

10

【 0 1 0 5 】

本発明のヒトC R T H 2または抗体のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてもよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。

【 0 1 0 6 】

天然型アミノ酸残基としては、例えば、L - アラニン、L - アスパラギン、L - アスパラギン酸、L - グルタミン、L - グルタミン酸、グリシン、L - ヒスチジン、L - イソロイシン、L - ロイシン、L - リジン、L - メチオニン、L - フェニルアラニン、L - プロリン、L - セリン、L - スレオニン、L - トリプトファン、L - チロシン、L - バリン、L - システインなどが挙げられる。

20

【 0 1 0 7 】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2 - アミノブタン酸、メチオニン、O - メチルセリン、t - ブチルグリシン、t - ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

30

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2 - アミノアジピン酸、2 - アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4 - ジアミノブタン酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3 - ヒドロキシプロリン、4 - ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

【 0 1 0 8 】

本発明の形質転換体としては、ヒトC R T H 2に特異的に結合する抗体分子をコードするDNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体であって、本発明の抗体を生産する形質転換体であればいかなる形質転換体でも包含される。具体的な例としては、ヒトC R T H 2に特異的に結合する抗体分子をコードするDNAを以下の(a)～(i)などの宿主細胞に導入して得られる形質転換体が好例として挙げられる。

40

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株Y B 2 / 3 H L . P 2 . G 1 1 . 1 6 A g . 2 0 細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株N S 0 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株S P 2 / 0 - A g 1 4 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来B H K 細胞；

(f) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

50

- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞 ;
- (h) 胚性幹細胞 ;
- (i) 受精卵細胞。

【 0 1 0 9 】

また、抗体のFc領域にN - グリコシド結合糖鎖が結合し、該N - グリコシド結合糖鎖の還元末端のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない抗体を生産する本発明の形質転換体としては、ヒトCRTH2に特異的に結合する抗体分子をコードするDNAを国際公開第2005/035586号、国際公開第02/31140号に記載の方法で作製された糖転移酵素の低下または欠損した宿主細胞に導入して得られる形質転換体为好例として挙げられる。

10

【 0 1 1 0 】

本発明の抗体または該抗体断片の製造法としては、本発明の抗体または該抗体断片を生産する形質転換体を培養する製造方法であれば、いかなる抗体製造方法でも包含されるが、好例として、本発明の抗体または該抗体断片を生産する形質転換体を培養し、培養物中に抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該抗体または該抗体断片を採取し、精製する抗体または該抗体断片の製造方法が挙げられる。

【 0 1 1 1 】

上記製造法により製造される抗体または該抗体断片も、本発明の抗体または該抗体断片として挙げられる。

【 0 1 1 2 】

20

本発明の組成物としては、本発明の抗体または該抗体断片を含む組成物であればいずれの組成物であってもよく、抗体に結合する糖鎖が単一の抗体分子を含む組成物、または複数の糖鎖構造を有する抗体分子を含む組成物であってもよい。また、適当な添加剤、バッファー等を含む組成物であってもよい。本発明の組成物としては、好ましくは本発明の抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬、診断薬等が挙げられる。

【 0 1 1 3 】

本発明の医薬または診断薬としては、本発明の抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬または診断薬であればいかなる医薬または診断薬も含有される。好例として、ヒトCRTH2発現細胞に関連した疾患の医薬または診断薬が挙げられる。

【 0 1 1 4 】

30

本発明の治療方法としては、本発明の抗体または該抗体断片を有効量投与する治療方法であればいかなる治療方法も含まれるが、好ましくは、ヒトCRTH2発現細胞に関連した疾患の治療方法が挙げられる。

【 0 1 1 5 】

本発明の抗体または該抗体断片の使用としては、ヒトCRTH2発現細胞に関連した疾患の治療薬を製造するための本発明の抗体または該抗体断片の使用であれば、いかなる抗体または該抗体断片の使用も含まれる。また、本発明の抗体または該抗体断片はヒトCRTH2発現細胞が関係する障害または疾患の治療および予防の少なくとも一方に用いることができる。

【 0 1 1 6 】

40

ヒトCRTH2発現細胞が関係する障害または疾患としては、限定するものではないが、例えば、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患、Th2細胞の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患並びにILC2の増多および機能亢進の少なくとも一方を伴う疾患などが挙げられる。

【 0 1 1 7 】

より具体的には、例えば、アレルギー性又は非アレルギー性鼻炎又は副鼻腔炎、慢性副鼻腔炎又は鼻炎、鼻ポリープ、鼻ポリープを伴う慢性副鼻腔炎、抗酸球性副鼻腔炎、急性副鼻腔炎、喘息、小児喘息、アレルギー性気管支炎、肺炎、農夫の疾患 (Farmer's disease)、過敏性気道、感染、例えば、細菌又はウイルス又は蠕虫又は真菌又は原生動物その他の病原に起因するアレルギー性結膜炎、気管支炎又は肺臓炎、気管

50

支拡張症、成人呼吸促迫症候群、気管支及び肺浮腫、様々な起源、例えば毒ガス、蒸気の吸引、吸入に起因する気管支炎又は肺臓炎又は間質性肺臓炎、心不全、X線、放射線、化学療法に起因する気管支炎又は肺臓炎又は間質性肺臓炎、膠原病、例えばエリテマトーデス、全身性強皮症に関連する気管支炎又は肺臓炎又は間質性肺臓炎、肺線維症、特発性肺線維症（I P F）、様々な起源の間質性肺疾患又は間質性肺臓炎、例えば、石綿肺症、珪肺症、m . B o e c k又はサルコイドーシス、肉芽腫症、嚢胞性線維症又はムコビシドーシス、又は $\alpha 1$ -抗トリプシン欠乏症、好酸球性セルライト（例えば、W e l l 症候群）、好酸球性肺炎（例えば、L o e f f l e r 症候群、慢性好酸球性肺炎）、好酸球性筋膜炎（例えば、S h u l m a n 症候群）、抗酸球性食道炎、抗酸球増加症候群、遅延型過敏、非アレルギー性喘息、運動誘発性気管支収縮；慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、急性気管支炎、慢性気管支炎、肺気腫；全身性アナフィラキシー又は過敏性反応、薬物アレルギー（例えば、ペニシリン、セファロスポリンに対して）、汚染トリプトファンの摂取による好酸球増多筋痛症候群、昆虫刺傷アレルギー；自己免疫疾患、例えば関節リウマチ、乾癬性関節炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、免疫性血小板減少症（成人I T P、新生児血小板減少症、小児I T P）、免疫性溶血性貧血（自己免疫及び薬物誘発）、E v a n s 症候群（血小板及び赤血球免疫性血球減少症）、新生児のR h 疾患、G o o d p a s t u r e 症候群（抗G B M 疾患）、セリアック病（C e l i a c）、自己免疫性心筋症、若年発症糖尿病；糸球体腎炎、自己免疫性甲状腺炎、ベーチェット病；移植片拒絶（例えば、移植において）、例えば、同種移植片拒絶又は移植片対宿主病；炎症性腸疾患、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎；脊椎関節症；強皮症；乾癬（T細胞媒介乾癬を含めて）及び炎症性皮膚病、例えば、皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹（例えば、慢性突発性、慢性自発性、物理的蕁麻疹）、水疱性類天疱瘡；血管炎（例えば、壊死性、皮膚性、肉芽腫性及び過敏性血管炎、抗酸球性多発血管炎性肉芽腫症）；結節性紅斑；好酸球性筋炎、好酸球性筋膜炎、皮膚又は器官の白血球浸潤を伴う癌を含めた炎症性又はアレルギー性疾患及び状態が挙げられる。

【0118】

ヒトC R T H 2 発現細胞が関係する障害または疾患として、好ましくは喘息、小児喘息、慢性閉塞性肺疾患、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎および急性または慢性副鼻腔炎が挙げられる。

本発明の抗体もしくは該抗体断片、又はこれらの誘導体を含有する医薬は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、又はこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

【0119】

投与経路としては、例えば、経口投与、又は口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、静脈内、若しくは腹腔内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、坐剤、注射剤、軟膏、又はテープ剤などが挙げられる。

【0120】

経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、又は顆粒剤などで挙げられる。

【0121】

本発明の抗体には、本発明の抗体またはその抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質、核酸などを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

【0122】

抗体の誘導体を治療方法、予防方法、治療薬または治療薬として使用する場合には、本発明の抗体またはその抗体断片に結合する薬剤として、化学療法剤、抗体医薬、免疫賦活剤、高分子の薬剤などが挙げられる。タンパク質としては、サイトカイン、増殖因子、毒素タンパク質などが挙げられる。核酸としては、デコイ、アンチセンス、s i R N A、m

10

20

30

40

50

i R N Aなどが挙げられる。

抗体の誘導体を検出方法、定量方法、検出用試薬、または定量用試薬として使用する場合には、本発明の抗体またはその抗体断片に結合する薬剤として、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。

【 0 1 2 3 】

本発明における、抗体の誘導体は、本発明の抗体またはその抗体断片のH鎖またはL鎖のN末端側またはC末端側、抗体またはその抗体断片中の適当な置換基または側鎖、さらには抗体または該抗体断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などを化学的手法〔抗体工学入門、地人書館（1994）記載の方法など〕により結合させることにより製造することができる。

10

【 0 1 2 4 】

また、本発明における、抗体の誘導体は、本発明の抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

【 0 1 2 5 】

放射性同位元素としては、例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 、または ^{211}At などが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、1 - イソチオシアネートベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX - DTPA）などが挙げられる。

20

【 0 1 2 6 】

低分子の薬剤としては、例えば、アクリジニウムエステルもしくはロフィンなどの発光物質、またはフルオレセインイソチオシアネート（FITC）もしくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート（RITC）などの蛍光物質などが挙げられる。

【 0 1 2 7 】

低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタルアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、または水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

30

【 0 1 2 8 】

高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（以下、PEGと表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。

【 0 1 2 9 】

免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、酵素免疫測定法（EIAまたはELISA）、蛍光免疫測定法（FIA）、発光免疫測定法（luminescent immunoassay）、ウエスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

40

【 0 1 3 0 】

本発明の抗体または該抗体断片を用いて、上記の方法に従いヒトCRTH2が発現した細胞を検出または測定することにより、ヒトCRTH2に関連する疾患を診断することができる。

【 0 1 3 1 】

本発明においてヒトCRTH2を検出または測定する対象となる生体試料としては、組織細胞、血液、血漿、血清、涙液、尿、糞便、組織液、肺胞洗浄液または培養液など、細胞外に分泌されたヒトCRTH2もしくはその一部を含むペプチド断片、又はヒトCRTH2を発現している細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

50

【 0 1 3 2 】

本発明の抗体若しくはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩などが挙げられる。検出用試薬としては、該抗体若しくはその抗体断片、またはこれらの誘導体を認識する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬が挙げられる。

【 0 1 3 3 】

以下に、本発明の抗体の製造方法、疾患の治療方法、及び疾患の診断方法について、具体的に説明する。

10

【 0 1 3 4 】

1. 抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

抗原となるヒトC R T H 2又はヒトC R T H 2を発現させた細胞は、ヒトC R T H 2全長又はその部分長をコードするc D N Aを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、又は動物細胞などに導入することにより、得ることができる。

【 0 1 3 5 】

また、ヒトC R T H 2を多量に発現している各種ヒト培養細胞、ヒト組織などからヒトC R T H 2を精製することによっても、得ることができる。また、該培養細胞、又は該組織などをそのまま抗原として用いることもできる。さらに、F m o c法、又はt B o c法などの化学合成法によりヒトC R T H 2の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。

20

【 0 1 3 6 】

ヒトC R T H 2またはヒトC R T H 2の部分配列を有する合成ペプチドには、C末端もしくはN末端にF L A GもしくはH i sなどの公知のタグが付加されていてもよい。

【 0 1 3 7 】

本発明で用いられるヒトC R T H 2は、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)又はCurrent Protocols in molecular Biology、John Wiley & Sons (1987-1997)などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該ヒトC R T H 2をコードするD N Aを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

30

【 0 1 3 8 】

まず、ヒトC R T H 2をコードする部分を含む完全長c D N Aを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長c D N Aの代わりに、完全長c D N Aをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのD N A断片を用いてもよい。次に、得られる該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

【 0 1 3 9 】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製又は染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードするD N Aを転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。

40

【 0 1 4 0 】

宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞、又は動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

【 0 1 4 1 】

大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、ヒトC R T H 2をコードする部分を含むD N A、及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。

50

【0142】

また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

【0143】

該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列（SD配列ともいう）と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【0144】

また、該ヒトC R T H 2をコードするDNAの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするヒトC R T H 2の生産率を向上させることができる

10

【0145】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、p B T r p 2、p B T a c 1、p B T a c 2（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社）、p K K 2 3 3 - 2（ファルマシア社）、p S E 2 8 0（インビトロジェン社）、p G E M E X - 1（プロメガ社）、p Q E - 8（キアゲン社）、p K Y P 1 0（特開昭58-110600号公報）、p K Y P 2 0 0 [Agricultural Biological Chemistry、48、669(1984)]、p L S A 1 [Agric Biol. Chem.、53、277(1989)]、p G E L 1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82、4306(1985)]、p B l u e s c r i p t I I S K (-)（ストラタジーン社）、p T r s 3 0 [大腸菌J M 1 0 9 / p T r s 3 0 (F E R M B P - 5 4 0 7)より調製]、p T r s 3 2 [大腸菌J M 1 0 9 / p T r s 3 2 (F E R M B P - 5 4 0 8)より調製]、p G H A 2 [大腸菌I G H A 2 (F E R M B P - 4 0 0)より調製、特開昭60-221091号公報]、p G K A 2 [大腸菌I G K A 2 (F E R M B P 6 7 9 8)より調製、特開昭60-221091号公報]、p T e r m 2（米国特許第4686191号明細書、米国特許第4939094号明細書、米国特許第5160735号明細書）、p S u p e x、p U B 1 1 0、p T P 5、p C 1 9 4、p E G 4 0 0 [J.Bacteriol.、172、2392 (1990)]、p G E X（ファルマシア社）、p E Tシステム（ノバジェン社）、又はp M E 1 8 S F L 3などが挙げられる。

20

30

【0146】

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、t r pプロモーター（P t r p）、l a cプロモーター、P Lプロモーター、P Rプロモーター、又はT 7プロモーターなどの、大腸菌又はファージなどに由来するプロモーターを挙げることができる。また、P t r pを2つ直列させたタンデムプロモーター、t a cプロモーター、l a c T 7プロモーター、又はl e t Iプロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

【0147】

宿主細胞としては、例えば、大腸菌X L - 1 B l u e、大腸菌X L 2 - B l u e、大腸菌D H 1、大腸菌M C 1 0 0 0、大腸菌K Y 3 2 7 6、大腸菌W 1 4 8 5、大腸菌J M 1 0 9、大腸菌H B 1 0 1、大腸菌N o . 4 9、大腸菌W 3 1 1 0、大腸菌N Y 4 9、又は大腸菌D H 5 αなどが挙げられる。

40

【0148】

宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、69、2110 (1972); Gene、17、107 (1982); Molecular & General Genetics、168、111 (1979)] が挙げられる。

【0149】

動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、p c D N A I、p c D M 8（フ

50

ナコシ社)、p A G E 1 0 7 [特開平 0 3 - 2 2 9 7 9 号公報; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p A S 3 - 3 (特開平 0 2 - 2 2 7 0 7 5 号公報)、p c D M 8 [Nature, 329, 840 (1987)]、p c D N A I / A m p (インビトロジェン社)、p c D N A 3 . 1 (インビトロジェン社)、p R E P 4 (インビトロジェン社)、p A G E 1 0 3 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、p A G E 2 1 0、p M E 1 8 S F L 3、p K A N T E X 9 3 (国際公開第 9 7 / 1 0 3 5 4 号)、N 5 K G 1 v a l (米国特許第 6 0 0 1 3 5 8 号明細書)、I N P E P 4 (Biogen - I D E C 社)およびトランスポゾンベクター (国際公開第 2 0 1 0 / 1 4 3 6 9 8 号)などが挙げられる。

【 0 1 5 0 】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (C M V) の i m m e d i a t e e a r l y (I E) 遺伝子のプロモーター、S V 4 0 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、S R α プロモーター、又はモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター若しくはエンハンサーが挙げられる。また、ヒト C M V の I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

10

【 0 1 5 1 】

宿主細胞としては、例えば、ヒト白血病細胞 N a m a l w a 細胞、サル細胞 C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 C H O 細胞 [Journal of Experimental Medicine, 108, 945(1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275(1968); Genetics, 55, 513(1968); Chromosoma, 41, 129(1973); Methods in Cell Science, 18, 115(1996); Radiation Research, 148, 260(1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275(1968); Cell, 6, 121(1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II(pp.883-900)]、C H O / D G 4 4、C H O - K 1 (A T C C 番号: C C L - 6 1)、D U k X B 1 1 (A T C C 番号: C C L - 9 0 9 6)、P r o - 5 (A T C C 番号: C C L - 1 7 8 1)、C H O - S (L i f e T e c h n o l o g i e s、C a t # 1 1 6 1 9)、P r o - 3、ラットミエローマ細胞 Y B 2 / 3 H L . P 2 . G 1 1 . 1 6 A g . 2 0 (又は Y B 2 / 0 とともいう)、マウスミエローマ細胞 N S 0、マウスミエローマ細胞 S P 2 / 0 - A g 1 4、シリアンハムスター細胞 B H K 又は H B T 5 6 3 7 (特開昭 6 3 - 0 0 0 2 9 9 号公報)などが挙げられる。

20

30

【 0 1 5 2 】

宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に D N A を導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 0 2 - 2 2 7 0 7 5 号公報)、又はリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]などが挙げられる。

【 0 1 5 3 】

以上のようにして得られるヒト C R T H 2 をコードする D N A を組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、又は動物細胞などの由来の形質転換体を培地に培養し、培養物中に該ヒト C R T H 2 を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒト C R T H 2 を製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

40

【 0 1 5 4 】

真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖又は糖鎖が付加されたヒト C R T H 2 を得ることができる。

【 0 1 5 5 】

誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、l a c プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシドなどを、t r p プロモーターを用いた組換えベクターで形質転

50

換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

【 0 1 5 6 】

動物細胞を宿主として得られる形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されている R P M I 1 6 4 0 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、E a g l e の M E M 培地 [Science, 122, 501(1952)]、ダルベッコ改変 M E M 培地 [Virology, 8, 396(1959)]、1 9 9 培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1(1950)]、I s c o v e ' s M o d i f i e d D u l b e c c o ' s M e d i u m (I M D M) 培地、又はこれら培地に牛胎児血清 (F B S) などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常 p H 6 ~ 8、3 0 ~ 4 0、5 % C O₂ 存在下などの条件下で 1 ~ 7 日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン又はペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

10

【 0 1 5 7 】

ヒト C R T H 2 をコードする遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産又は融合蛋白質発現などの方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)] を用いることができる。

【 0 1 5 8 】

ヒト C R T H 2 の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、又は宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞、又は生産させるヒト C R T H 2 の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

【 0 1 5 9 】

20

ヒト C R T H 2 が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619(1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平 0 5 - 3 3 6 9 6 3 号公報、又は国際公開第 9 4 / 2 3 0 2 1 号などに記載の方法を用いることにより、ヒト C R T H 2 を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【 0 1 6 0 】

また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系 (特開平 0 2 - 2 2 7 0 7 5 号公報) を利用してヒト C R T H 2 の生産量を上昇させることもできる。

【 0 1 6 1 】

得られるヒト C R T H 2 は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。ヒト C R T H 2 が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、又はダイノミルなどを用いて細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

30

【 0 1 6 2 】

前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (D E A E) - セファロース、D I A I O N H P A - 7 5 (三菱化学社) などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S - S e p h a r o s e F F (ファルマシア社) などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、又は等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

40

【 0 1 6 3 】

ヒト C R T H 2 が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ヒト C R T H 2 の不溶体を回収する。回収した該ヒト C R T H 2 の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、該ヒト C R T H 2 を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【 0 1 6 4 】

50

ヒトC R T H 2又はその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該ヒトC R T H 2又はその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0165】

また、本発明において用いられるヒトC R T H 2は、F m o c法、又はt B o c法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテインテクノロジーインストルメント社、シンセセル・ベガ社、パーセプチブ社、又は島津製作所社などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

10

【0166】

(2) 動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

3～20週令のマウス、ラット又はハムスターなどの動物に、(1)で得られる抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で十分な抗体価の上昇が認められない場合には、ヒトC R T H 2ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

【0167】

免疫は、動物の皮下、尾根部、静脈内又は腹腔内に、例えば、フロイン드의完全アジュバント、又は水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、B S A (ウシ血清アルブミン)、又はK L H (K e y h o l e L i m p e t H e m o c y a n i n)などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

20

【0168】

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間おきに1～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法[Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

【0169】

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

30

【0170】

(3) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られる株化細胞を用い、例えば、8 - アザグアニン耐性マウス(B A L B / c 由来)骨髄腫細胞株P 3 - X 6 3 A g 8 - U 1 (P 3 - U 1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1(1978)]、P 3 - N S 1 / 1 A g 4 1 (N S - 1) [European J. Immunology, 6, 511(1976)]、S P 2 / 0 - A g 1 4 (S P - 2) [Nature, 276, 269(1978)]、P 3 - X 6 3 - A g 8 6 5 3 (6 5 3) [J. Immunology, 123, 1548(1979)]、又はP 3 - X 6 3 - A g 8 (X 6 3) [Nature, 256, 495(1975)]などを用いる。

40

【0171】

該骨髄腫細胞は、正常培地[グルタミン、2 - メルカプトエタノール、ジェンタマイシン、F B S、及び8 - アザグアニンを加えたR P M I 1 6 4 0培地]で継代し、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0172】

(4) 細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

(2)で得られる融合用抗体産生細胞と(3)で得られる骨髄腫細胞をM i n i m u m E s s e n t i a l M e d i u m (M E M)培地又はP B S (リン酸二ナトリウム1

50

． 83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1 リットル、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5 ~ 10 : 1 になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。

【0173】

沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール - 1000 (PEG - 1000)、MEM 培地及びジメチルスルホキシドの混液を 37 で、攪拌しながら加える。さらに 1 ~ 2 分間毎に MEM 培地 1 ~ 2 mL を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50 mL になるようにする。遠心分離後、上清を除く。

【0174】

沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞に HAT 培地 [ヒポキサンチン、チミジン、及びアミノプテリンを加えた正常培地] 中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を 37、5% CO₂ インキュベーター中、7 ~ 14 日間培養する。

10

【0175】

培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のヒト CRTH2 発現細胞に対する反応性解析などのハイブリドーマの選択方法により、ヒト CRTH2 を含む抗原に反応し、ヒト CRTH2 を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返し [1 回目は HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められるものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

【0176】

20

(5) 精製モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2, 6, 10, 14 - テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 mL を腹腔内投与し、2 週間飼育する] した 8 ~ 10 週令のマウス又はヌードマウスに、(4) で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。10 ~ 21 日でハイブリドーマは腹水がんに化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、40 ~ 50% 硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAE - セファロースカラム、プロテイン A - カラム又はゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgG 又は IgM 画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

【0177】

また、(4) で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、10% FBS 添加を添加した RPMI 1640 培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Hybridoma - SFM 培地に懸濁し、3 ~ 7 日間培養する。得られる細胞懸濁液を遠心分離し、得られる上清よりプロテイン A - カラム又はプロテイン G - カラムによる精製を行ない、IgG 画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Hybridoma - SFM 培地には 5% ダイゴ GF 21 を添加することもできる。

30

【0178】

抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法又は 280 nm での吸光度より算出する。

【0179】

(6) モノクローナル抗体の選択

40

モノクローナル抗体の選択は、以下に示す通り、ヒト CRTH2 を発現する細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで解析することにより行う。

【0180】

ヒト CRTH2 を発現する細胞としては、例えば (1) で得られるヒト CRTH2 をコードする cDNA を含む発現ベクターを動物細胞などに導入して得られる遺伝子導入細胞や、ヒトの好酸球、好塩基球、Th2、ILC2、non classical monocyte および Th2 / Th17 細胞などが挙げられる。

【0181】

細胞を 96 ウェルプレートなどのプレートに分注した後、第 1 抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清又は精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。

50

反応後の細胞を1～10% bovine serum albumin (BSA)を含むPBS(以下、BSA-PBSと記す)などで、よく洗浄した後、第2抗体として蛍光試薬などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。BSA-PBSなどでよく洗浄した後、フローサイトメーターを用いて標識化抗体の蛍光量を測定することにより、発現細胞に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

【0182】

また、本発明のモノクローナル抗体と競合してヒトCRTH2に結合するモノクローナル抗体は、上述のフローサイトメトリーを用いた結合反応検出系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。

【0183】

すなわち、被検抗体を加えた時に本発明のモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、ヒトCRTH2のアミノ酸配列、又はその立体構造への結合について、本発明で取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

【0184】

さらに、本発明のヒトCRTH2のアミノ酸配列、又はその立体構造に結合するモノクローナル抗体が認識するエピトープと同じエピトープに結合する抗体は、上述のフローサイトメトリーを用いた結合反応検出系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な合成ペプチド、又はエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

【0185】

2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体及びヒト化抗体の作製方法を示す。

(1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体のCH及びCLをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCH及びCLをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0186】

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCH及びCLを用いることができる。例えば、ヒト抗体のγ1サブクラスのCH及びκクラスのCLなどを用いる。ヒト抗体のCH及びCLをコードするDNAには、cDNAを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることもできる。

【0187】

動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnol., 3, 133(1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307(1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223(1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527(1981)]、pSG1bd2-4 [Cytotechnol., 4, 173(1990)]、又はpSE1UK1Seed1-3 [Cytotechnol., 13, 79(1993)]などを用いる。

【0188】

動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、SV40の初期プロモーター [J. Biochem., 101, 1307(1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスLTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960(1987)]、又は免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell, 41, 479(1985)]とエンハンサー [Cell, 33, 717(1983)]などを用いる。

【0189】

遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体H鎖及びL鎖が同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム

10

20

30

40

50

型)の遺伝子組換え抗体発現用ベクター [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)] を用いるが、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するセパレートベクターを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、pKANTE X 93 (国際公開第97/10354号)、pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)] などを用いる。

【0190】

(2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得及びアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAの取得及びアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。

10

【0191】

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ又はプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。

【0192】

前記ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分又はV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VH又はVLをコードするcDNAを有する組換えファージ又は組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ又は組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVH又はVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVH又はVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

20

【0193】

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスター、又はラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

【0194】

ハイブリドーマ細胞からの全RNAの調製には、チオシアン酸グアニジン - トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、又はRNA easy kit (キアゲン社)などのキットなどを用いる。

【0195】

全RNAからのmRNAの調製には、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]、又はOligo-dT30<Super>mRNA Purification Kit (タカラバイオ社)などのキットなどを用いる。また、Fast Track mRNA Isolation Kit (インビトロジェン社)、又はQuickPrep mRNA Purification Kit (ファルマシア社)などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からmRNAを調製することもできる。

30

【0196】

cDNAの合成及びcDNAライブラリーの作製には、公知の方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], Current Protocols in molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)], SperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (インビトロジェン社)、又はZAP-cDNA Synthesis Kit (ストラタジーン社)などのキットなどを用いる。

40

【0197】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターには、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。

【0198】

例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λZAPII (

50

ストラタジーン社)、λ g t 1 0、λ g t 1 1 [DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49(1985)]、L a m b d a B l u e M i d (クローンテック社)、λ E x C e l l、p T 7 T 3 - 1 8 U (ファルマシア社)、p c D 2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、又はp U C 1 8 [Gene, 33, 103 (1985)]などを用いる。

【 0 1 9 9 】

ファージ又はプラスミドベクターにより構築されるc D N Aライブラリーを導入する大腸菌には、該c D N Aライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、X L - 1 B l u e M R F [Strategies, 5, 81(1992)]、C 6 0 0 [Genetics, 39, 440(1954)]、Y 1 0 8 8、Y 1 0 9 0 [Science, 222, 778(1983)]、N M 5 2 2 [J. Mol. Biol., 166, 1(1983)]、K 8 0 2 [J. Mol. Biol., 16, 118(1966)]、又はJ M 1 0 5 [Gene, 38, 275(1985)]などを用いる。

10

【 0 2 0 0 】

c D N Aライブラリーからの非ヒト抗体のV H又はV Lをコードするc D N Aクローンの選択には、アイソトープ又は蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、又はブランク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]などを用いる。

【 0 2 0 1 】

また、プライマーを調製し、m R N Aから合成したc D N A又はc D N Aライブラリーを鋳型として、P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n法 [以下、PCR法と記す、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons(1987-1997)]を行うことよりV H又はV Lをコードするc D N Aを調製することもできる。

20

【 0 2 0 2 】

選択されたc D N Aを、適当な制限酵素などで切断後、p B l u e s c r i p t S K (-) (ストラタジーン社)などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該c D N Aの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)]などの反応を行った後、A B I P R I S M 3 7 0 0 (P E バイオシステムズ社)又はA . L . F . D N A シーケンサー (ファルマシア社)などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

30

【 0 2 0 3 】

決定した塩基配列からV H及びV Lの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のV H及びV Lの全アミノ酸配列 [A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]と比較することにより、取得したc D N Aが分泌シグナル配列を含む抗体のV H及びV Lの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。

【 0 2 0 4 】

分泌シグナル配列を含む抗体のV H及びV Lの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のV H及びV Lの全アミノ酸配列 [A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、V H及びV Lの各C D Rのアミノ酸配列についても、既知の抗体のV H及びV Lのアミノ酸配列 [A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]と比較することによって見出すことができる。

40

【 0 2 0 5 】

また、得られるV H及びV Lの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、S W I S S - P R O T又はP I R - P r o t e i nなどの任意のデータベースに対してB L A S T法 [J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]などの相同性検索を行い、V H及びV Lの完全なアミノ酸配列が新規なものを確認できる。

【 0 2 0 6 】

50

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体の C H 又は C L をコードするそれぞれの遺伝子の上流に、それぞれ非ヒト抗体の V H 又は V L をコードする c D N A をそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

【0207】

非ヒト抗体の V H 又は V L をコードする c D N A の 3' 末端側と、ヒト抗体の C H 又は C L の 5' 末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計した V H 及び V L の c D N A を作製する。

10

【0208】

作製された V H 及び V L の c D N A を、(1) で得られるヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の C H 又は C L をコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

【0209】

また、非ヒト抗体 V H 又は V L をコードする c D N A を、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 D N A を用いて P C R 法によりそれぞれ増幅し、(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

【0210】

(4) ヒト化抗体の V 領域をコードする c D N A の構築

20

ヒト化抗体の V H 又は V L をコードする c D N A は、以下のようにして構築することができる。

【0211】

非ヒト抗体の V H 又は V L の C D R のアミノ酸配列を移植するヒト抗体の V H 又は V L の F R のアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択する F R のアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。

【0212】

例えば、P r o t e i n D a t a B a n k などのデータベースに登録されているヒト抗体の F R のアミノ酸配列、又はヒト抗体の F R の各サブグループの共通アミノ酸配列 [A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)] などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体の V H 又は V L の F R のアミノ酸配列とできるだけ高い相溶性 (少なくとも 60% 以上) の F R のアミノ酸配列を選択する。

30

【0213】

次に、選択したヒト抗体の V H 又は V L の F R のアミノ酸配列に、もとの抗体の C D R のアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体の V H 又は V L のアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)] を考慮して D N A 配列に変換し、ヒト化抗体の V H 又は V L のアミノ酸配列をコードする D N A 配列をそれぞれ設計する。

【0214】

40

設計した D N A 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 D N A を合成し、それらを用いて P C R 反応を行う。この場合、P C R 反応での反応効率及び合成可能な D N A の長さから、好ましくは H 鎖、L 鎖それぞれについて各 6 本の合成 D N A を設計する。また、両端に位置する合成 D N A の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、容易に、ヒト化抗体の V H 又は V L をコードする c D N A を、(1) で得られるヒト化抗体発現用ベクターに、クローニングすることができる。

【0215】

P C R 反応後、増幅産物を p B l u e s c r i p t S K (-) (ストラタジーン社) などのプラスミドにそれぞれクローニングし、(2) に記載の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体の H 鎖全長又は L 鎖全長のアミノ酸配列をコードす

50

るDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0216】

または、設計したDNA配列に基づき、VH全長およびVL全長を各々1本の長鎖DNAとして合成したものを、上記PCR増幅産物に代えて用いることもできる。さらに、合成鎖DNAの両端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAを、(1)で得られるヒト化抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

【0217】

(5) ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVH及びVLのCDRのみをヒト抗体のVH及びVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。ヒト化抗体では、ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に参与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、及び抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に参与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

10

【0218】

抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を同定するために、X線結晶解析[J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)]又はコンピューターモデリング[Protein Engineering, 7, 1501 (1994)]などを用いることにより、抗体の立体構造の構築及び解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有するヒト化抗体を取得できる。

20

【0219】

ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて(4)に記載のPCR反応を行うことにより、置換することができる。PCR反応後の増幅産物について(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

【0220】

(6) ヒト化抗体発現ベクターの構築

30

(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH又はCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVH又はVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

【0221】

例えば、(4)及び(5)で得られるヒト化抗体のVH又はVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られるヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH又はCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

【0222】

40

(7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

(3)及び(6)で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、又はそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類の遺伝子組換え抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

【0223】

発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばCOS-7細胞(ATCC番号: CRL 1651)を用いる[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283(1991)]。

COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press(1991)]、又はリポフェクション法[Proc. Natl. Acad

50

. Sci. USA, 84, 7413(1987)] などを用いる。

【 0 2 2 4 】

発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)] などを用いて測定する。

【 0 2 2 5 】

(8) 遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製 (3) 及び (6) で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

10

【 0 2 2 6 】

宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法 [特開平 0 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報 ; Cytotechnology, 3, 133(1990)] などを用いる。

【 0 2 2 7 】

遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、CHO-K1 (ATCC 番号 : CCL - 6 1)、DukXB11 (ATCC 番号 : CCL - 9 0 9 6)、Pro-5 (ATCC 番号 : CCL - 1 7 8 1)、CHO-S (Life Technologies, Cat # 1 1 6 1 9)、ラットミエローマ細胞 YB2 / 3 HL.P2.G11.16Ag.20 (又は YB2 / 0 ともいう)、マウスミエローマ細胞 NS0、マウスミエローマ細胞 SP2 / 0 - Ag14 (ATCC 番号 : CRL 1 5 8 1)、マウス P3 - X63 - Ag8653 細胞 (ATCC 番号 : CRL 1 5 8 0)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (Dihydroforate Reductase、以下、DHFR と表記する) が欠損した CHO 細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)]、レクチン耐性を獲得した Lec13 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 55(1986)]、 α 1,6 - フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO 細胞 (国際公開第 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6 号、国際公開第 0 2 / 3 1 1 4 0 号)、ラット YB2 / 3 HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC 番号 : CRL 1 6 6 2) などを用いる。

20

【 0 2 2 8 】

発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、G418 硫酸塩などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する (特開平 0 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報)。

30

【 0 2 2 9 】

動物細胞培養用培地には、RPMI 1 6 4 0 培地 (インビトロジェン社)、GIT 培地 (日本製薬社)、EX-CELL 3 0 1 培地 (ジェイアールエイチ社)、IMDM 培地 (インビトロジェン社)、Hybridoma-SFM 培地 (インビトロジェン社)、又はこれら培地に FBS などの各種添加物を添加した培地などを用いる。

【 0 2 3 0 】

得られる形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は ELISA 法などにより測定できる。また、DHFR 増幅系 (特開平 0 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報) などを利用して、形質転換株が産生する遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

40

【 0 2 3 1 】

遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A - カラムを用いて精製する [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過などの蛋白質の精製で用いられる方法を組み合わせずこともできる。

【 0 2 3 2 】

50

精製した遺伝子組換え抗体のH鎖、L鎖または抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [Nature, 227, 680(1970)]、又はウエスタンブロッティング法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] など用いて測定することができる。

【0233】

3. 精製モノクローナル抗体又は該抗体断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体又は該抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。

【0234】

ヒトCRTH2発現細胞株に対する結合活性は、例えば前述の1.(6)記載のフローサイトメトリーを用いた結合反応検出系などの蛍光抗体法 [Cancer Immunol.Immunother., 36, 373(1993)] を用いて測定できる。

【0235】

ヒトCRTH2陽性培養細胞株に対するCDC活性、又はADCC活性は公知の測定方法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993); Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993)] により測定する。

【0236】

4. 抗体のエフェクター活性を制御する方法

本発明のモノクローナル抗体のエフェクター活性を制御する方法としては、抗体のFc領域の297番目のアスパラギン (Asn) に結合するN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に $\alpha 1, 6$ 結合するフコース (コアフコースともいう) の量を制御する方法 (国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第00/61739号)、又は抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明のモノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

【0237】

エフェクター活性とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、ADCC活性、CDC活性、又はマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス (Antibody-dependent phagocytosis、ADP活性) などが知られている。

【0238】

エフェクター活性の測定法として、例えば、標的として炎症性細胞、エフェクターとしてヒト末梢血単核球 (PBMC)、そして炎症性細胞特異的な抗体を混合し、4時間程度インキュベーションした後、細胞障害の指標として遊離してきた乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定することができる。もしくは、ヒトPBMCに、例えばCD20の様な血液細胞特異的な抗原を認識する抗体を混合し、インキュベーションした後、遊離LDHの測定やフローサイトメトリーによる該細胞数の減少をエフェクター活性として測定することができる。

【0239】

抗体のFcのN結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加又は低下させることができる。抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、例えば、 $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞を用いて抗体を発現させる方法が挙げられ、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いADCC活性を有する。

【0240】

一方、抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、例えば、 $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用

10

20

30

40

50

いて抗体を発現させる方法が挙げられ、フコースが結合している抗体を取得することができる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いA D C C活性を有する。

【0241】

また、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでA D C C活性又はC D C活性を増加又は低下させることができる。例えば、米国特許公開第2007/0148165号明細書に記載のFc領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のC D C活性を増加させることができる。

【0242】

また、米国特許第6737056号明細書、米国特許第7297775号明細書又は米国特許第7317091号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、A D C C活性又はC D C活性を、増加させることも低下させることもできる。

【0243】

また本発明の抗体には、上述の抗体定常領域におけるアミノ酸改変や糖鎖改変に合わせて例えば特開2013-165716号公報、特開2012-021004号公報などに記載のアミノ酸改変を行うことにより、Fc受容体への反応性を制御することで血中半減期を制御した抗体も含まれる。

【0244】

さらに、上述の方法を組み合わせ、一つの抗体に使用することにより、抗体のエフェクター活性や血中半減期が制御された抗体を取得することができる。

【0245】

5. 本発明のモノクローナル抗体又は該抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明の抗体は、ヒトC R T H 2が関係する疾患の治療に用いることができる。投与経路としては、例えば、経口投与、又は口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、静脈内、若しくは腹腔内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、坐剤、注射剤、軟膏、又はテープ剤などが挙げられる。

【0246】

経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、又は顆粒剤などが挙げられる。

乳剤又はシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、p - ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、又はストロベリーフレーバー若しくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

【0247】

カプセル剤、錠剤、散剤又は顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトールなどの賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤又はグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

【0248】

非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、坐剤、又は噴霧剤などが挙げられる。

【0249】

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、又はその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。

【0250】

坐剤はカカオ脂、水素化脂肪、又はカルボン酸などの担体を用いて製造する。

【0251】

10

20

30

40

50

噴霧剤は受容者の口腔及び気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体又は該抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖又はグリセリンなどを用いる。また、エアロゾル又はドライパウダーとして製造することもできる。

【 0 2 5 2 】

さらに、上記経口剤においても、経口投与に適当な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【 0 2 5 3 】

6. 本発明の抗体又は該抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明の抗体又は該抗体断片を用いて、ヒトC R T H 2 又はヒトC R T H 2 が発現した細胞を検出又は測定することにより、ヒトC R T H 2 が関連する疾患を診断することができる。

【 0 2 5 4 】

ヒトC R T H 2 が関連する疾患の一つであるアレルギー疾患の診断は、例えば、患者由来の末梢血、喀痰、鼻汁または肺胞洗浄液などに存在する炎症性細胞に発現しているヒトC R T H 2 をフローサイトメーターなどの免疫学的手法を用いて検出することにより行うことができる。

【 0 2 5 5 】

免疫学的手法とは、標識を施した抗原又は抗体を用いて、抗体量又は抗原量を検出又は測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウエスタンブロット法又は物理化学的手法などを用いる。

【 0 2 5 6 】

放射性物質標識免疫抗体法は、例えば、抗原又は抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体又は該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体又は結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

【 0 2 5 7 】

酵素免疫測定法は、例えば、抗原又は抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体又は該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体又は結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する。例えばサンドイッチE L I S A 法などを用いる。

【 0 2 5 8 】

酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知[酵素免疫測定法、医学書院(1987)]の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、又はビオチン標識などを用いる。

【 0 2 5 9 】

サンドイッチE L I S A 法は、固相に抗体を結合させた後、検出又は測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該E L I S A 法では、検出又は測定したい抗原を認識する抗体又は抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、第1の抗体又は抗体断片を予めプレート(例えば、96ウェルプレート)に吸着させ、次に第2の抗体又は抗体断片をF I T C などの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、又はビオチンなどで標識しておく。

【 0 2 6 0 】

上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞又はその破砕液、組織又はその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、又は眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体又は抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。

【 0 2 6 1 】

サンドイッチE L I S A 法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、F a b、F a b'、又はF (a b')₂などの抗体フ

10

20

30

40

50

ラグメントを用いてもよい。サンドイッチ E L I S A 法で用いる 2 種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体又は抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体又は抗体断片との組み合わせでもよい。

【 0 2 6 2 】

蛍光免疫測定法は、文献 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)] などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、例えば、公知 [蛍光抗体法、ソフトサイエンス社 (1 9 8 3)] の蛍光標識が挙げられる。例えば、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C)、又はテトラメチルローダミンイソチオシアネート (R I T C) などが挙げられる。

10

【 0 2 6 3 】

発光免疫測定法は文献 [生物発光と化学発光 臨床検査 4 2、廣川書店 (1 9 9 8)] などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、例えば、公知の発光体標識が挙げられ、アクリジニウムエステル、ロフィンなどが挙げられる。

【 0 2 6 4 】

ウエスタンブロット法は、抗原又は抗原を発現した細胞などを S D S (ドデシル硫酸ナトリウム) - P A G E [Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン (P V D F) 膜又はニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体又は抗体断片を反応させ、さらに F I T C などの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、又はビオチン標識などを施した抗マウス I g G 抗体又は結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。一例を以下に示す。

20

【 0 2 6 5 】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞又は組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりの蛋白量として 0 . 1 ~ 3 0 μ g を S D S - P A G E 法により泳動する。泳動された蛋白質を P V D F 膜にトランスファーし 1 ~ 1 0 % B S A - P B S に室温で 3 0 分間反応させブロッティング操作を行う。

【 0 2 6 6 】

ここで本発明の抗体を反応させ、0 . 0 5 ~ 0 . 1 % の T w e e n - 2 0 を含む P B S (以下、T w e e n - P B S と記す) で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウス I g G を室温で 2 時間反応させる。T w e e n - P B S で洗浄し、E C L W e s t e r n B l o t t i n g D e t e c t i o n R e a g e n t s (アマシャム社製) などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する。ウエスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

30

【 0 2 6 7 】

物理化学的手法は、例えば、抗原であるヒト C R T H 2 と本発明のモノクローナル抗体又は該抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、例えば、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法又はラテックス免疫比濁法 [臨床検査法提要、金原出版 (1 9 9 8)] などが挙げられる。

40

【 0 2 6 8 】

ラテックス免疫比濁法は、抗体又は抗原を感作させた粒径 0 . 1 ~ 1 μ m 程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原又は抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度又は積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

【 0 2 6 9 】

本発明の抗体又は該抗体断片を用いて、当該抗体による治療有効性を治療開始前に判断

50

する方法としては、例えば以下が挙げられる。

【0270】

まず、治療開始前に、患者体内から例えば末梢血、喀痰、肺胞洗浄液、鼻汁などを採取し、その懸濁液に本発明の抗体又は該抗体断片を添加し、一定時間後、炎症性細胞の除去やT_H2タイプサイトカインなどの生体機能分子に対する阻害活性をはじめとした、抗炎症性細胞活性を測定する。測定の結果、抗炎症性細胞活性が検出された場合、その末梢血、喀痰、鼻汁などを有する患者の治療には、本発明の抗体又は該抗体断片が有効であると治療開始前に判断することができる。

【実施例】

【0271】

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0272】

[実施例1]

ヒトCRTH2発現細胞の造成

(1) ヒトCRTH2発現ベクターの作製

ヒトCRTH2(以下CRTH2と記すこともある)のcDNAは全合成し、以降の試験に用いた。ヒトCRTH2のcDNA配列を配列番号1に、アミノ酸配列を配列番号2に記載する。

【0273】

(i) ヒトCRTH2遺伝子発現pKANTEX93ベクターの構築

制限酵素EcoRIおよびKpnIを用いて、ヒトCRTH2のcDNAをベクターpKANTEX93(国際公開第97/10354号)と連結し、ヒトCRTH2遺伝子発現pKANTEX93ベクターを構築した。

【0274】

(ii) ヒトCRTH2遺伝子発現pAMohベクターの構築

pAMoh(国際公開第03/087366号)に対しても、制限酵素KpnIおよびHindIIIを用いてヒトCRTH2遺伝子を組み込み、ヒトCRTH2遺伝子発現pAMohベクターを構築した。

【0275】

(2) ヒトCRTH2発現CHO/DG44細胞の造成

DHFR遺伝子欠損CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞DG44株(CHO/DG44細胞)を、三菱化学株式会社・横浜総合研究所より入手し、ヒトCRTH2発現細胞造成に使用した。培養には10%透析ウシ胎児血清(dFBS)(GIBCO社)、HT[ヒポキサンチン(H)、チミジン(T)]supplement(GIBCO社)、及び50µg/mLゲンタマイシン(ナカライテスク社)を添加したIMDM(GIBCO社)(以下、IMDM培養培地と略記する)を用いた。

【0276】

まず、(1)-(i)で作製されたヒトCRTH2遺伝子発現pKANTEX93ベクターを制限酵素AatII処理によって切断し、得られた直鎖状DNAを精製し、滅菌水に溶解した。このDNAをエレクトロポレーション法により、CHO/DG44細胞に導入し、HTsupplementを抜いたIMDM培養培地にて3日程度培養した。

【0277】

その後、10%dFBS、0.5mg/mL G418(ナカライテスク社)、及び50µg/mLゲンタマイシン(ナカライテスク社)を加えたIMDM(以下、IMDM選択培地と略記する)で薬剤耐性細胞を選択した。選択した薬剤耐性細胞を、96ウェルプレートに75cells/プレートとなる様に播種し、さらに2週間ほどIMDM選択培地にて培養した。ウェル毎に顕微鏡下で観察し、シングルクローンとなっているものを順次拡大培養した。

【0278】

10

20

30

40

50

得られた薬剤耐性細胞を0.02% EDTA溶液(ナカライテスク社)で剥離し、PBS(phosphate buffered saline)で洗浄した後、2%ウシ胎児血清(FBS)、0.05%NaN₃及び1mM EDTAを含むPBS(Staining Medium、以下SMと略記する)で懸濁した。次に、 2×10^5 cells/wellとなるように96ウェルプレートに播種し、1700rpmで2分間の遠心分離を行った。

【0279】

上清を除いた後、SMで調製したPE標識抗ヒトCRT H2抗体(ベックマンコールター社)を添加し、4で1時間の反応を行った。細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメーター(BDバイオサイエンス社、FACS Canto II)で解析した。ヒトCRT H2が高発現するクローンを選択し、この細胞をヒトCRT H2発現CHO/DG44細胞とした。

10

【0280】

(3) FLAG融合ヒトCRT H2発現ベクターの作製

(i) FLAG融合ヒトCRT H2遺伝子発現pAMohベクターの構築

(1)-(ii)で作製されたヒトCRT H2遺伝子発現pAMohから、プライマーhuman CRT H2 FLAG-A(配列番号3)及びhuman CRT H2 FLAG-B(配列番号4)を用いて、C末端にFLAGタグが付加されたヒトCRT H2(配列番号5)をpolymerase chain reaction(以下、PCRと記す)で増幅し、制限酵素KpnIおよびHindIIIを用いて、ベクターpAMoh(国際公開第03/087366号)と連結し、FLAG融合ヒトCRT H2遺伝子発現pAMohベクターを構築した。

20

【0281】

(ii) FLAG融合ヒトCRT H2遺伝子発現pKANTE X93ベクターの構築

(3)-(i)で構築されたFLAG融合ヒトCRT H2遺伝子発現pAMohベクターから、プライマーhuman CRT H2 FLAG-C(配列番号6)及びhuman CRT H2 FLAG-D(配列番号7)を用いて、C末端にFLAGタグが付加されたヒトCRT H2をPCRで増幅し、制限酵素EcoRIおよびKpnIを用いて、ベクターpKANTE X93(国際公開第97/10354号)と連結し、FLAG融合ヒトCRT H2遺伝子発現pKANTE X93ベクターを構築した。

30

【0282】

(4) FLAG融合ヒトCRT H2発現3Y1-B細胞の造成

ラット3Y1-B細胞を、理研バイオリソースセンターより入手し、FLAG融合ヒトCRT H2発現細胞造成に使用した。培養には10%FBS(GIBCO社)、及び50µg/mL ゲンタマイシン(ナカライテスク社)を添加したDMEM(GIBCO社)(以下、DMEM培養培地と略記する)を用いた。

【0283】

(3)-(ii)で作製されたFLAG融合ヒトCRT H2遺伝子発現pKANTE X93ベクターを制限酵素AatII処理によって切断し、得られた直鎖状DNAを精製し、滅菌水に溶解した。このDNAを、Fugene6(プロメガ社)を用いたLipofect ion法により3Y1-B細胞に導入し、DMEM培養培地にて3日間程度培養した。その後、10%FBS、0.8mg/mL G418(ナカライテスク社)、及び50µg/mL ゲンタマイシン(ナカライテスク社)を添加したDMEM(以下、DMEM選択培地)で薬剤耐性細胞を選択した。

40

【0284】

得られた薬剤耐性細胞を0.05%トリプシン溶液(invitrogen社)で剥離し、PBSで洗浄した後、SMで懸濁した。次に、 2×10^5 cells/wellとなるように96ウェルプレートに播種し、1700rpmで2分間の遠心分離を行った。上清を除いた後、SMで調製したPE標識抗ヒトCRT H2抗体(ベックマンコールター社)を添加し、4で1時間の反応を行った。細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍

50

光強度をフローサイトメーター（BDバイオサイエンス社、FACS Aria）で解析した。FLAG融合ヒトCRTH2を高発現する画分をシングルセルソーティングし、拡大培養を行い、FLAG融合ヒトCRTH2発現3Y1-B細胞とした。

【0285】

〔実施例2〕

ヒトCRTH2に対する抗体モノクローナル抗体の作製

（1）ラットへの免疫

ヒトCRTH2に対するモノクローナル抗体を取得するために、初回投与時の週齢が9週齢の雌性WKY/NCr1Cr1jラット（WKYラット）（チャールスリバー社）に免疫した。

10

【0286】

初回投与は、 5×10^6 cellsのFLAG融合ヒトCRTH2発現3Y1-B細胞を100 μ Lの生理食塩液（大塚製薬工場社）に懸濁し、Sigma Adjuvant System（登録商標）（シグマアルドリッチ社）100 μ Lと合わせて200 μ Lの細胞懸濁液を調製し、1ヶ所あたり100 μ LをWKYラットの尾根部に左右2ヶ所筋肉内投与した。

【0287】

また初回投与2週間後に、 5×10^6 cellsのFLAG融合ヒトCRTH2発現3Y1-B細胞を200 μ Lの生理食塩液に懸濁し、同様の方法で投与を行った。

【0288】

20

（2）ハイブリドーマの作製

（1）で2回目の免疫を行った3日後に、外科的にWKYラットから腸骨リンパ節を摘出し、細胞融合に供した。

【0289】

まず、摘出した腸骨リンパ節をスライドガラスですりつぶし、組織をほぐした。この腸骨リンパ節組織をMinimum Essential Media（MEM）（invitrogen社）に懸濁し、セルストレーナーを通すことにより、余分な組織を除いた。1200 rpmで5分間遠心分離することにより上清を除いた後、再びMEMで懸濁し、腸骨リンパ節細胞とした。

【0290】

30

得られた腸骨リンパ節細胞数に対し、1/5細胞数のマウスミエローマ細胞株P3-U1（ATCC）を混合した。遠心分離により上清を除いた後、37℃の温浴の中で温めつつ、500 μ LのPEG溶液[Polyethylene glycol 1000（純正化学社）]及びMEMをそれぞれ1 mLずつ混合し、DMSO（ジメチルスルホキシド）（シグマアルドリッチ社）を350 μ L加えたものを穏やかに添加し、そこに1分毎にMEM 1 mLを5回加えた後さらに45 mLのMEMを添加した。

【0291】

900 rpmで5分間遠心分離することにより上清を除いた後、細胞をHAT培地[500 mLのRPMI-1640（和光純薬社）に対し、10 mLのHAT（ヒポキサンチン（H）、アミノプテリン（A）、チミジン（T））溶液（GIBCO社）、0.5 mLの55 mmol/L 2-Mercaptoethanol（invitrogen社）、50 mLのウシ胎児血清（Moregate Biotech社）、および0.5 mLの10 mg/mLゲンタマイシン溶液（ナカライテスク社）を添加したもの]で懸濁し、96ウェルプレートに播種し、培養した。

40

【0292】

（3）ハイブリドーマスクリーニング

（2）で播種されたハイブリドーマを7日間培養した後、各ウェルの培養上清を採取し、ヒトCRTH2に対する反応性を解析した。陽性対照細胞及び陰性対照細胞は、それぞれヒトCRTH2発現CHO/DG44細胞及びCHO/DG44細胞とした。まず、陽性対照細胞及び陰性対照細胞を0.02% EDTA溶液（ナカライテスク社製）で剥離し

50

、1ウェルあたりそれぞれ 1×10^5 cells / 50 μ L となるように96ウェルプレートに播種し、50 μ Lの培養上清を添加し、4 で30分間の反応を行った。

【0293】

細胞を洗浄した後、SMで300倍に希釈したAnti-rat IgG (Fc) - DyLight 488 (abcam社) 100 μ Lで懸濁し、4 で30分間の反応を行った。再び細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー (BD バイオサイエンス社、FACS Canto II) で解析した。

【0294】

ヒトCRTH2発現CHO/DG44細胞に特異的な反応が見られたウェルのハイブリドーマについて、クローニング培地 [エス・クロン クローニングメデュームCM-B (エーディア社) に、0.5 mLの10 mg/mL ゲンタマイシン溶液 (ナカライテスク社)、5 mLのHT supplement (Gibco社) を添加したもの] を用いて限界希釈法によるシングルセルクローニングを2回行った。最終的に、ヒトCRTH2発現CHO/DG44細胞に最も強いフローサイトメトリー反応性を示すハイブリドーマLym2クローン (以下、ハイブリドーマLym2と記す) を樹立した。

【0295】

(4) ハイブリドーマLym2の培養上清に含まれる抗体のサブクラスの同定

ハイブリドーマLym2を3日間培養した培養上清をPBS (ナカライテスク社製) で10倍に希釈し、その希釈液を150 μ L用いてRat Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit (AbD Serotec社) で添付の説明書に従いサブクラスの解析を行った。

【0296】

その結果、ハイブリドーマLym2の培養上清中に含まれるラット抗ヒトCRTH2モノクローナル抗体 (以下、単にLym2抗体と略記する場合もある) はラットIgG2b抗体であることが明らかになった。

【0297】

(5) Lym2抗体の精製

Hybridoma-SFM (invitrogen社) に5%のFetal Bovine Serum Ultra Low IgG (invitrogen社) を加えた培地で、ハイブリドーマLym2を1週間培養した。培養上清を回収し精製に供した。

【0298】

培養上清から、Prosep-G (GEヘルスケア社) を用いて、Lym2抗体を精製した。まず、培養上清をカラムにロードし、PBSでカラムを洗浄した後、pH 5.0、3.5および3.0の溶出バッファー (0.1 Mクエン酸一水和物 - NaOH / pH 5.0、3.5および3.0) で順に溶出した。溶出したフラクションは速やかに中和バッファー (2 M Tris - HCl / pH 8.5) で中和した。

【0299】

それぞれのフラクションの吸光度 (280 nm) を測定し、測定値の高い連続フラクションを抗体画分として回収した。PBSで透析を行い、0.22 μ mのフィルターを通したものを精製タンパク質とした。280 nmの吸光係数を1.4として、濃度を算出した。

【0300】

[実施例3]

Lym2抗体のフローサイトメトリーによる抗原結合性評価

FLAG融合ヒトCRTH2発現3Y1-B細胞を0.05%トリプシン溶液 (invitrogen社) で剥離し、PBSで洗浄した後、SMで懸濁した。次に、1ウェルあたり 2×10^5 cells となるように96ウェルプレートに播種し、1700 rpmで2分間の遠心分離を行った。上清を除いた後、SMで10 μ g/mLになるように調製したLym2抗体を100 μ L添加し、4 で1時間の反応を行った。

【0301】

10

20

30

40

50

細胞を洗浄した後、SMで100倍に希釈したAnti-rat IgG-FITC（ベックマンコールター社）を添加し、4℃で1時間の反応を行った。再び細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー（BDバイオサイエンス社製、FACS Cantor II）で解析した。その結果、Lym2抗体のFLAG融合ヒトCRTH2発現3Y1-B細胞への結合が認められた。

【0302】

[実施例4]

Lym2抗体重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子のクローニング

RNAiso plus（タカラバイオ社）を用いて、添付の説明書に従い、PBSで洗浄したハイブリドーマLym2を溶解し、total RNAを調製した。得られたtotal RNAは、DEPC treated water（invitrogen社）に溶解した。次に、Oligotex-dT30<Super>mRNA Purification Kit（From Total RNA）（タカラバイオ社）を用いて、添付の説明書に従い、得られたtotal RNAからmRNAを精製した。さらに、SMART RACE cDNA Amplification Kit（Clontech社）を用いて、添付の説明書に従い、精製したmRNAからcDNAを調製した。

【0303】

得られたcDNAを鋳型に、プライマーRat IgG2bH-A（配列番号8）及びRat IgG2bH-B（配列番号9）を用いて、ラットIgG2b重鎖遺伝子を、プライマーRat k-A（配列番号10）及びRat k-B（配列番号11）を用いて、ラット軽鎖（κ鎖）遺伝子を、それぞれPCRにより増幅した。増幅した遺伝子をサブクローニングし、塩基配列を解析した。

【0304】

その結果、シグナル配列を含むLym2抗体のVHおよびVLの塩基配列およびアミノ酸配列を同定した。VH、VLそれぞれの塩基配列を配列番号12、14、アミノ酸配列を配列番号13、15に示した。また、Kabataら[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]の報告から、シグナル配列を含まないLym2抗体のVHおよびVLの配列を同定した。

【0305】

シグナル配列を除いたVH、VLそれぞれの塩基配列を配列番号16、18に、アミノ酸配列を配列番号17、19に示した。また、Lym2抗体のVHのCDR1、CDR2、及びCDR3のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号20、21、及び22に、Lym2抗体のVLのCDR1、CDR2、及びCDR3のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号23、24、及び25に示した。

【0306】

[実施例5]

ラット/ヒトキメラ型Lym2抗体の作製

(1) ラット/ヒトキメラ型Lym2抗体発現ベクターの構築

ラット/ヒトキメラ型Lym2抗体発現ベクターは、以下の方法で、Lym2抗体重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子を、それぞれヒトIgG1重鎖及びκ鎖定常領域遺伝子に連結することにより作製した。

【0307】

まずVHとして、配列番号26の配列を、VLとして、配列番号27の配列を全合成した。合成された配列から、プライマーchLym2VH-A（配列番号28）およびプライマーchLym2VH-B（配列番号29）を用いてVHを、プライマーchLym2VL-A（配列番号30）およびプライマーchLym2VL-B（配列番号31）を用いてVLをPCRにより増幅した。

【0308】

遺伝子断片はアガロースゲル電気泳動を行い、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社）によって精製した。この断片と、ヒトκ鎖定常領

10

20

30

40

50

域発現ベクター (BglII / BsiWI 処理) およびヒト重鎖 (IgG1) 定常領域発現ベクター (SalI / NheI 処理) を用いて、In-Fusion HD Cloning Kit (クロンテック社) によるベクターへのサブクローニングを添付の説明書に従い行った。

【0309】

大腸菌 DH5 α コンピテントセル (タカラバイオ社) に形質転換して、プラスミド抽出、シーケンス確認を実施することで、ラット/ヒトキメラ型 Lym2 抗体 (以下、chLym2 と記す) 発現ベクターを作製した。

【0310】

(2) chLym2 一過性発現細胞株の調製

chLym2 の一過性発現株を作製するため、FreeStyle (商標) MAX CHO Expression System (Life Technologies 社) を、添付の説明書に従って使用し、以下の方法で、宿主細胞に (1) で作製された発現ベクターを導入した。宿主細胞には、FUT8 ノックアウト CHO 細胞 (国際公開第 2005/035586 号、国際公開第 02/31140 号) を FreeStyle (商標) CHO Expression Medium (Life Technologies 社) に馴化した株を使用した。

【0311】

(1) で作製した 312.5 μ g の chLym2 抗体発現ベクター (軽鎖発現ベクターと重鎖発現ベクターを 1:2 で混合したもの) を 20 mL の Opti-Pro SFM (Invitrogen 社) に、また、312.5 μ L の FreeStyle MAX Reagent (Invitrogen 社) を 20 mL の Opti-Pro SFM にそれぞれ溶解し、室温で 5 分間放置した。上記二液を混合し、室温で 15 分間放置した。該混合溶液を 250 mL の宿主細胞培養液 (1×10^6 cells/mL) に全量添加し chLym2 一過性発現細胞株を得た。

【0312】

(3) chLym2 の精製

(2) で得られた chLym2 一過性発現細胞株を、8 mM の L-glutamine (Invitrogen 社) を添加した FreeStyle CHO expression medium (Invitrogen 社) に懸濁し、三角フラスコで 5 日間培養した後、培養上清を回収した。回収した培養上清を遠心分離し、0.22 μ m フィルターを用いてろ過することで chLym2 を含む培養上清を調製した。

【0313】

調製した培養上清から MabSelect Sure (GEヘルスケア社) を用いて、chLym2 を精製した。まず、培養上清をカラムにロードし、PBS でカラムを洗浄した後、pH 5.0、3.5、3.0 の溶出バッファー (0.1 M クエン酸一水和物 - NaOH / pH 5.0、3.5、3.0) で順に溶出した。溶出したフラクションは速やかに中和バッファー (2 M Tris - HCl / pH 8.5) で中和した。

【0314】

それぞれのフラクションの 280 nm の吸光度 (A_{280}) を測定し、測定値の高い連続フラクションを抗体画分として回収した。抗体画分を PBS で透析し、0.22 μ m のフィルターを通したものを精製タンパク質とした。280 nm の吸光係数を 1.37 とし、濃度を算出した。

【0315】

[実施例 6]

ヒト化抗体の作製

(1) ヒト化 Lym2 抗体重鎖及び軽鎖可変領域の設計

(i) ヒト化 Lym2 抗体の VL および VH のアミノ酸配列の設計

ヒト化 Lym2 抗体の VL のアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

まず Lym2 抗体の VL の CDR 1 ~ 3 のアミノ酸配列 (配列番号 23、24、25)

10

20

30

40

50

の移植に適したヒト抗体のV LのF Rのアミノ酸配列を、以下のようにして選択した。

【0316】

既知のヒト抗体重鎖可変領域配列はThe National Center for Biotechnology Informationが提供するBLASTPデータベースにより、L y m 2 抗体のV LのF R配列と相同性の高いヒト抗体配列を検索した。その結果、GeneBank ID: ABA71374.1が最も相同性の高いヒト抗体配列であったため、この抗体のF Rを選択した。以上のようにして決定したヒト抗体F R配列の適切な位置に配列番号23、24、25で表されるL y m 2 抗体のV LのC D R 1 ~ 3のアミノ酸配列を移植することで、L V 0 (配列番号33)を設計した。

【0317】

次に、ヒト化L y m 2 抗体のV Hのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。L y m 2 抗体のV HのC D R 1 ~ 3のアミノ酸配列(配列番号20、21、22)の移植に適したヒト抗体V HのF Rのアミノ酸配列を以下のようにして選択した。V L同様にBLASTPデータベースにより、L y m 2 のV HのF R配列と相同性の高いヒト抗体配列を検索した。

【0318】

その結果、GeneBank ID: AAY33331.1が最も相同性の高いヒト抗体配列であったため、この抗体のF Rを選択した。以上のようにして決定したヒト抗体F R配列の適切な位置に配列番号20、21、22で表されるL y m 2 抗体のV HのC D R 1 ~ 3のアミノ酸配列を移植することで、H V 0 (配列番号49)を設計した。

【0319】

上記で設計したヒト化L y m 2 抗体のV Lのアミノ酸配列L V 0、およびV Hのアミノ酸配列H V 0は、選択したヒト抗体のF Rのアミノ酸配列に、ラットモノクローナル抗体であるL y m 2 由来のC D Rのアミノ酸配列のみを移植した配列である。しかし、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単にげっ歯類由来抗体のC D Rのアミノ酸配列をヒト抗体のF Rへ移植するのみでは、結合活性が低下してしまうことが多い。

【0320】

このような結合活性の低下を回避するため、C D Rのアミノ酸配列の移植とともに、ヒト抗体とげっ歯類抗体で異なっているF Rのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を置換することが行われている。そこで、本実施例においても、結合活性に影響を与えると考えられるF Rのアミノ酸残基を以下のようにして同定し、置換した。

【0321】

まず、上記で設計したヒト化L y m 2 抗体のV Lのアミノ酸配列L V 0、およびV Hのアミノ酸配列H V 0より構成される抗体可変領域(以下、L V 0 H V 0と表記する)の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。

【0322】

三次元構造座標作製および三次元構造の表示には、Discovery Studio (アクセルリス社)を用いた。また、L y m 2 抗体の可変領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、L V 0 H V 0のV LおよびV HのF Rのアミノ酸配列の中で、L y m 2 抗体と異なっているアミノ酸残基を選択し、L y m 2 抗体のアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列を作製し、同様に三次元構造モデルを構築した。これら作製したL y m 2 抗体、L V 0 H V 0および改変体の各可変領域の三次元構造を比較し、抗体の結合活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基を同定した。

【0323】

その結果、L V 0 H V 0のF Rのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、L V 0では、配列番号33のアミノ酸配列の2番目のI l e、4番目のM e t、15番目のP r o、および85番目のA l aを、H V 0では、配列番号49のアミノ酸配列の18番目のL e u、77番目のA s n、93番目のV a l、および117番目のT h rを、それぞれ選択した

10

20

30

40

50

。

【0324】

これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸配列をL y m 2 抗体の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ置換するアミノ酸改変をし、様々な改変を有するヒト化抗体のV L およびV H を設計した。具体的には、V L については、配列番号33のアミノ酸配列の2番目のI l e をV a l に、4番目のM e t をL e u に、15番目のP r o をL e u に、または85番目のA l a をP r o に置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。V H については、配列番号49のアミノ酸配列の18番目のL e u をM e t に、77番目のA s n をS e r に、93番目のV a l をT h r に、または117番目のT h r をV a l に置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を

10

【0325】

L V 0 H V 0、またはL V 0 H V 0のF Rに存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を改変したヒト化L y m 2 抗体の抗体可変領域として、L V 0 H V 0、L V 1 H V 0、L V 2 a H V 0、L V 2 b H V 0、L V 2 c H V 0、L V 3 a H V 0、L V 3 b H V 0、L V 4 H V 0、L V 0 H V 4、L V 1 H V 4、L V 2 a H V 4、L V 2 b H V 4、L V 2 c H V 4、L V 3 a H V 4、L V 3 b H V 4、L V 4 H V 4、L V 0 H V 1、L V 0 H V 2 a、L V 0 H V 2 b、および、L V 0 H V 3 をそれぞれ設計した。

【0326】

以降の記述においては、上述の可変領域を含むヒト化L y m 2 抗体をそれぞれL V 0 H V 0、L V 1 H V 0、L V 2 a H V 0、L V 2 b H V 0、L V 2 c H V 0、L V 3 a H V 0、L V 3 b H V 0、L V 4 H V 0、L V 0 H V 4、L V 1 H V 4、L V 2 a H V 4、L V 2 b H V 4、L V 2 c H V 4、L V 3 a H V 4、L V 3 b H V 4、L V 4 H V 4、L V 0 H V 1、L V 0 H V 2 a、L V 0 H V 2 b、および、L V 0 H V 3 と略記する。

20

【0327】

軽鎖可変領域L V 0 (配列番号33)、L V 1 (配列番号35)、L V 2 a (配列番号37)、L V 2 b (配列番号39)、L V 2 c (配列番号41)、L V 3 a (配列番号43)、L V 3 b (配列番号45)、L V 4 (配列番号47)、および重鎖可変領域H V 0 (配列番号49)、H V 1 (配列番号51)、H V 2 a (配列番号53)、H V 2 b (配列番号55)、H V 3 (配列番号57)、H V 4 (配列番号59)のアミノ酸配列をそれぞれ図1および図2に示す。

30

【0328】

(i i) ヒト化L y m 2 抗体の可変領域遺伝子の設計

ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、動物細胞で高頻度で利用されるコドンを用いて設計した。これら塩基配列を用いて、以下に示すヒト化L y m 2 抗体発現ベクターの構築および対応する抗体の発現を行った。

【0329】

(2) ヒト化L y m 2 抗体発現ベクターの構築

実施例5 - (1)に記載の方法に準じて、ヒト化L y m 2 抗体発現ベクターを構築した。すなわち、配列番号33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57および59で示されるアミノ酸配列をそれぞれコードする、配列番号32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56および58で示される塩基配列のDNAを全合成し、配列番号28 - 31で示すプライマーにより、対応するV L、V H 遺伝子断片をP C Rによって増幅した。遺伝子断片はアガロースゲル電気泳動を行い、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (Q I A G E N社)によって精製した。

40

【0330】

このV L またはV H 断片を、I n - F u i s i o n H D C l o n i n g K i t (クローンテック社)を用いて添付の説明書に従い、それぞれヒトκ鎖定常領域発現ベクター(B g l I I / B s i W I 処理)およびヒト重鎖(I g G 1)定常領域発現ベクター(S

50

a l 1 / N h e 1 処理)へサブクロニングした。作製したベクターを用いて大腸菌 D H 5 α コンピテントセル(タカラバイオ社)を形質転換して、プラスミド抽出、シーケンス確認を実施し、正しい配列が挿入されたコロニーを選抜し、一過性発現のためにプラスミド大量調製を行った。

【0331】

(3) ヒト化 L y m 2 抗体の一過性発現

作製したヒト化 L y m 2 抗体の一過性発現は、実施例 5 - (2)に記載の F r e e S t y l e (商標) C H O E x p r e s s i o n M e d i u m (L i f e t e c h n o l o g i e s 社)に馴化した C H O 細胞を宿主とし、F r e e S t y l e (商標) M A X C H O E x p r e s s i o n S y s t e m (L i f e t e c h n o l o g i e s 社)を使用して行った。プラスミド導入の方法は添付の説明書に従った。軽鎖発現ベクターと重鎖発現ベクターは、1 : 2 の比率で混合して使用した。

10

【0332】

培養液量は 2 0 0 m L で行い、3 7 $^{\circ}$ C、8 % C O ₂、1 2 5 r p m の設定条件下で、5 日間培養した。培養後、細胞懸濁液の遠心分離を行い、0 . 2 μ m フィルター (T h e r m o S c i e n t i f i c 社)を通してヒト化 L y m 2 抗体を含む培養上清を回収した。

【0333】

(4) ヒト化 L y m 2 抗体の精製

以下に示す、M a b S e l e c t S u R e (G E H e a l t h c a r e 社)を用いたアフィニティー精製により、ヒト化 L y m 2 抗体を精製した。レジンに P B S で平衡化した後、(3)で取得された培養上清をロードし、P B S で 2 回洗浄した。

20

【0334】

洗浄後、溶出バッファー (2 0 m M クエン酸、5 0 m M N a C l、p H 3 . 4)を用いて抗体を溶出し、中和バッファー (1 M リン酸 - N a O H、p H 7 . 0)を 1 / 1 0 量加えて中和した。続いて N A P 2 5 (G E H e a l t h c a r e 社)を用いて P B S にバッファー置換を行った。A m i c o n U l t r a - 4 C e n t r i f u g a l F i l t e r U n i t s (ミリポア社)を用いて限外濾過による濃縮を行い、N a n o d r o p 8 0 0 0 (T h e r m o S c i e n t i f i c 社)を使用して 2 8 0 n m における吸光度 (A ₂₈₀)を測定し、抗体溶液の濃度測定および調製を行った。

【0335】

30

[実施例 7]

c h L y m 2 およびヒト化 L y m 2 抗体の抗原結合活性

F L A G 融合ヒト C R T H 2 発現 3 Y 1 - B 細胞を 0 . 2 5 % T r y p s i n - E D T A (ナカライテスク社)で剥離し、P B S で洗浄した後、S M で懸濁した。次に、細胞数を 1 ウェルあたり 1 $\times$ 1 0 ⁵ 個となるように 9 6 ウェルプレートに播種し、5 0 0 0 0、1 2 5 0 0、3 1 2 5、7 8 1、1 9 5、4 9、1 2 および 3 n g / m L 各最終濃度の c h L y m 2 またはヒト化 L y m 2 抗体を添加し、4 $^{\circ}$ C で 6 0 分間の反応を行った。

【0336】

細胞を S M で洗浄した後、S M で 5 0 0 倍に希釈した G o a t F (a b ') ₂ A n t i - H u m a n I g G P E (y c h a i n s p e c i f i c) (S o u t h e r n B i o t e c h 社)を添加し、4 $^{\circ}$ C で 6 0 分間の反応を行った。S M で細胞を洗浄した後、細胞を 5 0 μ L の S M で再懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー (B D バイオサイエンス社、F A C S C a n t o I I)で測定した。

40

【0337】

データは F l o w J o 7 . 6 5 (トミーデジタルバイオロジー社)によって解析し、各濃度における G e o m e a n 値から L o g i s t i c 曲線によるカーブフィッティングを行い、統計解析言語 R (V e r . 3 . 0 2)を用いて c h L y m 2 および各ヒト化 L y m 2 抗体の結合の 5 0 % e f f e c t i v e c o n c e n t r a t i o n (E C ₅₀)値およびその s t a n d a r d e r r o r (S E)値を算出した。結果を表 1 に示す。

【0338】

50

【表 1】

No.	mAb	EC ₅₀ value (μg/mL)
1	chLym2	0.54 ± 0.072
2	LV0HV0	0.87 ± 0.052
3	LV1HV0	0.69 ± 0.057
4	LV2aHV0	0.66 ± 0.053
5	LV2bHV0	0.67 ± 0.061
6	LV2cHV0	0.68 ± 0.071
7	LV3aHV0	0.70 ± 0.078
8	LV3bHV0	0.81 ± 0.050
9	LV4HV0	0.74 ± 0.076
10	LV0HV4	0.58 ± 0.052
11	LV1HV4	0.58 ± 0.045
12	LV2aHV4	0.51 ± 0.068

No.	mAb	EC ₅₀ value (μg/mL)
13	chLym2	0.50 ± 0.077
14	LV2bHV4	0.59 ± 0.038
15	LV2cHV4	0.54 ± 0.070
16	LV3aHV4	0.76 ± 0.135
17	LV3bHV4	0.53 ± 0.095
18	LV4HV4	0.68 ± 0.116
19	LV0HV0	0.55 ± 0.052
20	LV0HV1	0.78 ± 0.088
21	LV0HV2a	0.65 ± 0.077
22	LV0HV2b	0.72 ± 0.064
23	LV0HV3	0.69 ± 0.032
24	LV0HV4	0.67 ± 0.023

【 0 3 3 9 】

その結果、表 1 に示すように、各種ヒト化抗体がキメラ抗体と同等のヒト C R T H 2 反応性を有することが示唆された。

【 0 3 4 0 】

[実施例 8]

chLym2 およびヒト化 L y m 2 抗体の好酸球、好塩基球に対する除去 (d e p l e t i o n) 活性

ヘパリンナトリウム注射液を加えて採取したヒト末梢血を 4 、 1 5 0 0 r p m 、 3 0 分間遠心分離し、血漿を回収した。

【 0 3 4 1 】

血漿を回収した後の赤血球を含むペレットに、P B S (ナカライテスク社) を加えて元の血液容量に戻し、懸濁したもの 1 m L に対して、溶血用溶液 [1 0 × R B C L y s i s b u f f e r (e - b i o s c i e n c e 社) を滅菌水で 1 0 倍に希釈したもの] を 1 0 m L 添加して転倒混和した。室温で 1 0 分間放置した後、常温、1 5 0 0 r p m 、 5 分間の遠心分離を行い、上清を除き、P B S で 2 回洗浄した。

【 0 3 4 2 】

その後、細胞ペレットを、回収していた血漿で懸濁し、3 0 0 μ L / w e l l で 4 8 w e l l プレートに播種し、1 0 0 0 、 1 0 0 、 3 3 、 1 1 、 3 . 7 、 1 . 2 、 0 . 4 および 0 . 0 1 n g / m L 各最終濃度の c h L y m 2 、各ヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 0 、 L V 0 H V 1 、 L V 0 H V 2 a 、またはアイソタイプコントロール抗体 [C l i n C a n c e r R e s 2005, 11(8), 3126-3135 記載の抗 2 , 4 - d i n i t r o p h e n o l (D N P) I g G 1 抗体をコードするベクターを用い、実施例 5 に記載の方法に準じて作製した I g G 1 抗体 (以下、抗 D N P I g G 1 抗体と記す)] を添加し、3 7 、 5 % C O ₂ インキュベーター内で、2 0 時間反応させた。

【 0 3 4 3 】

反応後、各 w e l l の細胞液を回収し、S M を 1 0 m L 添加し、コントロールビーズとして Count Bright Absolute Counting Beads、for flow cytometry (Molecular Probes 社) を 2 0 0 μ L / サンプルで添加した後、4 、 2 0 0 0 r p m 、 1 0 分間の遠心分離を行い、上清を除いた。S M で 2 回洗浄し、S M で希釈した 1 0 0 0 0 μ g / m L I g G f r o m h u m a n s e r u m (シグマアルドリッチ社) を 3 0 0 μ L / サンプルで添加して、懸濁した後、4 、 3 0 分間反応させた。

【 0 3 4 4 】

10

20

30

40

50

その後、40 μ L / well で96ウェルプレートに播種し、好酸球の検出として、P E a n t i - h u m a n S i g l e c - 8 A n t i b o d y (B i o L e g e n d 社)、好塩基球の検出としてP E - C y 7 M o u s e A n t i - H u m a n C D 1 2 3 (B D バイオサイエンス社)およびA n t i - H u m a n F c ϵ p s i l o n R e c e p t o r I α (F c ϵ R 1) A P C (e B i o s c i e n c e 社)を、それぞれ5 μ L / well 添加し、4、40分間反応させた。

【0345】

S Mで2回洗浄後、7 - A A D S t a i n i n g S o l u t i o n (B D バイオサイエンス社)を1%含有したS Mで細胞を懸濁し、4、10分間放置した後、蛍光強度をフローサイトメトリー(B D バイオサイエンス社製、F A C S C a n t o I I)を用いて解析した。

10

【0346】

ヒト好酸球は、F S C - S S C 展開の顆粒球画分における7 - A A D 陰性 s i g l e c 8 - P E 陽性画分として検出した。ヒト好塩基球は、F S C - S S C 展開のリンパ球画分における7 - A A D 陰性、C D 1 2 3 - P C - C y 7 陽性、F c ϵ R I - A P C 陽性画分として検出した。細胞除去活性は、一定数のC o u n t B r i g h t の c o u n t 数当たりのそれぞれの細胞の c o u n t 数を解析することで評価した。

【0347】

その結果、図3(A)~図3(C)に示すように、評価したヒト化L y m 2 抗体L V 0 H V 0、L V 0 H V 1およびL V 0 H V 2 aはいずれも、キメラL y m 2 抗体c h L y m 2と同等の好酸球および好塩基球に対する細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。

20

【0348】

[実施例9]

比較対照用抗ヒトC R T H 2 抗体の作製

(1) 比較対照用抗ヒトC R T H 2 抗体発現ベクターの作製

国際公開第2014/144865号記載の抗ヒトC R T H 2 モノクローナル抗体h u 1 9 A 2 v 5 2、h u 8 B 1 v 1、m u 8 B 1、m u 3 C 1 2およびm u 3 1 A 5 のV HおよびV Lのアミノ酸配列(それぞれ、国際公開第2014/144865号中ではS E Q I D N O s : 5 7および4 0、6 4および5 2、6 2および5 0、6 3および5 1、並びに6 5および5 3で表される)をコードする塩基配列を、全合成した。

30

【0349】

実施例5-(1)に記載の方法に準じて、それぞれの抗体のV HおよびV Lの組み合わせとなるよう、上記塩基配列を抗体発現ベクターに組み込み、5種の比較対照用ヒト化またはキメラ抗ヒトC R T H 2 抗体(それぞれh u 1 9 A 2 v 5 2、h u 8 B 1 v 1、c h 8 B 1、c h 3 C 1 2およびc h 3 1 A 5)発現ベクターをそれぞれ作製した。

【0350】

(2) 比較対照用抗ヒトC R T H 2 抗体の一過性発現細胞の作製および抗体の精製

実施例5-(2)および(3)に記載の方法に準じて、h u 1 9 A 2 v 5 2、h u 8 B 1 v 1、c h 8 B 1、c h 3 C 1 2またはc h 3 1 A 5の抗体発現ベクターを宿主細胞に一過性発現させ、培養上清からそれぞれの抗体の精製を行った。

40

【0351】

[実施例10]

ヒトC R T H 2 アミノ酸置換体発現細胞を用いた、抗ヒトC R T H 2 モノクローナル抗体のエピトープ解析

(1) ヒトC R T H 2 アミノ酸置換体発現ベクターの作製

ヒトC R T H 2 のアミノ酸配列のうち、細胞外領域のアミノ酸残基を部分的に別のアミノ酸残基に置換したアミノ酸置換体の発現ベクターを作製した。具体的には、配列番号2で表されるアミノ酸配列にS 2 A ; N 4 A ; T 6 AおよびL 7 A ; K 8 A、P 9 AおよびL 1 0 A ; P 1 2 A、L 1 4 AおよびE 1 5 A ; Q 1 6 E、R 1 9 HおよびQ 2 1 R ; H 2 3 A、S 2 4 AおよびN 2 5 A ; T 2 6 A、S 2 7 AおよびI 2 8 A ; D 1 7 1 A、T

50

172AおよびI173A; S174A、R175AおよびL176A; D177A、G178AおよびR179A; I180AおよびM181A; Y183A、Y184AおよびN185A; L187A、L188AおよびL189A; N190A; P191A; G192A; P193A; D194A; R195A; D196AおよびT198A; N275A、G277AおよびL278A; P276A; P279AおよびL281A; P280A; またはV282A、R283AおよびR284Aの置換をしたアミノ酸置換体を発現するベクターをそれぞれ作製した。なお、前記アミノ酸置換の記号は[置換前のアミノ酸残基の1文字表記][N末端から数えた置換の位置][置換後のアミノ酸残基の1文字表記]を表す。

【0352】

10

発現ベクターとしては、p h m A G 1 - M N L i n k e r (M B L 社) を用い、B a m H I および H i n d I I I の制限酵素サイトに終始コドンに欠失させた各種アミノ酸置換体をコードする遺伝子を挿入することで、細胞内C末端領域にアザミグリーンのタグが付加されるようにした。

【0353】

上記のアミノ酸置換体を発現するベクターは、1)アミノ酸置換体をコードする遺伝子配列を全合成し、ベクターに挿入する方法または、2)配列番号1で示される野生型ヒトC R T H 2 アミノ酸配列をコードするDNAが挿入されたベクターから、部位特異的変異導入を行うことにより作製した。

【0354】

20

(2) ヒトC R T H 2 アミノ酸置換体一過性発現細胞の造成

ヒトC R T H 2 アミノ酸置換体の発現細胞株の調製には、C H O - S 細胞 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を用いた。細胞の継代には8mM L - G l u t a m i n e (i n v i t r o g e n 社) を含む F r e e s t y l e C H O e x p r e s s i o n m e d i u m (i n v i t r o g e n 社) を使用し、37℃、5%CO₂条件下で振とう培養した。

【0355】

(1)で作製された25μgのヒトC R T H 2 アミノ酸置換体発現ベクターを400μLのO p t i - P r o S F M (i n v i t r o g e n 社) に、また、25μLのF r e e s t y l e M A X R e a g e n t (i n v i t r o g e n 社) を400μLのO p t i - P r o S F M にそれぞれ溶解し、室温で5分間放置した。上記二液を混合し、室温で15分間放置した。該混合溶液を上記C H O - S 培養液に添加し、24時間培養することでヒトC R T H 2 アミノ酸置換体発現細胞株を得た。

30

【0356】

(3) ヒトC R T H 2 アミノ酸置換体発現細胞を用いた、取得抗体の反応性解析

(2)で樹立されたヒトC R T H 2 アミノ酸置換体発現C H O - S 細胞を、S M で洗浄した後、1ウェルあたり 2×10^5 cellsとなるように96ウェルプレートに播種し、1700rpmで2分間の遠心分離を行った。上清を除いた後、S M で10μg/mLになるように調製したc h L y m 2、L V 0 H V 1、実施例9で作製された抗ヒトC R T H 2 抗体h u 1 9 A 2 v 5 2、h u 8 B 1 v 1、c h 3 C 1 2 もしくはc h 3 1 A 5、または市販ラット抗ヒトC R T H 2 抗体B M 1 6 (s a n t a c r u z 社) を添加し、4℃で1時間の反応を行った。

40

【0357】

細胞を洗浄した後、c h L y m 2、L V 0 H V 1、h u 1 9 A 2 v 5 2、h u 8 B 1 v 1、c h 3 C 1 2 またはc h 3 1 A 5 が添加されたウェルにはS M で希釈したg o a t a n t i - H u m a n I g G a l e x a 6 4 7 (M o l e c u l a r P r o b e s 社) を、B M 1 6 が添加されたウェルにはS M で希釈したg o a t a n t i - R a t I g G a l e x a 6 4 7 (M o l e c u l a r P r o b e s 社) をそれぞれ最終濃度10μg/mLで添加し、4℃で1時間の反応を行った。

【0358】

50

反応後、細胞を洗浄し、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー（BD バイオサイエンス社、FACS Canto II）で解析した。解析に関しては、全細胞からアザミグリーンの陽性細胞をgatingし、その集団における各抗体の反応性を解析した。

【0359】

また、各変異体間での発現レベルを補正するため、各抗体の結合によるAlexa647の蛍光強度を、C末端領域に付加したアザミグリーンの蛍光強度で除して相対的蛍光強度を算出し、各抗体の反応性とした。そして、野生型ヒトCRTH2発現細胞に対する各抗体の蛍光強度を100%とした際の、ヒトCRTH2アミノ酸置換体発現細胞への相対的蛍光強度を、各抗体に関して解析した。

10

【0360】

その結果、図4～図7に示すように、ヒト化Lym2抗体LV0HV1は、P12A、L14AおよびE15A；D177A、G178AおよびR179A；I180AおよびM181A；Y183A、Y184AおよびN185A；L187A、L188AおよびL189A；G192A；D194A；R195A；またはD196AおよびT198AのヒトCRTH2アミノ酸置換体発現細胞への反応性が消失することが明らかになった。

【0361】

また、キメラLym2抗体chLym2は、加えて、D171A、T172AおよびI173AのヒトCRTH2アミノ酸置換体発現細胞への反応性が消失することが明らかになった。ヒト化Lym2抗体LV0HV1のD171A、T172AおよびI173Aを含むヒトCRTH2アミノ酸置換体発現細胞への反応性は、大幅に低下していることから、LV1HV0およびchLym2はいずれも同じエピトープに結合していることが示唆された。

20

【0362】

一方、今回比較した他の抗ヒトCRTH2抗体は、本発明の抗ヒトCRTH2抗体とは異なる部位のヒトCRTH2アミノ酸置換体発現細胞への反応性が顕著に低下していたことから、既存の他の抗ヒトCRTH2抗体は、本願発明の抗体とは異なるエピトープを認識していることが明らかになった。

【0363】

更に、各アミノ酸置換体発現細胞への反応性を詳細に確認した結果、既存の抗ヒトCRTH2抗体はいずれもG192AまたはD194Aを含むアミノ酸置換体発現細胞への反応性は低下せず、本願発明の抗体のみが、該細胞への反応性が低下したことから、本願発明の抗ヒトCRTH2抗体は、ヒトCRTH2のGly192およびAsp194の少なくとも1つアミノ酸残基を含むエピトープに結合することが明らかになった。

30

【0364】

[実施例11]

ヒト好酸球に対する反応性評価

ヘパリンナトリウム注射液を加えて採取したヒト末梢血に対し、等量の注射用生理食塩水を添加し、混和した。50mL容量の遠沈管にFicoll-Paque PREMIUM 1.084（GEヘルスケア社）を15mL添加し、生理食塩水で希釈した上記ヒト末梢血を30mL重層し、室温、1500rpmで30分間遠心分離を行った。

40

【0365】

遠心分離後、血漿層、単核球層およびFicoll層の半量をアスピレーターで除去し、並びに遠心間の壁面に付着している血小板を滅菌した綿棒を用いて除いた。その後、滅菌した氷冷水27mLを各チューブに分注し30秒間溶血させた。

【0366】

その後、氷冷した10×PIPES緩衝液[500mLの蒸留水に、32.15gの塩化ナトリウム（和光純薬社）、1.85gの塩化カリウム（ナカライテスク社）、38gのPIPES（piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid ナカライテスク社）、8.4gの水酸化ナトリウム（ナカライテスク社

50

を溶解させたもの]を3mL添加して等張に戻し、4、1200rpm、5分間遠心分離した。遠心分離終了後、上清を吸引し、2mLの1×P I P E S緩衝液[蒸留水を用いて10×P I P E S緩衝液を10倍に希釈した溶液]を加えて細胞ペレットをほぐした。

【0367】

再度上記溶血操作を繰り返し、得られた細胞ペレットを、a u t o M A C S R i n s i n g S o l u t i o n (ミルテニーバイオテク社)にM A C S B S A S t o c k S o l u t i o n (ミルテニーバイオテク社)を添加したもの(以下、M A C S バッファーと略記する)を用いて2回洗浄した。

【0368】

細胞数をカウントした後、C D 1 6 M i c r o B e a d s、h u m a n (ミルテニーバイオテク社)を用いて、添付の説明書に従い好酸球をネガティブセレクション法により単離した。

【0369】

単離された細胞をS Mで洗浄した後、1ウェルあたり 1×10^5 cellsとなるように96ウェルプレートに播種し、2000rpmで2分間の遠心分離を行った。上清を除いた後、S Mで希釈した、10、3.3、1.1、0.37、および0.12μg/mL各最終濃度のL y m 2抗体、市販C R T H 2抗体のB M 1 6 (s a n t a c r u z社)または301108(R & D社)を添加し、4で1時間の反応を行った。

【0370】

細胞を洗浄した後、L y m 2抗体またはB M 1 6が添加されたウェルには、S Mで希釈したC E L L L A B M o u s e A n t i - R a t K a p p a (k a p p a l i g h t c h a i n s p e c i f i c) F I T C (ベックマンコールター社)を、301108が添加されたウェルには、S Mで希釈したC E L L L A B G o a t A n t i - M o u s e I g G (γ c h a i n s p e c i f i c) F l u o r e s c e i n (F I T C) C o n j u g a t e (ベックマンコールター社)をそれぞれ最終濃度10μg/mLで添加し、4で1時間の反応を行った。再び細胞を洗浄した後、細胞をS Mで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー(B D バイオサイエンス社製、F A C S C a n t o I I)で解析した。

【0371】

その結果、ラット抗ヒトC R T H 2抗体L y m 2はヒト好酸球に対して、市販のラット抗ヒトC R T H 2抗体B M 1 6およびマウス抗ヒトC R T H 2抗体301108よりも強い反応性を示すことが明らかとなった(図8)。

【0372】

[実施例12]

ヒト好塩基球に対するc h L y m 2の反応性

ヘパリンナトリウム注射液を加えて採取したヒト末梢血に対し、等量の注射用生理食塩水を添加し、混和した。50mL容量の遠沈管にF i c o l l - P a q u e P R E M I U M 1.084(G Eヘルスケア社)を15mL添加し、生理食塩水で希釈したヒト末梢血を30mL重層し、室温、1500rpmで30分間遠心分離を行った。

【0373】

遠心分離後、単核球層をピペットで回収し、M A C S バッファーを用いて2回洗浄した。細胞数をカウントした後、B a s o p h i l I s o l a t i o n K i t I I, h u m a n (ミルテニーバイオテク社製)を用いて、添付の説明書に従い好塩基球をネガティブセレクション法により単離した。

【0374】

単離された細胞をS Mで洗浄した後、1ウェルあたり 5×10^4 cellsとなるように96ウェルプレートに播種し、2000rpmで2分間の遠心分離を行った。上清を除いた後、100μLのS Mで細胞を懸濁し、Z e n o n A l e x a F l u o r 6 4 7 H u m a n I g G L a b e l i n g K i t (M o l e c u l a r P r o b e

10

20

30

40

50

s社製)を用いて添付の説明書に従い標識を行った、chLym2または実施例8記載のアイソタイプコントロール抗体を、最終濃度10 μ g/mLになるように添加し、4で1時間の反応を行った。細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー(BDバイオサイエンス社、FACS Canto II)で解析した。

【0375】

その結果、ヒト好塩基球に対して、chLym2の反応性が確認された(図9)。従って、本願発明のキメラ抗ヒトCRTH2抗体cLym2は、好塩基球に結合することが明らかになった。

【0376】

[実施例13]

ヒトCD4陽性T細胞に対するヒト化Lym2抗体の反応性

実施例12に準じ、Ficoll-Paque PREMIUM 1.084の代わりにFicoll-Paque PREMIUM(GEヘルスケア社)を用いて調製した単核球層の細胞懸濁液を100 μ L/wellで96ウェルプレートに播種し、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh Format(PIERCE社)を用いて添付の説明書に従いビオチン標識したヒト化Lym2抗体LV0HV1を最終濃度10 μ g/mLになるように添加し、4で1時間の反応を行った。

【0377】

細胞を洗浄した後、SMで希釈した最終濃度10 μ g/mL streptavidin、および添付の説明書に記載された量のAlexa Fluor 647 conjugate(Molecular Probes社)、FITC anti-human CD3 Antibody(バイオレジェンド社)およびCD4 Antibody、Clone SK3、PE-Conjugated(stem cell technology社)を添加し、4で1時間の反応を行った。

【0378】

再び細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー(BDバイオサイエンス社、FACS Canto II)で解析した。解析は、FSC-SSC展開によりリンパ球を分画し、さらにCD3陽性かつCD4陽性細胞で分画した細胞群に対して、ヒト化Lym2抗体LV0HV1による蛍光染色の蛍光強度を縦軸に、CD4抗体による蛍光染色の蛍光強度を横軸に示すことで、CD3陽性CD4陽性細胞におけるヒト化Lym2抗体LV0HV1の反応性画分の割合を算出した。その結果、CD3陽性CD4陽性のT細胞画分の約2~3%にヒト化Lym2抗体LV0HV1が反応した(図10)。

【0379】

[実施例14]

好酸球、好塩基球に対する細胞傷害活性

実施例8と同様にして調製した細胞懸濁液を、95 μ L/wellで96wellプレートに播種し、1000、10、3、1、0.3、0.1ng/mL各最終濃度の被験抗体を添加し、37、5%CO₂インキュベーター内で20時間反応させた。被験抗体としては、ヒト化Lym2抗体LV0HV1、実施例9で作製された抗ヒトCRTH2抗体hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch3C12およびch31A5を用いた。アイソタイプコントロール抗体としては抗DNP IgG1抗体を用いた。

【0380】

反応後の各wellにSMを100 μ L/wellで添加し、コントロールビーズとしてCountBright Absolute Counting Beads, for flow cytometry(Molecular Probes社)を20 μ L/wellで添加し、4、2000rpm、2分間の遠心分離を行い、上清を除いた。SMで2回洗浄し、SMで希釈した10000 μ g/mL IgG from human serum(シグマアルドリッチ社)を100 μ L/wellで添加して、4、30分間反応させた。以降は、実施例8と同様の方法で行った。

【0381】

その結果、ヒト化抗ヒトC R T H 2抗体L V 0 H V 1は、抗体濃度依存的に好酸球および好塩基球のいずれの細胞も除去した。既存の抗ヒトC R T H 2抗体c h 3 C 1 2は、ヒト化抗ヒトC R T H 2抗体L V 0 H V 1と比べて細胞を除去する活性が弱かった[図11(A)および図11(B)]。従って、本願発明の抗ヒトC R T H 2抗体は、C R T H 2が発現する好酸球または好塩基球を標的とした治療効果を発揮し得ることが示唆される。

【0382】

[実施例15]

T h 2細胞に対する細胞傷害活性

実施例13と同様にして調製した単核球層を、1/10 volume FBS (Gibco社)、200mM - L - Glutamine Stock Solution (ナカライテスク社)、10mM MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco社)、100mM Sodium Pyruvate (Gibco社)、1M HEPES Buffer Solution (Gibco社)および1/100 volume Penicillin - Streptomycin, Liquid (Gibco社)を添加したRPMI 1640 (和光純薬社)[以下、PBMC (peripheral blood mononuclear cell) 培養培地と記す]で2回洗浄し、 1×10^7 cells/mL細胞懸濁液を調製した。

【0383】

調製した細胞懸濁液を100 μ L/wellで96ウェルプレートに播種し、c h L y m 2抗体、ヒト化抗ヒトC R T H 2抗体L V 0 H V 1または実施例8記載のアイソタイプコントロール抗体を最終濃度10 μ g/mL添加し、37、5%CO₂インキュベーター内で20時間反応させた。

【0384】

反応後の細胞をPBMC培養培地で7回洗浄し、被験抗体を十分に除去した後、100 μ LのPBMC培養培地に懸濁し、抗CD3抗体O K T 3 (Abcam社)を1 μ g/mLの濃度で固相化したプレートに播種した。その後、2 μ g/mLに調製した抗CD28抗体(BDバイオサイエンス社)を100 μ L/wellで添加し、37、5%CO₂インキュベーター内で3日間反応させた。

【0385】

反応後の上清を回収し、Human IFN- γ Flex Set (BDバイオサイエンス社)、Human IL-5 Flex Set (BDバイオサイエンス社)、Human IL-13 Flex Set (BDバイオサイエンス社)を用いて、添付の説明書に従い上清中サイトカインの定量を行った。

【0386】

その結果、キメラ抗ヒトC R T H 2抗体c h L y m 2およびヒト化抗ヒトC R T H 2抗体L V 0 H V 1は、T h 2サイトカインであるIL-5およびIL-13の産生を減少させたが、その一方で、T h 1サイトカインであるIFN- γ の産生は変化させなかった。即ち、本発明の抗体はT h 2細胞を選択的に除去していることが示唆された[図12(A)および図12(B)]。従って、本発明の抗ヒトC R T H 2抗体は、T h 2細胞を標的とした治療効果を発揮できることが示唆された。

【0387】

[実施例16]

リガンド存在下における反応性評価(293EBNA)

実施例1-(1)-(ii)で作製したヒトC R T H 2遺伝子発現pAMohベクターを、Fugene6 (プロメガ社)を用いて293EBNA細胞(invitrogen社)に導入し、10%FBS、0.25mg/mL G418 (ナカライテスク社)、100 μ g/mL ペニシリン、100U/mL ストレプトマイシン(ナカライテスク社)および300 μ g/mL ハイグロマイシンB (和光純薬社)DMEMからなる培地で薬剤耐性細胞を選択し、ヒトC R T H 2発現293EBNA細胞を樹立した。

【0388】

ヒトC R T H 2 発現 2 9 3 E B N A 細胞を 0 . 0 2 % E D T A 溶液 (ナカライテスク社) で剥離し、P B S で洗浄した後、上記培地で懸濁した。次に、 1×10^5 cells / 90 μ L / well となるように 96 ウェルプレートに播種し、D K P G D 2 (C a y m a n c h e m i c a l 社) を最終濃度 10 μ M になるように添加した。

【0389】

37、5% C O₂ インキュベーター内で 15 分間放置した後、0.3、1 および 3 μ g / mL 各最終濃度のヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1、公知の抗ヒトC R T H 2 抗体 h u 1 9 A 2 v 5 2、h u 8 B 1 v 1、c h 3 C 1 2、c h 3 1 A 5、B M 1 6 (s a n t a c r u z 社) または 3 0 1 1 0 8 (R & D 社) を添加し、常温で 30 分間の反応を行なった。

10

【0390】

細胞を S M で 5 回洗浄した後、L V 0 H V 1、h u 1 9 A 2 v 5 2、h u 8 B 1 v 1、c h 3 C 1 2 または c h 3 1 A 5 が添加されたウェルには S M で希釈した 10 μ g / mL g o a t a n t i - H u m a n I g G A l e x a 6 4 7 (M o l e c u l a r P r o b e s 社) を、B M 1 6 が添加されたウェルには S M で希釈した 10 μ g / mL g o a t a n t i - R a t I g G A l e x a 6 4 7 (M o l e c u l a r P r o b e s 社) を、3 0 1 1 0 8 が添加されたウェルには、S M で希釈した 10 μ g / mL g o a t a n t i - M o u s e I g G A l e x a 6 4 7 (M o l e c u l a r P r o b e s 社) をそれぞれ最終濃度 10 μ g / mL で添加し、4、40 分間の反応を行なった。再び細胞を洗浄した後、細胞を S M で懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー (B D バイオサイエンス社、F A C S C a n t o I I) で解析した。

20

【0391】

その結果、図 13 (A) ~ (C) に示すように、既存の抗ヒトC R T H 2 抗体は、いずれもヒトC R T H 2 リガンドである D K P G D 2 存在下で、ヒトC R T H 2 発現細胞への結合が低下したのに対して、ヒト化 L y m 2 抗体 L V 0 H V 1 は、検討したいずれの抗体濃度においても、ヒトC R T H 2 発現細胞への結合は殆ど低下しなかった。

【0392】

即ち、本発明の抗体は、高濃度のリガンド存在下でも高い反応性を有することが明らかになった。従って、本発明の抗ヒトC R T H 2 抗体は、リガンド存在下でもヒトC R T H 2 発現細胞に対して、リガンド非存在下での反応性と同等に結合することができ、該ヒトC R T H 2 発現細胞に作用することができる有用な抗体であることが示唆された。

30

【0393】

[実施例 17]

分化誘導ヒトマスト細胞に対する反応性解析

Nature Protocols 2006, 1(4), 2178-2183 記載の方法に準じてマスト細胞を調製した。分化誘導開始から 11 週時点のマスト細胞を S M で洗浄し、1 ウェルあたり 5×10^4 cells となるように 96 ウェルプレートに播種し、P E a n t i - h u m a n C D 2 0 3 c (E - N P P 3) A n t i b o d y (B i o L e g e n d 社製)、B r i l l i a n t V i o l e t 4 2 1 (商標) a n t i - h u m a n C D 1 1 7 (c - k i t) A n t i b o d y (B i o L e g e n d 社製)、A n t i - H u m a n F c ϵ p s i l o n R e c e p t o r I α (F c ϵ R 1) P E (e B i o s c i e n c e 社製) を添加し、4 で 1 時間の反応を行なった。細胞を洗浄した後、S M で懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー (B D バイオサイエンス社製、F A C S C a n t o I I) で解析した。

40

【0394】

その結果、分化誘導を行なったマスト細胞は、マスト細胞表面マーカーである C D 2 0 3 c、C D 1 1 7、F c ϵ R I をいずれも発現していることが確認できた。

【0395】

分化誘導開始から 15 週間時点のマスト細胞培養液に、抗 D N P I g G 1 抗体の定常

50

領域をIgE型に組み換えたヒトIgEを最終濃度10 μ g/mLで添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で3日間反応させた。

【0396】

反応後のマスト細胞を最終濃度100 μ g/mL ペニシリン、100U/mL ストレプトマイシン（ナカライテスク社）および55 μ M β -ME（Gibco社）を添加したIMDM（Gibco社）（以下、basic culture mediumと略記する）で2回洗浄し、4mLのbasic culture mediumで懸濁し、最終濃度10 μ g/mL rabbit polyclonal anti human IgE antibody（Dako社）を添加し、MACS mix tube rotator（ミルテニーバイオテク社）を用いて回転させながら37 $^{\circ}$ C、5%CO₂イン

10

【0397】

反応後の細胞をSMで二回洗浄し、1ウェルあたり5 $\times$ 10⁴個となるように96ウェルプレートに播種し、2000rpmで2分間の遠心分離を行った。上清を除いた後、SMで希釈した10000 μ g/mL IgG from human serum（シグマアルドリッチ社）を100 μ L/wellで添加して、4 $^{\circ}$ C、30分間反応させ、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh Format（PIERCE社）を用いて添付の説明書に従い、それぞれビオチン標識したヒト化抗ヒトCRTH2抗体LV0HV1、抗ヒトCRTH2抗体hu19A2 v52、ch8B1、ch3C12もしくはch31A5、または未標識の市販の抗ヒトCRTH2抗体BM16（santa cruz社）もしくは301108（R&D社）を最終濃度10 μ g/mLで添加し、4 $^{\circ}$ Cで1時間の反応を行った。

20

【0398】

なお、アイソタイプコントロール抗体として、BM16に対してはPurified Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody（BioLegend社）を、301108に対してはNegative Control Mouse IgG2a（Dako社）を、それ以外の抗体に対しては抗DNP IgG1抗体を、それぞれ用いた。

【0399】

細胞を洗浄した後、ビオチン標識したLV0HV1、hu19A2 v52、ch8B1、ch3C12またはch31A5を添加したウェルにはSMで希釈したstreptavidin、Alexa Fluor 647 conjugate（Molecular Probes社）を、BM16を添加したウェルにはSMで希釈したgoat anti-Rat IgG Alexa647（Molecular Probes社）を、301108を添加したウェルにはSMで希釈したgoat anti-Mouse IgG Alexa647（Molecular Probes社）を最終濃度10 μ g/mLで添加し、4 $^{\circ}$ C、40分間の反応を行った。再び細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー（BDバイオサイエンス社、FACS Canto II）で解析した。

30

【0400】

その結果、図14に示すように、hu19A2 v52がマスト細胞に対して反応性を示す一方で、LV0HV1を含むhu19A2 v52以外の抗体は反応性を示さなかった。

40

【0401】

[実施例18]

分化誘導Th1に対する反応性解析

(1) PBMCからのナイーブT細胞の分離

健常人由来凍結PBMC（All cells社）を、DNase I recombinant、RNase-free（Roche Diagnostics社）を50 μ L含有した20mLのPBMC培養培地で1回洗浄し、再びDNase I recomb

50

inant、RNase-freeを50 μ L含有した20mLのPBMC培養培地に懸濁し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で2時間放置した。

【0402】

その後、実施例11に記載のMACS bufferで二回洗浄し、Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II human (ミルテニオバイオテク社)を用いて、添付の説明書に従いナイーブCD4陽性T細胞をネガティブセクション法により単離した。ナイーブCD4陽性T細胞の純度を高めるため、上記ネガティブセクションを2回実施した。

【0403】

(2) ナイーブCD4陽性T細胞からのTh1細胞の分化誘導

10

J Immunol, 2002. 169(5):p. 2498-2506記載の方法に準じて分離したナイーブCD4陽性T細胞を、10%FBS (Gibco社)および2mM グルタミン酸 (ナカライテスク社)を添加したRPMI 1640 (Gibco社) (以下、培養培地と略記する)で1 $\times$ 10⁶ cells/mLに懸濁し、刺激の工程として、抗CD3抗体OKT3 (Abcam社)を1 μ g/mLの濃度で固相化したプレートに播種し、最終濃度2 μ g/mL抗CD28抗体 (BDバイオサイエンス社)、100ng/mL recombinant human IL-12 (peprotech社)、10ng/mL recombinant human IL-2 (peprotech社)、および5 μ g/mL抗IL-4抗体 (BDバイオサイエンス社)を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で4日間反応させた。

20

【0404】

その後、細胞を回収し、遠心分離により上清を除去した後、培養培地で1 $\times$ 10⁶ cells/mLに懸濁し、増殖の工程として、最終濃度100ng/mL recombinant human IL-12 (peprotech社)、10ng/mL recombinant human IL-2 (peprotech社)および5 μ g/mL抗IL-4抗体 (BDバイオサイエンス社)を添加し37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で3日間反応させた。

【0405】

上記の刺激、増殖の工程を合計3回繰り返すことで、分化誘導Th1細胞を樹立した。

【0406】

30

(3) 分化誘導Th1細胞からのサイトカイン産生解析

(2)の分化誘導Th1細胞培養液に、最終濃度20ng/mLのPhorbol 12-myristate 13-acetate (シグマアルドリッチ社)、1 μ g/mLのIonomycin calcium salt from Streptomyces (シグマアルドリッチ社)および10 μ g/mLのBrefeldin A from Penicillium brefeldianum (シグマアルドリッチ社)を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で6時間反応させた。その後、2 $\times$ 10⁵ cells/wellで96ウェルプレートに播種し、PBS (ナカライテスク社)で洗浄した。

【0407】

40

その後、LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405nm excitation (Molecular Probes社)を用いて添付の説明書に従い死細胞を染色し、PBSで二回洗浄した後、上清を除き、Fixation Buffer (BDバイオサイエンス社)を用いて4、45分間反応させた。

【0408】

反応後、PBSで1回、1 $\times$ Perm/Wash Buffer (BDバイオサイエンス社)で2回洗浄した後、最終濃度2.5 μ LのPE anti-human IFN- γ Antibody (BioLegend社)、5 μ LのAPC anti-human IL-4 Antibody (BioLegend社)、10 μ Lのanti-IL-

50

5 antibodies APC (ミルテニーバイオテク社)および20 μ LのAPC anti-human IL-13 Antibody (BioLegend社)を添加し、4 で30分間反応させた。

【0409】

その後、1 $\times$ Perm/Wash Bufferで2回洗浄し、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー (BDバイオサイエンス社、FACS Canto II) で解析した。

【0410】

その結果、分化誘導Th1は、IL-4/5/13が陰性であり、90%がIFN γ 陽性のpopulationであることが確認され、Th1サイトカインを選択的に産生する細胞であることが確認できた。

10

【0411】

(4) 分化誘導Th1細胞に対する抗ヒトCRTH2抗体の反応性解析

(2)において樹立された分化誘導Th1細胞をSMで洗浄した後、1ウェルあたり5 $\times 10^4$ cellsとなるように96ウェルプレートに播種し、2000rpmで2分間の遠心分離を行った。上清を除いた後、SMで希釈した10 μ g/mLラット抗ヒトCRTH2抗体Lym2、公知の抗ヒトCRTH2抗体BM16 (santa cruz社)または301108 (R&D社)を添加し、4 で1時間の反応を行った。

【0412】

アイソタイプコントロール抗体として、Lym2に対してはRat IgG2b、kappa monoclonal [RTK4530] - BSA/Azide free (abcam社)を、BM16に対してはPurified Rat IgG2a、 κ Isotype Ctrl Antibody (BioLegend社)を、301108に対してはNegative Control Mouse IgG2a (Dako社)を、それぞれ用いた。

20

【0413】

細胞を洗浄した後、Lym2抗体またはBM16を添加したウェルにはSMで希釈した10 μ g/mL CELL LAB Mouse Anti-Rat Kappa (kappa light chain specific) FITC (ベックマンコールター社)を、301108を添加したウェルには、SMで希釈した10 μ g/mL CELL LAB Goat Anti-Mouse IgG (γ chain specific) Fluorescein (FITC) Conjugate (ベックマンコールター社)を最終濃度10 μ g/mLでそれぞれ添加し、4 で1時間の反応を行った。再び細胞を洗浄した後、細胞をSMで懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー (BDバイオサイエンス社、FACS Canto II) で解析した。

30

【0414】

その結果、図15に示すように、ラット抗ヒトCRTH2抗体Lym2および市販のラット抗ヒトCRTH2抗体BM16は分化誘導Th1には反応性を示さなかった。一方で、市販のマウス抗ヒトCRTH2抗体301108は分化誘導Th1に対して反応性を示した。

40

【0415】

したがって、本発明の抗ヒトCRTH2抗体は、好酸球、好塩基球およびTh2細胞には反応するものの、Th1細胞には反応しないことが明らかになった。また、301108は、CRTH2を発現する細胞以外にも非特異的に反応性を示すことが明らかになった。

【0416】

[実施例19]

ヒト好酸球の形態変化を指標にした、Lym2抗体のアンタゴニスト活性評価

実施例11と同様の方法により、ヒト末梢血から好酸球の分離を行った。単離されたヒト好酸球をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(以下、D-PBS(-))と記す)(ナカラ

50

イテスク社)で懸濁し、37℃、5%CO₂インキュベーター内で1時間30分反応させた。その後、10%FBS含有RPMI1640を用いて 2×10^5 cells/wellで96ウェルプレートに播種した。その後、最終濃度10μg/mLのアイソタイプコントロール抗体[CELL LAB Rat IgG2b Isotype Control (ベックマンコールター社)]、もしくはLym2抗体、またはポジティブコントロールとして最終濃度10μM CRTH2低分子拮抗薬OC000459 (Cayman chemical社)を添加し、37℃、5%CO₂インキュベーター内で30分間反応させた。

【0417】

次に、0.1、1、10、100および1000nM各最終濃度のDKPGD2 (Cayman chemical社)を添加し、さらに37℃、5%CO₂インキュベーター内で60分間反応させた。反応後、氷冷PBSで2回洗浄し、Fixation Buffer (BDバイオサイエンス社)を200μL/well添加し、よく懸濁した後、4℃で30分間放置した。その後、SMで2回洗浄し、フローサイトメトリー (BDバイオサイエンス社、FACS Canto II) で好酸球の形態変化を解析した。

10

【0418】

好酸球の形態変化は、フローサイトメーターによる解析において細胞の大きさ、細胞の表面積または細胞径の指標であるForward Scatter Light (FSC) プロットの増加を指標に解析を行い、DKPGD2未処理の好酸球のFSCを基準として、高FSCのgateに検出される好酸球の割合(%)を算出した。

20

【0419】

その結果、図16に示すように、ヒトCRTH2リガンドDKPGD2は、濃度依存的な好酸球の形態変化誘導をしたが、CRTH2低分子拮抗薬OC000459は、DKPGD2依存的な好酸球の形態変化を抑制した。これに対して、本発明の抗ヒトCRTH2抗体Lym2およびアイソタイプコントロール抗体は、いずれもDKPGD2依存的な好酸球の形態変化を抑制しなかった。即ち、本発明の抗ヒトCRTH2抗体はアンタゴニスト活性を有しないことが示唆された。

【0420】

[実施例20]

ヒト好酸球の形態変化を指標にした、Lym2抗体のアゴニスト活性評価

30

上述実施例19と同様の実験系において、0、0.01、0.1、1および10μg/mL各最終濃度のラット抗ヒトCRTH2抗体Lym2を加え、1時間反応させて、好酸球の形態変化を解析した。

【0421】

その結果、図17に示すように、Lym2抗体は抗体濃度0-10μg/mLの範囲で処理を行っても好酸球の形態変化を起こさないことが示された。即ち、本発明の抗ヒトCRTH2抗体はアゴニスト活性を有しないことが示唆された。

【0422】

[実施例21]

ヒト好酸球の形態変化を指標にした、抗ヒトCRTH2抗体のアゴニスト活性、アンタゴニスト活性、リガンドによるシグナルの増強活性の評価

40

実施例11と同様の方法により、ヒト末梢血から好酸球の分離を行った。但し、血液に等量の注射用生理食塩水を添加する操作は行わず、直接Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 (GEヘルスケア社)に重層した。単離されたヒト好酸球をDPBS(-) (ナカライテスク社)で懸濁し、5%CO₂インキュベーター内で37℃、1時間30分反応させた。

【0423】

その後、10%FBS含有RPMI1640を用いて 0.7×10^5 cells/wellで96ウェルプレートに播種した。その後、アイソタイプコントロール抗体、ヒト化Lym2抗体LV0HV1、実施例9で作成された抗ヒトCRTH2抗体hu19A2

50

v 5 2、c h 8 B 1、c h 3 C 1 2もしくはc h 3 1 A 5、または市販の抗ヒトC R T H 2抗体B M 1 6 (s a n t a c r u z 社)もしくは3 0 1 1 0 8 (R & D 社)を最終濃度1 0 μ g / m Lで添加し、3 7 °C、5 % C O₂ インキュベーター内で3 0 分間反応させた。

【 0 4 2 4 】

なお、アイソタイプコントロール抗体として、B M 1 6 に対してはP u r i f i e d R a t I g G 2 a、κ I s o t y p e C t r l A n t i b o d y (B i o L e g e n d 社)、3 0 1 1 0 8 に対してはN e g a t i v e C o n t r o l M o u s e I g G 2 a (D a k o 社)、その他の抗体に対しては抗D N P I g G 1 抗体を用いた。

【 0 4 2 5 】

次に、1 0 0 n M 最終濃度のD K P G D 2 (C a y m a n c h e m i c a l 社)または1 0 % F B S 含有R P M I 1 6 4 0 を添加し、さらに3 7 °C、5 % C O₂ インキュベーター内で6 0 分間反応させた。反応後、氷冷P B S で2 回洗浄し、F i x a t i o n B u f f e r (B D バイオサイエンス社)を1 0 0 μ L / w e l l 添加し、よく懸濁した後、4 °C で3 0 分間放置した。その後、S M で2 回洗浄し、実施例 1 9 と同様の方法で好酸球の形態変化を解析した。

【 0 4 2 6 】

その結果、図 1 8 (A) ~ (C) に示すように、リガンド非存在下における抗ヒトC R T H 2 抗体の処理による形態変化に関しては、h u 1 9 A 2 v 5 2 において若干の形態変化の傾向が認められるものの、強い形態変化を起こす抗体は存在せず、いずれの抗体もアゴニスト活性を有しないことが示唆された。

【 0 4 2 7 】

また、D K P G D 2 処理条件下における抗ヒトC R T H 2 抗体の処理による形態変化に関しては、c h 8 B 1、c h 3 C 1 2、c h 3 1 A 5 の処理により、D K P G D 2 により誘発される形態変化が抑制されたことから、これらの抗体はアンタゴニスト活性を有することが示唆された。本結果は、先行特許文献 (国際公開 2 0 1 4 / 1 4 4 8 6 5 号) における知見と一致する。

【 0 4 2 8 】

一方、h u 1 9 A 2 v 5 2 およびB M 1 6 は、D K P G D 2 により誘発される形態変化を増強した。特にh u 1 9 A 2 v 5 2 は、1 0 0 n M のD K P G D 2 により誘発される形態変化を約 2 倍まで増強することが明らかになった。

【 0 4 2 9 】

上述の通り、h u 1 9 A 2 v 5 2 およびB M 1 6 抗体はリガンド非存在下では形態変化を誘発しないことから、これらの抗体はC R T H 2 リガンドであるD K P G D 2 によるシグナルの増強活性を有することが示唆された。

【 0 4 3 0 】

一方L V 0 H V 1 および3 0 1 1 0 8 は、アイソタイプコントロール抗体と同様に、D K P G D 2 非存在下、存在下のいずれの条件下においても、形態変化に影響を示さなかったことから、D K P G D 2 によるシグナルの増強活性を有していないことが示唆された。

【 0 4 3 1 】

本発明の抗ヒトC R T H 2 抗体は、生理的シグナルを遮断または増強することがない点で好ましい。

【 0 4 3 2 】

[実施例 2 2]

C R T H 2 活性化状態の変遷に伴うコンフォメーション変化に対するC R T H 2 モノクローナル抗体の反応性評価

(1) ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 標識抗体の作製

P e r o x i d a s e L a b e l i n g K i t - N H₂ (D o j i n d o 社) を用いて、添付文書に従い、ヒト化L y m 2 抗体L V 0 H V 1 およびh u 1 9 A 2 v 5 2 にH R P を直接標識した後、D - P B S (-) (ナカライテスク社) で1 m g / m L に希釈

10

20

30

40

50

した。

【0433】

(2) ヒトC R T H 2 発現細胞の膜画分の調製

実施例1で樹立したヒトC R T H 2 発現C H O / D G 4 4 細胞を0.02% E D T A 溶液(ナカライテスク社)に剥離し、4℃に冷却したD - P B S (-)を用いて細胞を洗浄した。Minute Plasma Membrane Protein Isolation Kit (Invent Biotechnologies)を用いて、添付文書に従い膜画分を調製した。

【0434】

(3) ヒトC R T H 2 発現細胞の膜画分に対する抗ヒトC R T H 2 抗体の反応性の評価

50mM H E P E S (Gibco社)、5mM M g C l ₂ (ナカライテスク社)、100mM N a C l (ナカライテスク社)および1mM E D T A (Invitrogen社)を添加した50mM T r i s - H C l buffer pH7.4 (ナカライテスク社)(以下、E L I S A 反応液と記す)を、(2)にて調製した膜画分に加え、1mg/mLになるように調製し、プロテオセーブ1.5mLマイクロチューブ(住友ベークライト社)に、50μL/tubeで添加した。

【0435】

次に、500μM G T P γ S (Roche Diagnostics社)または500μM G D P (Sigma-Aldrich社)を添加したE L I S A 反応液を50μL/tubeで添加し、30℃にて、1時間インキュベートした。

【0436】

続いて、D - P B S (-)で10mg/mLに希釈したI g G from human serum (Sigma-Aldrich社)および30% w/v B S A - P B S fatty acid free (Wako社)をそれぞれ50μL/tubeで添加し、30℃で、30分間インキュベートした。

【0437】

次に、(1)で作製した、H R P 標識されたL V 0 H V 1またはh u 1 9 A 2 v 5 2をE L I S A 反応液により5μg/mLに希釈し、50μL/tubeで添加した後30℃で1時間インキュベートすることにより、膜画分に対する抗体反応を行った。16000gにて4℃で30分間遠心した後、上清を除去した。

【0438】

その後、もともとG T P γ Sを添加していたチューブには100μM G T P γ Sを添加したE L I S A 反応液、G D Pを添加していたチューブには100μM G D Pを添加したE L I S A 反応液をそれぞれ1mL/tubeで添加して、再度16000gにて4℃で30分間遠心した後、上清を除去した。同様の操作を4回繰り返した後、D - P B S (-)を100μL/tubeで添加し、膜画分を十分に懸濁した。

【0439】

懸濁液を96ウェルプレートに30μL/wellで添加し、1-Step Ultra TMB - E L I S A 試薬(Thermo scientific社)を100μL/wellで添加した。室温で10分間反応させた後、0.5mol/L 硫酸(Wako社)を100μL/wellで添加し、反応を停止させた。

【0440】

S P E C T R A max 340PCにより480nmにおける吸光度を測定し、得られた結果をGraphpad Prism(ver.6.05)を用いて解析した。また、Tukey's multiple comparisons testを適用し、有意差検定を併せて実施した。

【0441】

その結果、図19に示すようにG D P 処理時におけるh u 1 9 A 2 v 5 2の膜画分に対する反応性は、G T P γ S 処理時に比べて有意に低下した($p < 0.0001$)。一方、L V 0 H V 1の反応性は、G T P γ S またはG D P 処理時においても、変化しなかった

10

20

30

40

50

($p > 0.1$)。

【0442】

C R T H 2 は G P C R であり、G P C R は一般的に、活性化型コンフォメーションでは G T P が結合し、不活性化型コンフォメーションでは G D P が結合していることが知られている。上記結果の通り、本発明の抗ヒト C R T H 2 抗体は、G T P アナログの G T P γ S または G D P による処理の有無に関わらず C R T H 2 への反応性が変化しなかったことから、C R T H 2 の活性化に伴うコンフォメーション変化に影響されず、一定の反応性を示す可能性が示唆された。

【0443】

[実施例 23]

アザミグリーン融合ヒトおよびカニクイザル C R T H 2 発現 p h m A G 1 - M N L i n k e r ベクターの作製

(1) アザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 p h m A G 1 - M N L i n k e r ベクターの作製

実施例 1 の (1) - (i i) で作製されたヒト C R T H 2 遺伝子発現 p A M o h に対し、プライマー h u m a n C R T H 2 a z a m i - A (配列番号 60) 及び h u m a n C R T H 2 a z a m i - B (配列番号 61) を用いて目的断片を P C R で増幅し、制限酵素 B a m H I および H i n d I I I を用いて、ベクター p h m A G 1 - M N L i n k e r (M B L 社) と連結し、アザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 p h m A G 1 - M N L i n k e r ベクターを構築した。

【0444】

(2) アザミグリーン融合カニクイザル C R T H 2 発現 p h m A G 1 - M N L i n k e r ベクターの作製

全合成されたカニクイザル C R T H 2 の c D N A (c D N A 配列 : 配列番号 62 、アミノ酸配列 : 配列番号 63) を用い、実施例 1 の (1) - (i i) と同様の方法で構築したカニクイザル C R T H 2 発現 p M o h ベクターに対し、プライマー c y n o C R T H 2 a z a m i - A (配列番号 64) および c y n o C R T H 2 a z a m i - B (配列番号 65) を用い、(1) と同様にしてアザミグリーン融合カニクイザル C R T H 2 発現 p h m A G 1 - M N L i n k e r ベクターを構築した。

【0445】

[実施例 24]

アザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞およびカニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞の造成

実施例 23 で作製されたヒトおよびカニクイザル C R T H 2 遺伝子発現 p h m A G 1 - M N L i n k e r ベクターを制限酵素 B s a I 処理によって切断し、得られた直鎖状 D N A を精製し、滅菌水に溶解した。この D N A をエレクトロポレーション法により、C H O / D G 4 4 細胞に導入し、I M D M 培養培地に 3 日程度培養した。

【0446】

その後、0.5 mg / mL G 4 1 8 (ナカライテスク社) を加えた I M D M 選択培地で薬剤耐性細胞を選択した。選択した薬剤耐性細胞を、0.25 % T r y p s i n - E D T A (ナカライテスク社) で剥離し、P B S で洗浄した後、I M D M 選択培地で懸濁した。その後、C e l l S o r t e r S H 8 0 0 (S o n y 社) を用いて、ヒト C R T H 2 発現細胞およびカニクイザル C R T H 2 発現細胞で同程度のアザミグリーン蛍光強度を示す細胞集団をそれぞれゲートし、1 c e l l / w e l l でソーティングを行い、拡大培養し、アザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞およびカニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞をそれぞれ樹立した。

【0447】

アザミグリーン融合ヒト C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞およびカニクイザル C R T H 2 発現 C H O / D G 4 4 細胞について、上記と同様の方法で細胞調製を行い、フローサイトメトリー (B D バイオサイエンス社、F A C S C a n t o I I) を用いてアザミ

10

20

30

40

50

グリーンの発現確認を行った。その結果、図20に示すように、それぞれの細胞のアザミグリーンの発現が同等であることを確認した。

【0448】

[実施例25]

ヒトまたはカニクイザルC R T H 2に対するヒト化L y m 2抗体L V 0 H V 1の結合活性評価

実施例24で樹立されたアザミグリーン融合ヒトまたはカニクイザルC R T H 2発現C H O / D G 4 4細胞を、0.02% E D T A溶液(ナカライテスク社)で剥離し、P B Sで洗浄した後、S Mで懸濁した。次に、細胞数を1ウェルあたり 2×10^5 個となるように96ウェルプレートに播種し、30000、7500、1875、469、117、29、7および2 ng / mL各最終濃度のヒト化L y m 2抗体L V 0 H V 1または抗D N P I g G 1抗体を添加し、4で40分間の反応を行った。

10

【0449】

細胞をS Mで3回洗浄した後、S Mで10 μ g / mLの濃度に希釈したg o a t a n t i - H u m a n I g G a l e x a 6 4 7 (M o l e c u l a r P r o b e s 社)を1ウェルあたり100 μ L添加し、4で40分間の反応を行った。S Mで細胞を洗浄した後、細胞を100 μ LのS Mで再懸濁し、蛍光強度をフローサイトメトリー(B D バイオサイエンス社、F A C S C a n t o I I)で測定した。

【0450】

データはF l o w J o 7 . 6 5 (トミーデジタルバイオロジー社)によって解析した。その結果、図21に示す通り、L V 0 H V 1が、ヒトC R T H 2およびサルC R T H 2に対し、ほぼ同等の結合性を示すことが明らかとなった。

20

【産業上の利用可能性】

【0451】

本発明によりヒトC R T H 2の特徴的なエピトープを認識し、結合することで所望の活性を有する抗ヒトC R T H 2抗体、該抗体断片、該抗体のアミノ酸配列をコードするD N A、該D N Aを含むベクター、該抗体を生産するハイブリドーマおよび抗体生産細胞、該抗体の製造方法、該抗体または抗体断片を含む組成物、該抗体または抗体断片を用いるアレルギー性疾患、自己免疫疾患、好酸球増多や機能亢進を伴う疾患、T h 2細胞の増多や機能亢進を伴う疾患などの治療方法および診断方法、並びに該抗体または抗体断片を含む医薬および診断薬を提供することができる。

30

【配列表フリーテキスト】

【0452】

配列番号3：人工配列の記載：h u m a n C R T H 2 F L A G - Aの塩基配列

配列番号4：人工配列の記載：h u m a n C R T H 2 F L A G - Bの塩基配列

配列番号5：人工配列の記載：F L A G タグ付ヒトC R T H 2 c D N Aの塩基配列

配列番号6：人工配列の記載：h u m a n C R T H 2 F L A G - Cの塩基配列

配列番号7：人工配列の記載：h u m a n C R T H 2 F L A G - Dの塩基配列

配列番号8：人工配列の記載：R a t I g G 2 b H - Aの塩基配列

配列番号9：人工配列の記載：R a t I g G 2 b H - Bの塩基配列

40

配列番号10：人工配列の記載：R a t k - Aの塩基配列

配列番号11：人工配列の記載：R a t k - Bの塩基配列

配列番号20：人工配列の記載：L y m 2抗体 V H C D R 1のアミノ酸配列

配列番号21：人工配列の記載：L y m 2抗体 V H C D R 2のアミノ酸配列

配列番号22：人工配列の記載：L y m 2抗体 V H C D R 3のアミノ酸配列

配列番号23：人工配列の記載：L y m 2抗体 V L C D R 1のアミノ酸配列

配列番号24：人工配列の記載：L y m 2抗体 V L C D R 2のアミノ酸配列

配列番号25：人工配列の記載：L y m 2抗体 V L C D R 3のアミノ酸配列

配列番号26：人工配列の記載：c h L y m 2発現ベクター用V Hの合成D N A

配列番号27：人工配列の記載：c h L y m 2発現ベクター用V Lの合成D N A

50

配列番号 28 : 人工配列の記載 : c h L y m 2 V H - A の塩基配列	
配列番号 29 : 人工配列の記載 : c h L y m 2 V H - B の塩基配列	
配列番号 30 : 人工配列の記載 : c h L y m 2 V H - C の塩基配列	
配列番号 31 : 人工配列の記載 : c h L y m 2 V H - D の塩基配列	
配列番号 32 : 人工配列の記載 : L V 0 の塩基配列	
配列番号 33 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 34 : 人工配列の記載 : L V 1 の塩基配列	
配列番号 35 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 36 : 人工配列の記載 : L V 2 a の塩基配列	
配列番号 37 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	10
配列番号 38 : 人工配列の記載 : L V 2 b の塩基配列	
配列番号 39 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 40 : 人工配列の記載 : L V 2 c の塩基配列	
配列番号 41 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 42 : 人工配列の記載 : L V 3 a の塩基配列	
配列番号 43 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 44 : 人工配列の記載 : L V 3 b の塩基配列	
配列番号 45 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 46 : 人工配列の記載 : L V 4 の塩基配列	
配列番号 47 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	20
配列番号 48 : 人工配列の記載 : H V 0 の塩基配列	
配列番号 49 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 50 : 人工配列の記載 : H V 1 の塩基配列	
配列番号 51 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 52 : 人工配列の記載 : H V 2 a の塩基配列	
配列番号 53 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 54 : 人工配列の記載 : H V 2 b の塩基配列	
配列番号 55 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 56 : 人工配列の記載 : H V 3 の塩基配列	
配列番号 57 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	30
配列番号 58 : 人工配列の記載 : H V 4 の塩基配列	
配列番号 59 : 人工配列の記載 : 合成コンストラクトのアミノ酸配列	
配列番号 60 : 人工配列の記載 : h u m a n C R T H 2 a z a m i - A の塩基配列	
配列番号 61 : 人工配列の記載 : h u m a n C R T H 2 a z a m i - B の塩基配列	
配列番号 64 : 人工配列の記載 : c y n o C R T H 2 a z a m i - A の塩基配列	
配列番号 65 : 人工配列の記載 : c y n o C R T H 2 a z a m i - B の塩基配列	

【図 1】

12345678901234567890123	4567890123456789	012345678901234	5678901
Lym2 VL	DVLTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	GVSNRFS
LV0	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	
LV1	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	
LV2a	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	
LV2b	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	
LV2c	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	
LV3a	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	
LV3b	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	
LV4	DIWMTQTPLSLPVTLGESASIS	WYLQKFGSPQVLIY	

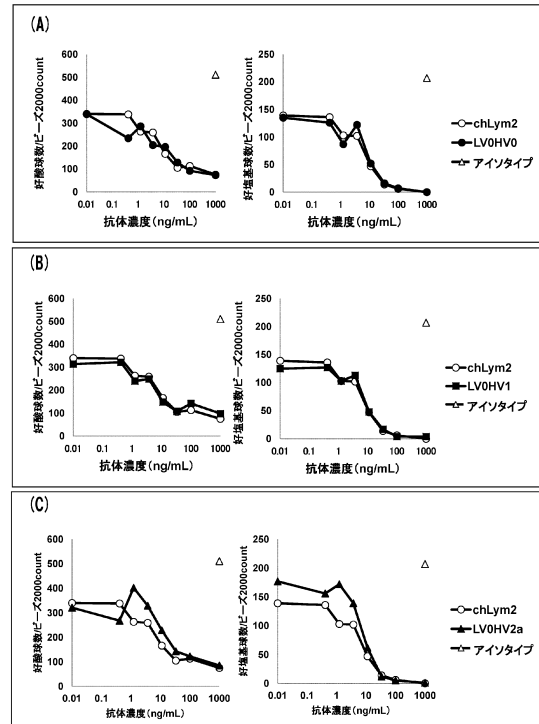
23456789012345678901234567890123	456789012	3456789012
Lym2 VL	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV0	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV1	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV2a	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV2b	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV2c	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV3a	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV3b	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK
LV4	GVPRDFSGSGSDTFTLKISRVEEDVGVYVC	FGQGTKEIK

【図 2】

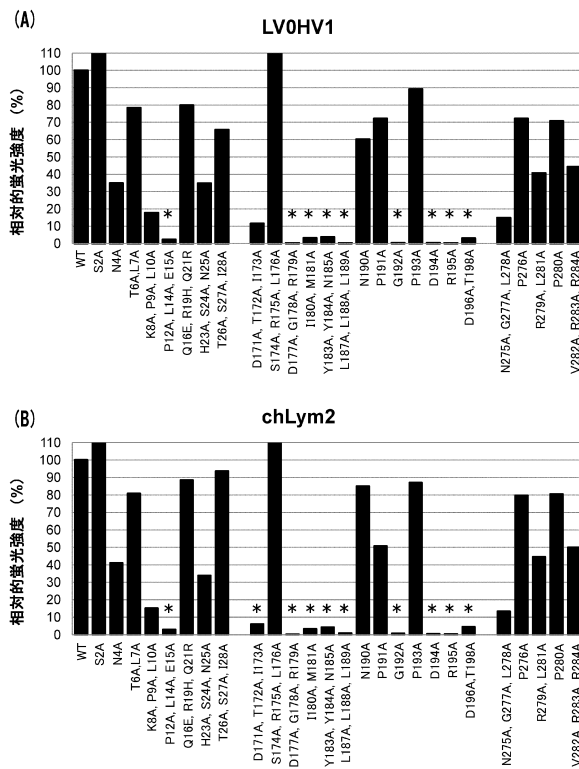
123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	01234567890123456
Lym2 VH	EVQLVESGGGVQPGSRMRLSCAASGFTFS	NYNYA	WVRQAPGKGLWVA
HV0	EVQLVESGGGVQPGSRMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLWVA
HV1	EVQLVESGGGVQPGSRMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLWVA
HV2a	EVQLVESGGGVQPGSRMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLWVA
HV2b	EVQLVESGGGVQPGSRMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLWVA
HV3	EVQLVESGGGVQPGSRMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLWVA
HV4	EVQLVESGGGVQPGSRMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLWVA

78901234567890123456789012345678	90123456789012	34567890123
Lym2 VH	RFTISRDNKNSLYIQMNSRAEDTATYYCAR	WGQGMVTVSS
HV0	RFTISRDNKNSLYIQMNSRAEDTATYYCAR	WGQGMVTVSS
HV1	RFTISRDNKNSLYIQMNSRAEDTATYYCAR	WGQGMVTVSS
HV2a	RFTISRDNKNSLYIQMNSRAEDTATYYCAR	WGQGMVTVSS
HV2b	RFTISRDNKNSLYIQMNSRAEDTATYYCAR	WGQGMVTVSS
HV3	RFTISRDNKNSLYIQMNSRAEDTATYYCAR	WGQGMVTVSS
HV4	RFTISRDNKNSLYIQMNSRAEDTATYYCAR	WGQGMVTVSS

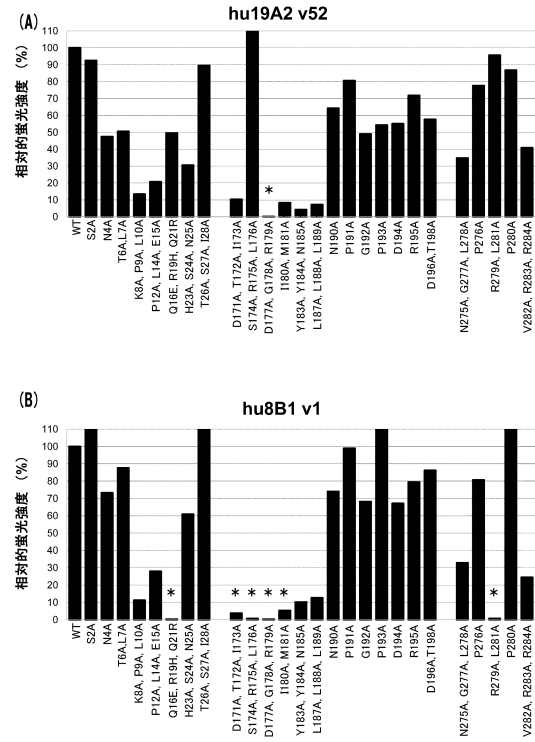
【図 3】



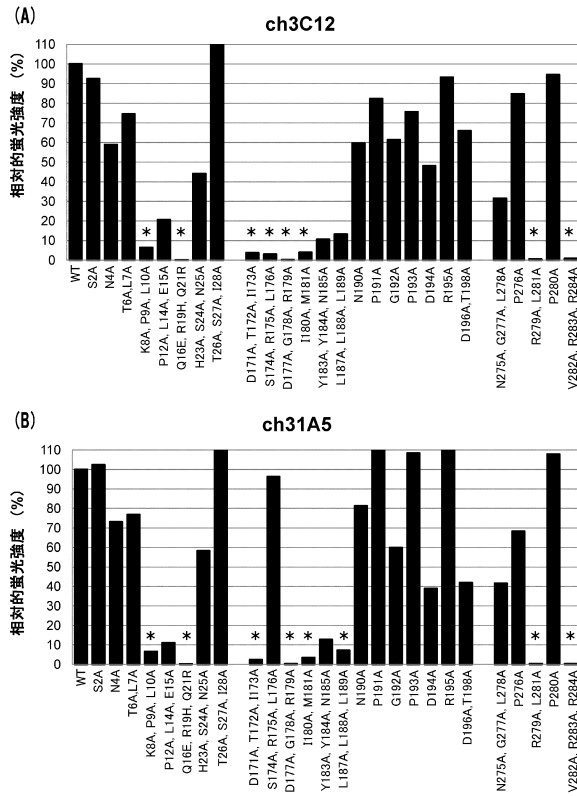
【図 4】



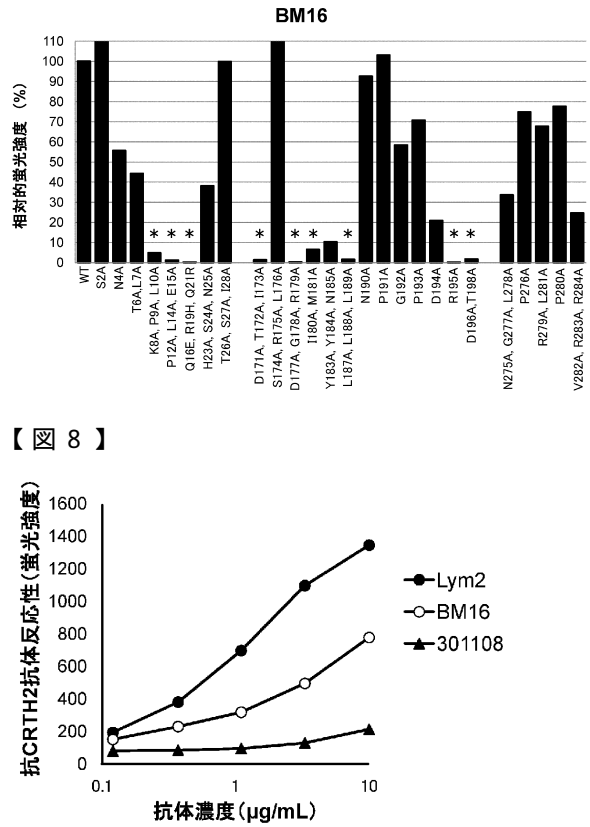
【図 5】



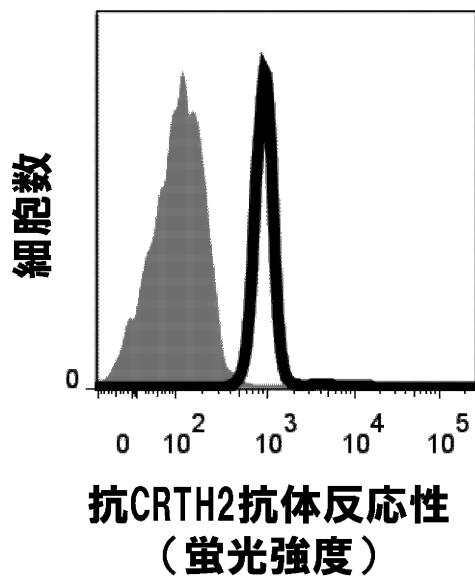
【図 6】



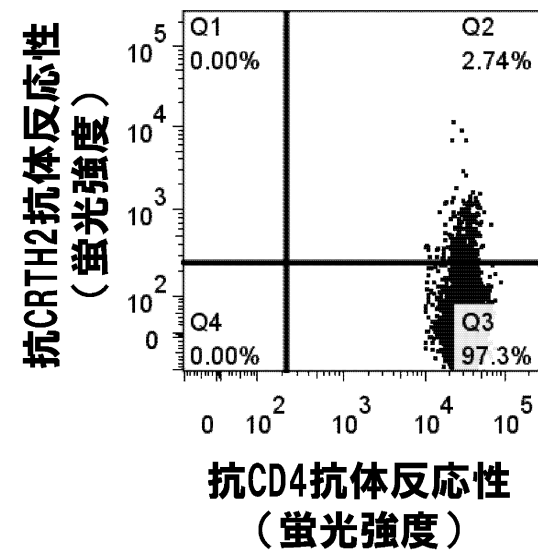
【図 7】



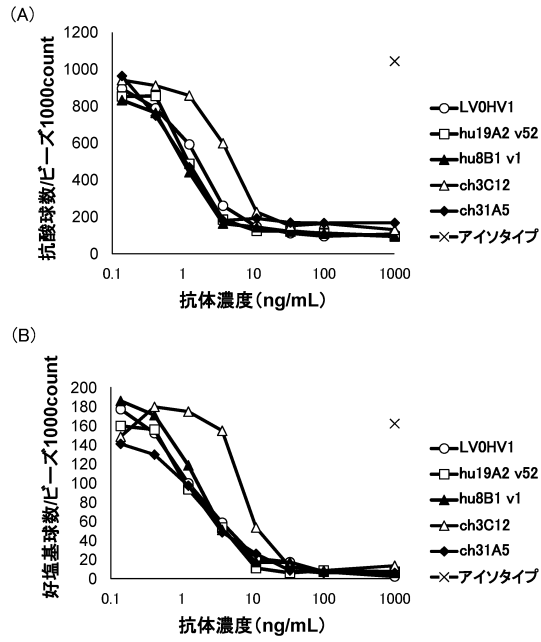
【図 9】



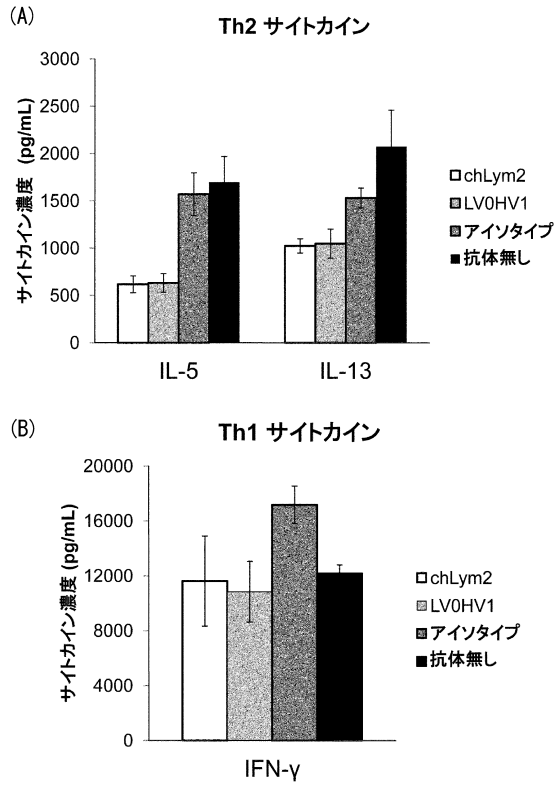
【図 10】



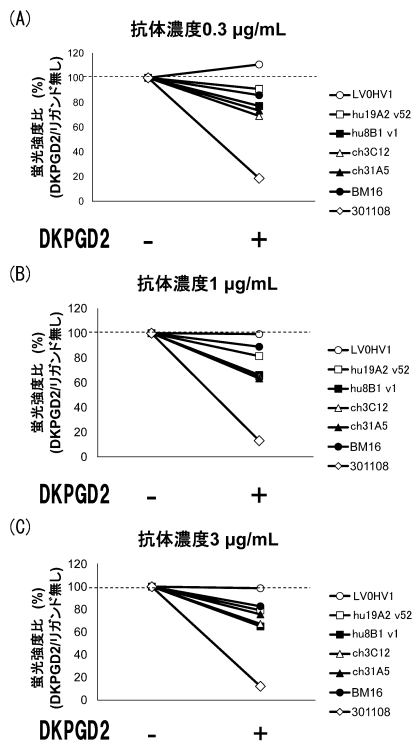
【図 1 1】



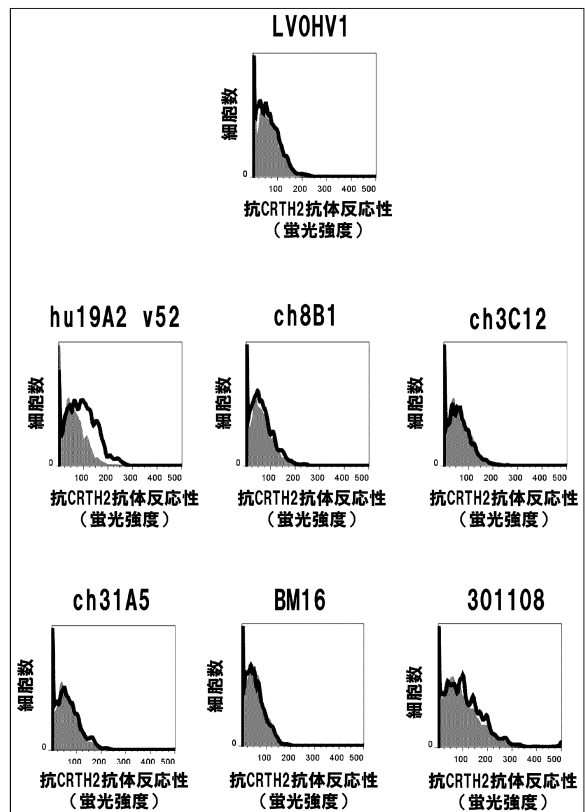
【図 1 2】



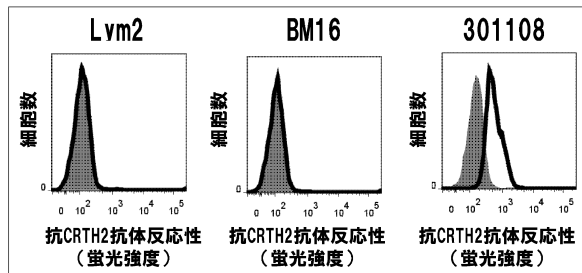
【図 1 3】



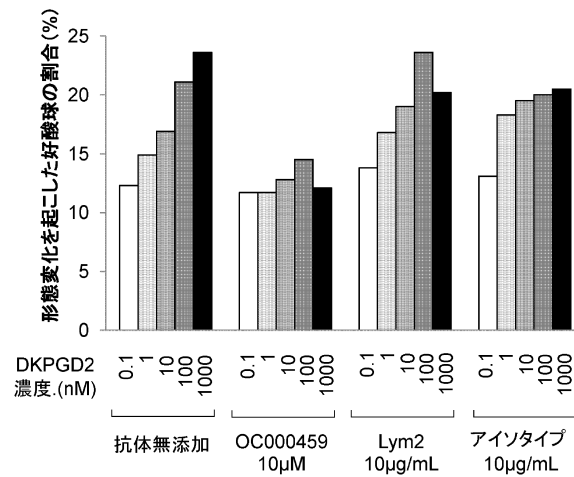
【図 1 4】



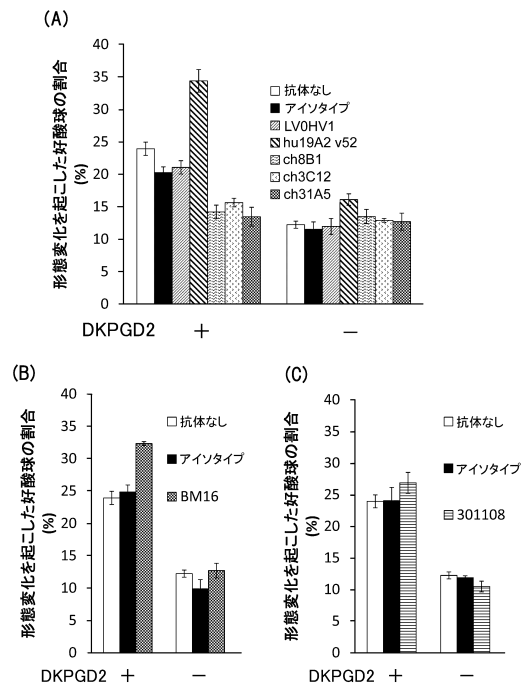
【図 15】



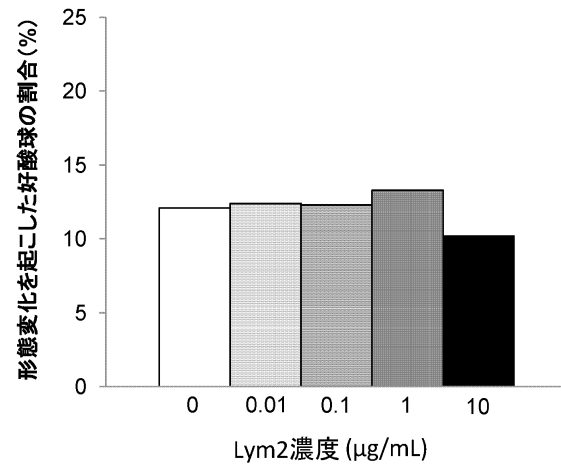
【図 16】



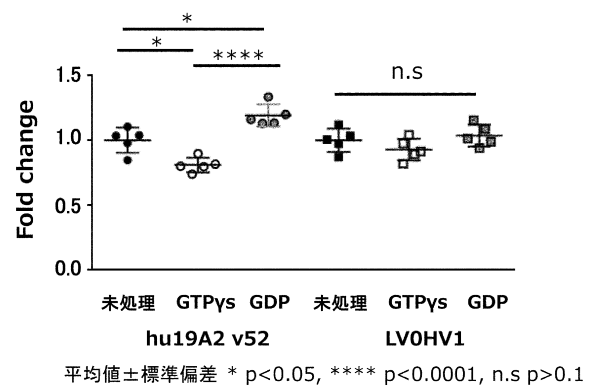
【図 18】



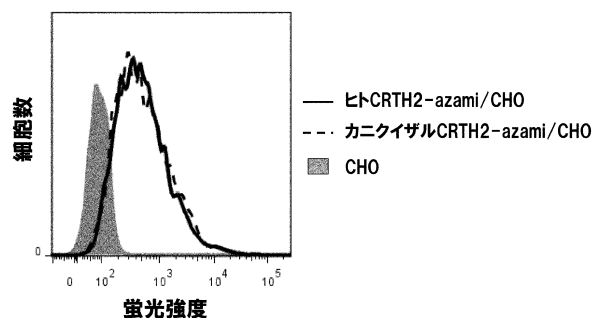
【図 17】



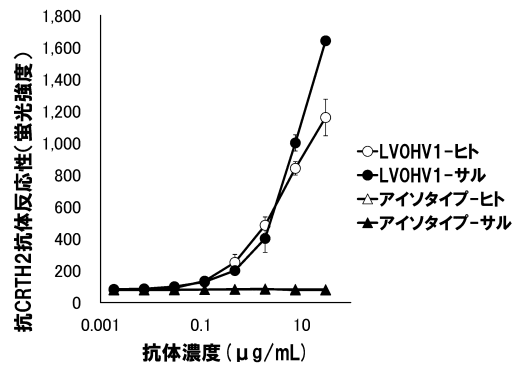
【図 19】



【図 20】



【図 2 1】



【配列表】

0006309050000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
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 5/10
C 1 2 N	5/16	(2006.01)	C 1 2 N 5/16
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D

(72)発明者 岡田 和樹
東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社本社内

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第2014/144865(WO, A1)
国際公開第97/046677(WO, A1)
NAGATA, K., et al., Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo, J. Immunol., 1999年, vol.162, no.3, p.1278-1286
"CRTH-2/GPR44 Antibody FAB33381N", Novus Biologicals [online], 2015-06-26 Updated, [retrieved on 2016.10.04], Retrieved from the Internet: <URL: <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/NOV/FAB33381N.pdf>>
"Human CRTH-2 Antibody", R&D Systems, Inc. [online], 2015-03-13, [retrieved on 2016.10.04], Retrieved from the Internet: <URL: <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/RSD/MAB3338.pdf>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00 - 15/90
C 0 7 K 16/28
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS/WPIX(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	一种特异性结合人CRTH2的抗体		
公开(公告)号	JP6309050B2	公开(公告)日	2018-04-11
申请号	JP2016140458	申请日	2016-07-15
申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
[标]发明人	亀山直哉 安藤宗稔 小川進也 岡田和樹		
发明人	亀山 直哉 安藤 宗稔 小川 進也 岡田 和樹		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/16 A61K39/395 A61P37/08 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61P29/00 C07K14/70596 C07K16/2896 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2319/43 C12N5/10 C12N15/02 G01N33/88 G01N2333/70596 C07K2317/565 G01N33/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/16 A61K39/395.N A61P37/08 A61P37/02 G01N33/53.D A61K49/04 A61K49/04.Z C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/02.P C12N15/02.Z C12N15/06 C12N15/09.P C12N15/09.Z C12N5/12		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/KA04 4C085/LL03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2015141633 2015-07-15 JP		
其他公开文献	JP2017038592A JP2017038592A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

待解决的问题：通过识别和结合人CRTH2的特征性表位，提供具有所需活性的抗人CRTH2抗体。识别并结合具有特定氨基酸序列的人CRTH2的抗体，特别是识别并结合氨基酸序列第192位的甘氨酸和第194位的天冬氨酸中的至少一个的抗体，或抗体片段。【选型图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 特 許 公 報 (B2)		(11) 特許番号 特許第6309050号 (P6309050)	
(45) 発行日 平成30年4月11日 (2018. 4. 11)			(24) 登録日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)		
(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)		C 1 2 N 15/00		Z N A A	
C 0 7 K 16/28 (2006. 01)		C 0 7 K 16/28			
C 0 7 K 16/46 (2006. 01)		C 0 7 K 16/46			
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)		C 1 2 P 21/08			
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)		C 1 2 N 1/15			
請求項の数 17 (全 73 頁) 最終頁に続く					
(21) 出願番号 特願2016-140458 (P2016-140458)		(73) 特許権者 000001029			
(22) 出願日 平成28年7月15日 (2016. 7. 15)		協和発酵キリン株式会社			
(65) 公開番号 特開2017-38592 (P2017-38592A)		東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号			
(43) 公開日 平成29年2月23日 (2017. 2. 23)		(74) 代理人 110002000			
審査請求日 平成29年12月22日 (2017. 12. 22)		特許業務法人栄光特許事務所			
(31) 優先権主張番号 特願2015-141633 (P2015-141633)		(72) 発明者 亀山 直哉			
(32) 優先日 平成27年7月15日 (2015. 7. 15)		東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社本社内			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		(72) 発明者 安藤 宗稔			
早期審査対象出願		東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社本社内			
		(72) 発明者 小川 進也			
		東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社本社内			
(54) 【発明の名称】 ヒト CRTH2 に特異的に結合する抗体					