



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I726897 B

(45) 公告日：中華民國 110 (2021) 年 05 月 11 日

(21) 申請案號：105122490 (22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 15 日

(51) Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
 C07H21/04 (2006.01) C12N15/63 (2006.01)

(30) 優先權：2015/07/15 日本 2015-141633

(71) 申請人：日商協和麒麟股份有限公司 (日本) KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (JP)
 日本國東京都千代田區大手町一丁目 9 番 2 號

(72) 發明人：龜山直哉 KAMEYAMA, NAOYA (JP)；安藤宗稔 ANDO, MUNETOSHI (JP)；小川進也 OGAWA, SHINYA (JP)；岡田和樹 OKADA, KAZUKI (JP)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：
 EP 0851030A1 WO 2014144865A2

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：21 共 174 頁

(54) 名稱

與人類 CRTH2 特異性結合之抗體

(57) 摘要

本發明係關於一種特異性識別人類 CRTH2 並與之結合之抗人類 CRTH2 抗體、該抗體片段、編碼該抗體之胺基酸序列之 DNA、包含該 DNA 之載體、生產該抗體之融合瘤及抗體生產細胞、該抗體之製造方法、包含該抗體或抗體片段之組合物、使用該抗體或抗體片段之過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多或功能亢進之疾病、伴有 Th2 細胞增多或功能亢進之疾病等之治療方法及診斷方法、以及包含該抗體或抗體片段之醫藥及診斷藥。

I726897

發明摘要

合本

※ 申請案號：105722490

※ 申請日：105.7.15

※IPC 分類：
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

【發明名稱】

與人類CRTH2特異性結合之抗體

【中文】

本發明係關於一種特異性識別人類CRTH2並與之結合之抗人類CRTH2抗體、該抗體片段、編碼該抗體之胺基酸序列之DNA、包含該DNA之載體、生產該抗體之融合瘤及抗體生產細胞、該抗體之製造方法、包含該抗體或抗體片段之組合物、使用該抗體或抗體片段之過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多或功能亢進之疾病、伴有Th2細胞增多或功能亢進之疾病等之治療方法及診斷方法、以及包含該抗體或抗體片段之醫藥及診斷藥。

【英文】

無

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

與人類CRTH2特異性結合之抗體

【技術領域】

本發明係關於一種特異性識別人類CRTH2並與之結合之抗人類CRTH2抗體、該抗體片段、編碼該抗體之胺基酸序列之DNA、包含該DNA之載體、生產該抗體之融合瘤及抗體生產細胞、該抗體之製造方法、包含該抗體或抗體片段之組合物、使用該抗體或抗體片段之過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多或功能亢進之疾病、伴有Th2細胞增多或功能亢進之疾病等之治療方法及診斷方法、以及包含該抗體或抗體片段之醫藥及診斷藥。

【先前技術】

已知人類CRTH2(Chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells, Th2上之化學吸引因子受體-同源分子)係亦以GPR44、CD294、DP2等別名而已知之7次膜貫通型G蛋白質共軛型受體(G-protein-coupled receptor、以下記為GPCR)，其係針對攝護腺素D2(以下記為PGD2)之受體之一(非專利文獻1)。CRTH2係於1996年作為人類Th2特異性蛋白質而選殖，將其稱為B19而揭示(專利文獻1)。

已知CRTH2與作為配位子之PGD2及13,14-二氫-15-酮基攝護腺素D2(13,14-dihydro-15-keto prostaglandin D2, 以下記為DKPGD2)為代表之PGD2代謝物結合，於細胞內經由Gai蛋白質傳遞訊息，其結果與CRTH2表現細胞之趨化及活化相關(非專利文獻1)。

人類CRTH2係於Th2細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球及2型自然淋巴球(Type 2 innate lymphoid cells、以下記為ILC2)等中可見表現(非專利

文獻1、2)。報告有CRTH2係於Th2細胞激素產生細胞中特異性表現之表面標記物(非專利文獻3)。

又，ILC2於2011年於人類體內鑑定出之與過敏應答相關之新穎細胞集團，作為規定本細胞之特異性表面標記物，可列舉CRTH2(非專利文獻2)。又，報告有於非典型單核球(nonclassical monocyte)或Th2/Th17細胞中表現有CRTH2(非專利文獻4、5)。

已知於以哮喘為首之過敏疾病中，CRTH2表現細胞有助於病態。報告有於哮喘患者之支氣管肺泡清洗液中之細胞中，與健康者相比，以高頻度可見CRTH2陽性T細胞(非專利文獻6)，且報告有於異位性皮膚炎中，與重症度相關地CRTH2陽性T細胞增加(非專利文獻7)。

嗜酸性球包含具有細胞毒殺性之顆粒蛋白質，於慢性支氣管哮喘患者之呼吸道組織或異位性皮膚炎患者之病變部位可見該蛋白質之沈積等，因此認為嗜酸性球於慢性支氣管哮喘或異位性皮膚炎等過敏性疾病之病態形成中起到重要作用(非專利文獻8、9)。

嗜鹼性球於細胞內蓄積組織胺或白三烯等炎症性分子，藉由在細胞表面表現之Fcε受體或Fcγ受體之交聯，放出該分子，因此與引起過敏反應相關(非專利文獻10)。

ILC2係於呼吸道黏膜或皮膚之局部所存在之細胞，具有應答隨著組織障礙所產生之介白素(以下記為IL)-25、IL-33等細胞激素，而產生大量之Th2細胞激素之特性，與過敏疾病之病態形成相關(非專利文獻11)。

作為針對CRTH2之單株抗體，市售有301108(R & D公司)。又，已知有BM16(專利文獻2)。該等為嚙齒類抗體，尚未開發為醫藥品。

進而，與純系19A2相關之基因重組嵌合抗體及人類化抗體顯示出如下情況：藉由效應活性而進行CRTH2表現細胞之除去；與純系8B1相關之人類化抗體或與純系3C12及31A5相關之小鼠抗體具有針對

CRTH2之拮抗劑活性。

又，與純系19A2相關之抗體顯示出對於人類肥大細胞亦顯示出具有反應性之情況(專利文獻3)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻1]日本專利第3144805號公報

[專利文獻2]國際公開第97/46677號

[專利文獻3]國際公開第2014/144865號

[非專利文獻]

[非專利文獻1]The Journal of Experimental Medicine, 2001. 193(2): p.255-261.

[非專利文獻2]Nature Immunology, 2011. 12(11): p.1055-1062.

[非專利文獻3]European Journal of Immunology, 2000. 30(10): p.2972-2979.

[非專利文獻4]Blood, 2011. 118(5): e16-31.

[非專利文獻5]Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014.134(5): p. 1175-1186. e7.

[非專利文獻6]Clinical & Experimental Immunology, 2010. 161(1): p. 34-40.

[非專利文獻7]Journal of Investigative Dermatology, 2002. 119(3): p. 609-616.

[非專利文獻8]Advances in Immunology, 1986. 39: p. 177-253.

[非專利文獻9]Immunology Today, 1992. 13(12): p. 501-507.

[非專利文獻10]Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. 132(4): p. 789-801.

[非專利文獻11]Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014.

134(3): p. 671-678.

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

迄今為止確定了複數種人類CRTH2抗體，但期望確定具有所期望之活性的抗人類CRTH2抗體，例如對各種人類免疫細胞之反應性、對人類CRTH2之特異性結合活性、或對人類CRTH2配位子依賴活性之影響等。

本發明之目的在於提供藉由識別人類CRTH2之特徵性抗原決定基並與之結合而具有所期望之活性之抗人類CRTH2抗體、該抗體片段、編碼該抗體之胺基酸序列之DNA、包含該DNA之載體、生產該抗體之融合瘤及抗體生產細胞、該抗體之製造方法、包含該抗體或抗體片段之組合物、使用該抗體或抗體片段之過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多或功能亢進之疾病、伴有Th2細胞增多或功能亢進之疾病等之治療方法及診斷方法、以及包含該抗體或抗體片段之醫藥及診斷藥。

[解決問題之技術手段]

本發明係關於以下之(1)~(26)。

(1) 一種抗體或該抗體片段，其識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少一者並與之結合。

(2) 如(1)之抗體或該抗體片段，其中抗體係識別選自由序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第13號之異白胺酸、第14號之白胺酸、第15號之麩胺酸、第177號之天冬胺酸、第178號之甘胺酸、第179號之精胺酸、第180號之異白胺酸、第181號之甲硫胺酸、第182號之半胱胺酸、第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸、第185號之天冬醯胺、第186號之纈胺酸、第187號之白胺酸、

第188號之白胺酸、第189號之白胺酸、第195號之精胺酸、第196號之天冬胺酸、第197號之丙胺酸、及第198號之蘇胺酸所組成之群中之胺基酸殘基之至少1個結合並與之結合者。

(3) 如(1)或(2)之抗體或該抗體片段，其中抗體係識別選自由以下之(a)~(g)所組成之群中之胺基酸殘基之至少1個之抗體：

(a)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第14號之白胺酸及第15號之麩胺酸、

(b)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第177號之天冬胺酸、第178號之甘胺酸、及第179號之精胺酸、

(c)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第180號之異白胺酸及第181號之甲硫胺酸、

(d)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸及第185號之天冬醯胺、

(e)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第187號之白胺酸、第188號之白胺酸及第189號之白胺酸、

(f)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第195號之精胺酸、以及

(g)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第196號之天冬胺酸及第198號之蘇胺酸。

(4) 如(1)~(3)中任一項之抗體或該抗體片段，其中抗體係選自由以下之(a)~(d)所組成之群中之任一種抗體：

(a)抗體重鏈可變區(以下，略記為VH)之互補決定區(以下，略記為CDR)1~3分別包含序列編號20~22所表示之胺基酸序列，且抗體輕鏈可變區(以下，略記為VL)之CDR1~3分別包含序列編號23~25所表示之胺基酸序列之抗體、

(b)包含如下之VH以及VL之抗體，該VH包含序列編號49所表示

之胺基酸序列或導入有選自將序列編號49所表示之胺基酸序列中之第18號之白胺酸置換為甲硫胺酸、第77號之天冬醯胺置換為絲胺酸、第93號之纈胺酸置換為蘇胺酸、及第117號之蘇胺酸置換為纈胺酸之修飾的至少1個修飾之胺基酸序列，該VL包含序列編號33所表示之胺基酸序列或導入有選自將序列編號33所表示之胺基酸序列中之第2號之異白胺酸置換為纈胺酸、第4號之甲硫胺酸置換為白胺酸、第15號之脯胺酸置換為白胺酸、及第85號之丙胺酸置換為脯胺酸之修飾的至少1個修飾之胺基酸序列、

(c)包含含有序列編號49、51、53、55、57及59所表示之胺基酸序列之任一個之VH以及含有序列編號33、35、37、39、41、43、45及47所表示之胺基酸序列之任一個之VL的抗體、以及

(d)包含含有序列編號17所表示之胺基酸序列之VH及含有序列編號19所表示之胺基酸序列之VL的抗體。

(5) 如(1)~(4)中任一項之抗體或該抗體片段，其中抗體係具有選自由下述(a)~(h)所組成之群中之至少1個特徵之抗體：

(a)於人類CRTH2之配位子之存在下，對人類CRTH2之反應性不降低、

(b)不具有中和活性、

(c)具有抗體依賴性細胞毒殺(ADCC)活性、

(d)不與肥大細胞及Th1細胞之至少一者反應、

(e)與選自嗜酸性球、嗜鹼性球、Th2細胞及2型自然淋巴球(ILC2)之至少一種細胞反應；

(f)不具有促效劑活性、

(g)不增強人類CRTH2之配位子之訊息、以及

(h)針對活化狀態或非活化狀態之人類CRTH2之反應性不變化。

(6) 如(1)~(5)中任一項之抗體或該抗體片段，其中抗體係包含

人類Fc區之抗體。

(7) 如(1)~(6)中任一項之抗體或該抗體片段，其中抗體係單株抗體。

(8) 如(1)~(7)中任一項之抗體或該抗體片段，其中抗體係基因重組抗體。

(9) 如(8)之基因重組抗體或該抗體片段，其中基因重組抗體係選自人類型嵌合抗體、人類型CDR移植抗體及人類抗體中之任一種基因重組抗體。

(10) 如(1)~(9)中任一項之抗體或該片段，其中抗體係與猴CRTH2結合之抗體。

(11) 如(1)~(10)中任一項之該抗體片段，其係選自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、雙功能抗體(diabody)、dsFv及包含CDR之肽中之任一個抗體片段。

(12) 一種融合瘤，其生產如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段。

(13) 一種DNA，其編碼如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段。

(14) 一種重組體載體，其含有如(13)之DNA。

(15) 一種轉形株，其係將如(14)之重組體載體導入至宿主細胞而獲得。

(16) 一種抗體或該抗體片段之製造方法，其係如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段之製造方法，其特徵在於：於培養基中培養如(12)之融合瘤或如(15)之轉形株，於培養物中生產蓄積如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段，並該培養物採取抗體或該抗體片段。

(17) 一種與人類CRTH2相關之疾病之治療劑，其含有如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段作為有效成分。

(18) 一種與人類CRTH2相關之疾病之診斷劑，其含有如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段作為有效成分。

(19) 如(17)或(18)之藥劑，其中與CRTH2相關之疾病為過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進之至少一者之疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者之疾病、或伴有2型自然淋巴球(ILC2)增多及功能亢進之至少一者之疾病。

(20) 一種與人類CRTH2相關之疾病之治療方法，其包括投予如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段之有效量。

(21) 一種與人類CRTH2相關之疾病之診斷方法，其包括投予如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段之有效量。

(22) 如(20)或(21)之方法，其中與人類CRTH2相關之疾病為過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進之至少一者之疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者之疾病、或伴有ILC2增多及功能亢進之至少一者之疾病。

(23) 如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段，其係用以於與人類CRTH2相關之疾病之治療及診斷之至少一者中使用。

(24) 如(23)之抗體或該抗體片段，其中與人類CRTH2相關之疾病為過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進之至少一者之疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者之疾病、或伴有ILC2增多及功能亢進之至少一者之疾病。

(25) 一種抗體或該抗體片段之用途，其係如(1)~(11)中任一項之抗體或該抗體片段之用途，用以之製造與人類CRTH2相關之疾病之治療及診斷劑之至少一者。

(26) 如(25)之抗體或該抗體片段之用途，其中與人類CRTH2相關之疾病為過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進之至少一者之疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者之疾

病、或伴有ILC2增多及功能亢進之至少一者之疾病。

[發明之效果]

藉由本發明而提供識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少一者並與之結合的抗體或該抗體片段等。

本發明之抗體與嗜酸性球、嗜鹼性球Th2細胞、ILC2等表現CRTH2之細胞特異性反應，即使於高濃度之配位子之存在下亦於CRTH2表現細胞中顯示出較高之反應性，且不具有促效劑活性、中和活性、及人類CRTH2之配位子之訊息之增強活性。因此，本發明之抗體或該抗體片段可發揮出以表現CRTH2之嗜酸性球、嗜鹼性球、Th2細胞、ILC2等表現CRTH2之細胞為標的的治療效果。

【圖式簡單說明】

圖1係表示不含訊息序列之Lym2抗體輕鏈可變區及各人類化Lym2抗體輕鏈可變區(LV0、LV1、LV2a、LV2b、LV2c、LV3a、LV3b及LV4)之胺基酸序列。各序列中之由框所包圍之區域表示CDR序列。

圖2係表示不含訊息序列之Lym2抗體重鏈可變區及各人類化Lym2抗體重鏈可變區(HV0、HV1、HV2a、HV2b、HV3及HV4)之胺基酸序列。各序列中之由框所包圍之區域表示CDR序列。

圖3(A)~(C)係表示利用流式細胞儀分析大鼠/人類嵌合型Lym2抗體(以下，有時亦記為chLym2)及人類化Lym2抗體之針對人類嗜酸性球及人類嗜鹼性球之細胞毒殺活性之結果。於圖3(A)~(C)中，左側之圖表示針對人類嗜酸性球之細胞毒殺活性，右側之圖表示針對人類嗜鹼性球之細胞毒殺活性。於各圖中，縱軸表示每2000個對照顆粒之各細胞之個數，橫軸表示抗體濃度。圖3(A)○表示chLym2、●表示人類化Lym2抗體LV0HV0、△表示同型對照抗體。圖3(B)○表示chLym2、■表示人類化Lym2抗體LV0HV1、△表示同型對照抗體。圖

3(C)○表示chLym2、▲表示人類化Lym2抗體LV0HV2a、△表示同型對照抗體。

圖4(A)係表示人類化Lym2抗體LV0HV1對於各人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞之反應性，圖4(B)係表示chLym2對於各人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞之反應性。於各圖中，縱軸係Azami-Green標籤之螢光強度，其係關於對各抗人類CRTH2單株抗體之螢光強度進行修正而成的相對螢光強度，表示將對於野生型人類CRTH2表現細胞之反應性之值設為100%時，對於各胺基酸置換體表現細胞之反應性之值(%)。於橫軸中，WT表示野生型人類CRTH2，其他表示胺基酸置換體之種類。*表示見到自野生型CRTH2之相對螢光強度降低90%以上之相對螢光強度。以下，於圖5~圖7中亦相同。

圖5(A)係表示hu19A2 v52對於各CRTH2胺基酸置換體之反應性，圖5(B)係表示hu8B1 v1對於各CRTH2胺基酸置換體之反應性。

圖6(A)係表示ch3C12對於各CRTH2胺基酸置換體之反應性，圖6(B)係表示ch31A5對於各CRTH2胺基酸置換體之反應性。

圖7係表示BM16對於各CRTH2胺基酸置換體之反應性。

圖8係表示利用流式細胞儀分析抗人類CRTH2單株抗體針對人類嗜酸性球之反應性之結果。●表示Lym2抗體、○表示BM16、▲表示301108，縱軸表示螢光強度，橫軸表示各抗人類CRTH2單株抗體之抗體濃度。

圖9係表示利用流式細胞儀分析chLym2針對人類嗜鹼性球之反應性之結果。塗實部分表示同型對照抗體之反應性，由實線所包圍之部分表示chLym2之反應性，縱軸表示細胞數，橫軸表示螢光強度。

圖10係表示利用流式細胞儀分析人類化Lym2抗體LV0HV1對於人類CD4陽性T細胞之反應性之結果。將針對藉由Forward scatter(以下記為FSC)-Side scatter(以下記為SSC)展開而區分淋巴球，進而藉由

CD3陽性且CD4陽性細胞而進行區分之細胞群的、人類化Lym2抗體LV0HV1之螢光染色之螢光強度及CD4抗體之螢光染色之螢光強度分別示於縱軸及橫軸。

圖11(A)及圖11(B)係表示利用流式細胞儀分析抗人類CRTH2單株抗體針對人類嗜酸性球及人類嗜鹼性球之細胞毒殺活性之結果。上段表示針對人類嗜酸性球之細胞毒殺活性，下段表示針對人類嗜鹼性球之細胞毒殺活性。於各圖中，於縱軸表示每1000個對照顆粒中之各細胞之個數，於橫軸表示抗體濃度。○表示人類化Lym2抗體LV0HV1、□表示hu19A2 v52、▲表示hu8B1 v1、△表示ch3C12、◆表示ch31A5、●表示同型對照抗體。

圖12(A)及圖12(B)係表示分析抗人類CRTH2單株抗體之人類Th2及Th1細胞激素減少活性之結果。圖12(A)係將添加各抗體時之作為Th2細胞激素之IL-5或IL-13之濃度示於縱軸。又，圖12(B)係將添加有各抗體時之作為Th1細胞激素之IFN- γ 之濃度示於縱軸。

圖13(A)~圖13(C)係表示使用人類CRTH2表現293EBNA細胞，利用流式細胞儀分析於作為CRTH2配位子之DKPGD2之存在下的抗人類CRTH2單株抗體之反應性變化之結果。將凡例中所示之抗人類CRTH2單株抗體之濃度為0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之結果分別示於圖13(A)、圖13(B)及圖13(C)中。於各圖中，縱軸表示於將DKPGD2之非存在下之螢光強度設為100%時之螢光強度之比例。

圖14係表示利用流式細胞儀分析抗人類CRTH2單株抗體對於藉由IgE及交聯抗體處理而刺激之人類分化誘導肥大細胞之反應性之結果。各圖表示圖上所示之抗體之反應性，於縱軸表示細胞數，於橫軸表示螢光強度。塗實部分表示同型對照抗體之反應性，由實線所包圍之部分表示抗人類CRTH2單株抗體之反應性。

圖15係表示利用流式細胞儀分析抗人類CRTH2單株抗體對於人

類分化誘導Th1細胞之反應性之結果。各圖表示圖上所示之抗體之反應性，於縱軸表示細胞數，於橫軸表示螢光強度。塗實部分表示同型對照抗體之反應性，由實線所包圍之部分表示抗人類CRTH2單株抗體之反應性。

圖16係表示以人類嗜酸性球之形態變化為指標之Lym2抗體之拮抗劑活性評價之結果。將於圖表之下所示之各抗體之存在下或非存在下，對凡例中所示之濃度之DKPGD2進行處理時，於流式細胞儀分析中之高FSC區域中所檢測出之嗜酸性球之比例(%)表示於縱軸中。

圖17係表示以人類嗜酸性球之形態變化為指標之Lym2抗體之促效劑活性評價之結果。將對凡例中所示之濃度之Lym2抗體進行處理時，於高FSC區域所檢測出之嗜酸性球之比例(%)表示於縱軸中。

圖18(A)~圖18(C)均係表示以人類嗜酸性球之形態變化為指標之抗人類CRTH2單株抗體之促效劑活性、拮抗劑活性及配位子之活化之增強活性的評價結果。圖18(A)係表示關於人類化抗體或嵌合抗體之結果，圖18(B)係表示關於大鼠抗體之結果，圖18(C)係表示關於小鼠抗體之結果。於各圖中，縱軸表示於DKPGD2之存在或非存在下，對凡例中所示之各抗人類CRTH2單株抗體或同型抗體進行處理時，於流式細胞儀分析之高FSC區域中所檢測出之嗜酸性球之比例(%)。

圖19係表示藉由ELISA法分析因對CRTH2表現細胞之膜組分之GTP γ S或GDP處理所引起之CRTH2之構形變化，對CRTH2單株抗體之反應性所產生之影響的結果。縱軸表示將未進行GTP γ S及GDP處理時之吸光度設為1時之倍性變化(Fold change)。橫軸表示GTP γ S及GDP處理之有無、及評價抗體(hu19A2 v52及人類化Lym2抗體LV0HV1)。

圖20係表示利用流式細胞儀分析Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞及食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞中之Azami-Green之表現之結果。於縱軸表示細胞數，於橫軸表示Azami-Green之

螢光強度。塗實部分表示作為母細胞之CHO/DG44細胞之螢光強度，由實線所包圍之部分表示Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞之螢光強度，由虛線所包圍之部分表示Azami-Green融合食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞之螢光強度。

圖21係表示利用流式細胞儀分析人類化Lym2抗體LV0HV1及同型抗體針對Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞及食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞之反應性之結果。○表示LV0HV1對於Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞之反應性，●表示LV0HV1針對Azami-Green融合食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞之反應性，△表示同型抗體針對Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞之反應性，▲表示同型抗體針對Azami-Green融合食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞之反應性，縱軸表示螢光強度，橫軸表示各抗體之抗體濃度。

【實施方式】

作為本發明中之人類CRTH2，可列舉包含序列編號2或基因庫(GenBank)登錄號BAA74518所表示之胺基酸序列的多肽。於序列編號2或基因庫登錄號BAA74518所表示之胺基酸序列中，包含缺失、置換、插入及/或附加有1個以上胺基酸之胺基酸序列、且具有人類CRTH2之功能之多肽，以及包含與序列編號2或基因庫登錄號BAA74518所表示之胺基酸序列具有60%以上、較佳為80%以上、更佳為90%以上、進而較佳為95%以上、最佳為98%以上之同源性之胺基酸序列，且具有人類CRTH2之功能的多肽亦包含於本發明中之人類CRTH2中。

於序列編號2或基因庫登錄號BAA74518所表示之胺基酸序列中，具有缺失、置換、插入及/或附加有1個以上胺基酸之胺基酸序列的多肽可藉由使用定點突變導入法[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. USA, 82, 488 (1985)]等，例如對編碼具有序列編號2所表示之胺基酸序列之多肽的DNA導入定點突變而獲得。缺失、置換或附加之胺基酸數並無特別限定，較佳為1個～數十個、例如1～20個，更佳為1個～數個、例如1～5個胺基酸。

作為編碼人類CRTH2之基因，可列舉基因庫登錄號AB008535或序列編號1所表示之鹼基序列。於基因庫登錄號AB008535或序列編號1所表示之鹼基序列中，包含缺失、置換或附加有1個以上鹼基之鹼基序列、且含有編碼具有人類CRTH2之功能之蛋白質的DNA之基因，包含與基因庫登錄號AB008535或序列編號1所表示之鹼基序列具有至少60%以上之同源性的鹼基序列、較佳為80%以上之同源性的鹼基序列、進而較佳為95%以上之同源性的鹼基序列、且含有編碼具有人類CRTH2之功能之多肽之DNA的基因，以及包含與具有序列編號1所表示之鹼基序列之DNA於嚴格條件下進行雜交之DNA、且含有編碼具有人類CRTH2之功能之多肽之DNA的基因等亦包含於編碼本發明之CRTH2之基因中。

關於在嚴格條件下進行雜交之DNA，意指藉由將具有序列編號1所表示之鹼基序列之DNA用於探針之菌落雜交法、噬菌斑雜交法、南方墨點雜交法、或DNA微陣列法等而獲得之能夠進行雜交之DNA。

具體而言，可列舉能夠藉由如下方法而鑑定之DNA：使用固定化有經雜交之菌落或源自溶斑法之DNA、或具有該序列之PCR產物或寡聚DNA之過濾器或載玻片，於0.7～1.0 mol/L之氯化鈉之存在下、

65°C下進行雜交[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)]後，使用0.1~2倍濃度之SSC溶液(1倍濃度之SSC溶液之組成包含150 mmol/L氯化鈉、15 mmol/L檸檬酸鈉)，於65°C之條件下對過濾器或載玻片進行清洗。

作為能夠進行雜交之DNA，可列舉與基因庫登錄號AB008535或序列編號1所表示之鹼基序列具有至少60%以上之同源性的DNA、較佳為80%以上之同源性之DNA、進而較佳為95%以上之同源性之DNA。

編碼真核生物之蛋白質之基因之鹼基序列常可見基因之多型。於本發明中所使用之基因中，因此種多型而於鹼基序列中產生小規模之變異之基因亦包含於本發明之編碼人類CRTH2之基因中。

本發明中之同源性之數值除了特別明示之情形以外，亦可為使用業者所公知之同源性檢索程式而算出之數值，關於鹼基序列，可列舉使用於BLAST[J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]中預設之參數而算出之數值等，關於胺基酸序列，可列舉使用於BLAST2[Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]中預設之參數而算出之數值等。

作為預設之參數，於G(Cost to open gap)為鹼基序列之情形時為5，於胺基酸序列之情形時為11，於-E(Cost to extend gap)為鹼基序列之情形時為2，於胺基酸序列之情形時為1，於-q(Penalty for nucleotide mismatch)為-3、-r(reward for nucleotide match)為1、-e(expect value)為10、-W(wordsize)為鹼基序列之情形時為11殘基，

於胺基酸序列之情形時為3殘基，於-y[Dropoff(X)for blast extensions in bits]為blastn之情形時為20，於blastn以外之程式中為7，於-X(X dropoff value for gapped alignment in bits)為15及-Z(final X dropoff value for gapped alignment in bits)為blastn之情形時為50，於blastn以外之程式中為25 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

包含序列編號2或基因庫登錄號BAA74518中所示之胺基酸序列之部分序列的多肽可由業者藉由公知之方法而製作。例如可藉由如下方式而製作：使編碼序列編號2所表示之胺基酸序列之DNA之一部分缺失，培養導入有含其之表現載體之轉形體。又，基於藉由上述方法而製作之多肽或DNA，藉由與上述同樣之方法，可獲得具有於序列編號2或基因庫登錄號BAA74518中所示之胺基酸序列之部分序列中，缺失、置換或附加有1個以上胺基酸之胺基酸序列的多肽。進而，包含序列編號2或基因庫登錄號BAA74518中所示之胺基酸序列之部分序列的多肽、或具有於序列編號2或基因庫登錄號BAA74518中所示之胺基酸序列之部分序列中，缺失、置換或附加有1個以上胺基酸之胺基酸序列的多肽亦可藉由苊基甲氧基羰基(Fmoc)法、第三丁氧基羰基(tBoc)法等化學合成法而製造。

作為人類CRTH2之功能，可列舉藉由與其配位子、例如PGD2之結合，傳遞人類CRTH2依賴性細胞內訊息，誘導表現人類CRTH2之細胞之趨化、由該細胞之細胞激素產生亢進、或伴有細胞直徑、細胞表面積等之變化的細胞形態變化等。

作為人類CRTH2之細胞外區域，可列舉包含序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第1~33號之胺基酸殘基之N末端區域、包含第95~111號之胺基酸殘基之環1區域、包含第169~206號之胺基酸殘基之環2區域及包含第264~285號之胺基酸殘基之環3區域[J

Immunol, 1999. 162(3): p.1278-86.]。作為N末端區域、環1區域、環2區域及環3區域，具體而言分別列舉包含序列編號2所表示之胺基酸序列中之第1~33號、第95~111號、第169~206號及第264~285號之胺基酸殘基之多肽部分。

作為本發明中之抗體，可為單株抗體、多株抗體等任意抗體，較佳為列舉單株抗體。作為本發明之抗體，具體而言可列舉藉由融合瘤而產生之抗體、或藉由基因重組技術而產生之基因重組抗體。又，作為基因重組抗體，例如可列舉藉由基因重組技術而製作之小鼠抗體、大鼠抗體、人類型嵌合抗體、人類化抗體及人類抗體等。

所謂單株抗體係單株抗體產生細胞所分泌之抗體，識別僅一個抗原決定基(亦稱為epitope)，構成單株抗體之胺基酸序列(一級結構)均一。

於本發明中，作為單株抗體，可列舉藉由融合瘤而生產之抗體、或藉由以包含抗體基因之表現載體進行轉形而成之轉形體所生產之抗體等、藉由基因重組技術而製作之基因重組抗體。

所謂多株抗體係包含2個以上單株抗體之抗體群，可藉由構成該抗體群之複數個抗體而識別複數個抗原決定基。

於本發明中，作為抗原決定基，可列舉識別單株抗體並與之結合之單一之胺基酸序列及包含胺基酸序列之立體結構以及藉由轉譯後修飾而修飾之胺基酸序列及包含該胺基酸序列之立體結構等。

作為藉由轉譯後修飾而修飾之胺基酸序列，可列舉糖鏈與具有OH取代基之蘇胺酸及絲胺酸結合之O結合型糖鏈、與具有NH₂取代基之麩醯胺及天冬醯胺結合之N結合型糖鏈以及硫酸分子與具有OH取代基之蘇胺酸結合之結合有硫酸基等之胺基酸序列。

識別本發明之抗體的人類CRTH2之抗原決定基可藉由進行抗體之結合實驗而確定，上述抗體之結合實驗使用使人類CRTH2之一部分

區缺失之缺損體、將人類CRTH2之一部分胺基酸殘基置換為其他胺基酸殘基之變異體、與源自其他蛋白質之區置換之變異體及人類CRTH2之部分肽片段等。又，結合本發明之抗體的人類CRTH2之抗原決定基可藉由在經蛋白質分解酶消化之人類CRTH2中添加本發明之抗體，進行使用已知之質量分析法的抗原決定基定位(epitope mapping)而確定。

作為識別本發明之抗體的人類CRTH2之抗原決定基中所含之胺基酸殘基，例如可列舉由於該胺基酸殘基之置換，本發明之抗體之反應性消失之胺基酸殘基。

本發明中之抗體之反應性例如可藉由使用流式細胞儀等測定抗體對於表現野生型人類CRTH2受體或胺基酸置換體之細胞的結合量(根據野生型及置換體的表現量而修正)而求出。又，抗體之結合量可藉由使用固相三明治法等之放射免疫測定法、或使用酶免疫測定法(ELISA)等之對於人類CRTH2之公知之免疫學檢測法、或使用Biacore系統(GE healthcare公司)等之表面電漿子共振等方法而確認。

又，亦可藉由將公知之免疫學檢測法[Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、單株抗體實驗手冊，Kodansha Scientific(1987)]等組合而確認。

本發明中之抗體之反應性之消失係表示與抗體對於表現野生型人類CRTH2之細胞之反應性相比而言，抗體對於表現胺基酸置換體之細胞之反應性降低70%以上、較佳為80%以上、更佳為90%以上、進而較佳為95%以上。

作為結合本發明之抗體之抗原決定基，可列舉包含序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬

胺酸的至少1個胺基酸殘基的抗原決定基。

又，作為結合本發明之抗體之抗原決定基，具體而言可列舉下述(a)~(c)之抗原決定基。

(a)包含序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸的抗原決定基、

(b)包含序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第194號之天冬胺酸的抗原決定基、

(c)包含序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸的抗原決定基。

又，作為結合本發明之抗體的抗原決定基，可列舉包含序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少1個胺基酸殘基，且包含選自由序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第14號之白胺酸、第15號之麩胺酸、第177號之天冬胺酸、第178號之甘胺酸、第179號之精胺酸、第180號之異白胺酸、第181號之甲硫胺酸、第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸、第185號之天冬醯胺、第187號之白胺酸、第188號之白胺酸、第189號之白胺酸、第195號之精胺酸、第196號之天冬胺酸、及第198號之蘇胺酸所組成之群中的胺基酸殘基之至少1個的抗原決定基。

又，作為結合本發明之抗體的抗原決定基，可列舉包含序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少1個胺基酸殘基，且包含下述(a)~(g)之至少任一個的抗原決定基。

(a)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第14號之白胺酸及第15號之麩胺酸、

(b)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第177號之天

冬胺酸、第178號之甘胺酸、及第179號之精胺酸、

(c)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第180號之異白胺酸及第181號之甲硫胺酸、

(d)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸及第185號之天冬醯胺、

(e)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第187號之白胺酸、第188號之白胺酸及第189號之白胺酸、

(f)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第195號之精胺酸、以及

(g)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第196號之天冬胺酸及第198號之蘇胺酸。

又，作為結合本發明之抗體的抗原決定基中所含之其他胺基酸殘基，若為於本發明之抗體結合於CRTH2上時，存在於序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列上，且實質上識別並結合之胺基酸殘基，則可為任意之胺基酸殘基，具體而言可列舉：與選自由序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第14號之白胺酸、第15號之麩胺酸、第177號之天冬胺酸、第178號之甘胺酸、第179號之精胺酸、第180號之異白胺酸、第181號之甲硫胺酸、第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸、第185號之天冬醯胺、第187號之白胺酸、第188號之白胺酸、第189號之白胺酸、第192號之甘胺酸、第194號之天冬胺酸、第195號之精胺酸、第196號之天冬胺酸、及第198號之蘇胺酸所組成之群中的胺基酸殘基立體結構上近接存在之胺基酸殘基，以及與選自由序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第14號之白胺酸、第15號之麩胺酸、第177號之天冬胺酸、第178號之甘胺酸、第179號之精胺酸、第180號之異白胺酸、第181號之甲硫胺酸、第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸、第185號

之天冬醯胺、第187號之白胺酸、第188號之白胺酸、第189號之白胺酸、第192號之甘胺酸、第194號之天冬胺酸、第195號之精胺酸、第196號之天冬胺酸、及第198號之蘇胺酸所組成之群中的胺基酸之胺基酸殘基1次序列上近接之胺基酸殘基等。

抗體分子亦稱為免疫球蛋白(以下，表記為Ig)，人類抗體根據分子結構之不同而分類為IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及IgM之同型。亦將胺基酸序列之同源性比較高的IgG1、IgG2、IgG3及IgG4總稱為IgG。

抗體分子包含被稱為重鏈(Heavy chain、以下記為H鏈)及輕鏈(Light chain、以下記為L鏈)之多肽。又，H鏈自N末端側起包含H鏈可變區(亦表記為VH)、H鏈固定區(亦表記為CH)之各區，L鏈自N末端側起包含L鏈可變區(亦表記為VL)、L鏈固定區(亦表記為CL)之各區。

CH之每個各亞型分別已知有 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 鏈。CH進而自N末端側起包含CH1區、鉸鏈區、CH2區、CH3區之各區。所謂區，是指構成抗體分子之各多肽之功能性結構單元。又，將CH2區與CH3區合併稱為Fc區或簡稱為Fc。CL已知有C λ 鏈及C κ 鏈。

作為本發明之抗體中之CH，可為屬於Ig之任意者，但適宜的是IgG型者，進而亦可使用屬於IgG型之IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等亞型之任意者。

作為本發明之抗體中之CL之胺基酸序列，可為人類抗體之胺基酸序列或非人類動物抗體之胺基酸序列之任意者，但較佳為人類抗體之胺基酸序列之C κ 或C λ 。

本發明之抗體係識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少一者之胺基酸殘基並與之結合的抗體。

作為本發明之抗體，具體而言可列舉選自下述之(a)~(c)之抗體。

(a)識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸並與之結合的抗體、

(b)識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第194號之天冬胺酸並與之結合的抗體、

(c)識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之兩者並與之結合的抗體。

又，作為本發明之抗體，可列舉識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少1個的胺基酸殘基，且識別選自由序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第14號之白胺酸、第15號之麩胺酸、第177號之天冬胺酸、第178號之甘胺酸、第179號之精胺酸、第180號之異白胺酸、第181號之甲硫胺酸、第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸、第185號之天冬醯胺、第187號之白胺酸、第188號之白胺酸、第189號之白胺酸、第195號之精胺酸、第196號之天冬胺酸及第198號之蘇胺酸所組成之群中的胺基酸殘基之至少1個並與之結合的抗體。

又，作為本發明之抗體，可列舉識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少1個之胺基酸殘基，且識別下述(a)~(g)之至少任一個並與之結合的抗體。

(a)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第12號之脯胺酸、第14號之白胺酸及第15號之麩胺酸、

(b)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第177號之天冬胺酸、第178號之甘胺酸、及第179號之精胺酸、

(c)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第180號之異

白胺酸及第181號之甲硫胺酸、

(d)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第183號之酪胺酸、第184號之酪胺酸及第185號之天冬醯胺、

(e)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第187號之白胺酸、第188號之白胺酸及第189號之白胺酸、

(f)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第195號之精胺酸、及

(g)序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第196號之天冬胺酸及第198號之蘇胺酸。

又，作為本發明之抗體，具體而言可列舉選自下述(a)~(d)之抗體。

(a)VH之互補決定區(complementary determining region；CDR、以下略記為CDR)1~3之胺基酸序列分別包含序列編號20、21及22所表示之胺基酸序列，且VL之CDR1~3之胺基酸序列分別包含序列編號23、24及25所表示之胺基酸序列的抗體、

(b)與上述(a)中所記載之抗體競爭而與人類CRTH2結合的抗體、

(c)與包含結合上述(a)中所記載之抗體之抗原決定基的抗原決定基結合的抗體、及

(d)與結合上述(a)中所記載之抗體之抗原決定基相同的抗原決定基結合的抗體。

本發明之上述(b)之抗體係表示抑制上述(a)之抗體與人類CRTH2之結合的抗人類CRTH2抗體。又，本發明之上述(c)的抗體係表示於將上述(a)中所記載之抗體作為第1抗體、及將結合第1抗體之抗原決定基作為第1抗原決定基之情形時，與包含該第1抗原決定基之抗原決定基結合的抗體。

又，作為本發明之抗體，具體而言可列舉選自下述(a)~(c)之抗

體。

(a)包含如下之VH以及VL之抗體，該VH包含序列編號49所表示之胺基酸序列或導入有選自將序列編號49所表示之胺基酸序列中之第18號之白胺酸置換為甲硫胺酸、第77號之天冬醯胺置換為絲胺酸、第93號之纈胺酸置換為蘇胺酸、及第117號之蘇胺酸置換為纈胺酸之修飾的至少1個修飾之胺基酸序列，該VL包含序列編號33所表示之胺基酸序列或導入有選自將序列編號33所表示之胺基酸序列中之第2號之異白胺酸置換為纈胺酸、第4號之甲硫胺酸置換為白胺酸、第15號之脯胺酸置換為白胺酸、及第85號之丙胺酸置換為脯胺酸之修飾的至少1個修飾之胺基酸序列、

(b)包含含有序列編號49、51、53、55、57及59所表示之胺基酸序列之任一個之VH以及含有序列編號33、35、37、39、41、43、45及47所表示之胺基酸序列之任一個之VL的抗體、以及

(c)包含含有序列編號17所表示之胺基酸序列之VH及含有序列編號19所表示之胺基酸序列之VL的抗體。

作為上述(b)之抗體，較佳為列舉選自以下(1)~(3)之抗體。

(1)包含含有序列編號49所表示之胺基酸序列之VH以及含有序列編號33、35、37、39、41、43、45及47所表示之胺基酸序列之至少1個之VL的抗體、

(2)包含含有序列編號59所表示之胺基酸序列之VH以及含有序列編號33、35、37、39、41、43、45及47所表示之胺基酸序列之至少1個之VL的抗體、以及

(3)包含含有序列編號51、53、55及57所表示之胺基酸序列之至少1個之VH以及含有序列編號33所表示之胺基酸序列之VL的抗體。

作為上述(b)之抗體，特佳為列舉包含含有序列編號51所表示之胺基酸序列之VH及含有序列編號33所表示之胺基酸序列之VL的抗

體。

作為本發明之抗體，可列舉對於將人類CRTH2之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少一者置換為丙胺酸的胺基酸置換體而言，反應性消失之抗體。

又，本發明之抗體包含如下之抗體：於人類CRTH2之配位子之存在下，對人類CRTH2之反應性並不降低之抗體。於人類CRTH2之配位子之存在下，對人類CRTH2之反應性並不降低之抗體，與對人類CRTH2之反應性降低之抗體相比而言，即使於如炎症局部那樣人類CRTH2之配位子高濃度地存在之條件下，亦可顯示出較高之反應性。因此，可非人類CRTH2配位子依賴性地特異性結合於人類CRTH2上，可發揮藥效。

於本發明中，所謂於人類CRTH2之配位子之存在下，抗體之反應性降低，是表示與抗體對於人類CRTH2之配位子非存在下之人類CRTH2表現細胞之反應性相比而言，於人類CRTH2之配位子之存在下之該反應性降低至少5%以上。更嚴格而言表示降低10%以上。

作為人類CRTH2之配位子，若為與人類CRTH2特異性結合者，則包含任意者，但較佳為列舉PGD2或DKPGD2。更佳為列舉DKPGD2。

於本發明中，所謂針對活化狀態或非活化狀態之人類CRTH2之反應性並不變化係指於鳥苷二磷酸(GDP)或GDP類似物或鳥苷三磷酸(GTP)或GTP類似物之存在下與非存在下，抗體對於人類CRTH2之反應性並不變化。

作為GDP類似物，例如可列舉鳥苷 5'-O-(β-硫基)二磷酸(GDPβS)。作為GTP類似物，例如可列舉鳥苷 5'-O-(γ-硫基)三磷酸(GTPγS)。

於本發明之抗體中包含不具有中和活性之抗體、不具有促效劑

活性之抗體、不增強人類CRTH2之配位子之訊息的抗體、或針對活化狀態或非活化狀態之人類CRTH2之反應性並不變化之抗體。

於本發明中，所謂抗體之中和活性係指抗體所具有之抑制人類CRTH2之生物活性之活性。例如是指抑制人類CRTH2與其配位子之結合的活性、或抑制人類CRTH2之訊息傳遞之活性等拮抗劑活性。

於本發明中，所謂促效劑活性係指模仿人類CRTH2之配位子之生物學活性之活性，係指誘導CRTH2之活化及伴有活化之各種反應的活性。作為本發明中之促效劑活性，具體而言可列舉細胞趨化性、細胞之形態變化誘導活性等。

於本發明中，所謂人類CRTH2之配位子之訊息係指伴隨人類CRTH2之配位子與人類CRTH2結合，使人類CRTH2活化之現象之訊息。

人類CRTH2之配位子之訊息及促效劑活性可藉由分析伴有人類CRTH2之活化的各種反應而評價。例如，可藉由分析人類CRTH2表現細胞之形態變化而評價。

作為人類CRTH2表現細胞，若可表現人類CRTH2，則可為任意細胞，例如可列舉嗜酸性球、嗜鹼性球、Th2細胞、2型自然淋巴球(ILC2)、非典型單核球(nonclassical monocyte)、Th2/Th17細胞等。

於本發明中，所謂抗體不增強人類CRTH2之配位子之訊息係指與單獨使人類CRTH2之配位子對於人類CRTH2作用時相比而言，使人類CRTH2之配位子與抗體一同作用時，不增強人類CRTH2之活化及伴有該活化之各種反應。

本發明之抗體包含對於人類CRTH2表現細胞顯示出細胞毒殺活性之抗體。作為本發明中之細胞毒殺活性，可列舉補體依賴性細胞毒殺活性(以下，表記為CDC活性)或抗體依賴性細胞毒殺活性(以下，表記為ADCC活性)等。

作為本發明中之CDC活性，可列舉：與細胞表面上之人類CRTH2結合的抗體分子經由Fc部分而與補體系之C1q結合，其結果C1至C9之各補體成分活化，最終C5至C9於細胞膜上形成被稱為膜侵入複合體之孔形成聚合物而引起細胞溶解之反應[Immunol Today. 1999 Dec;20(12):576-82.]。

作為本發明中之ADCC活性，可列舉：藉由穿孔蛋白或顆粒酶等細胞毒殺性分子之放出或巨噬作用之亢進等所產生之細胞毒殺反應，上述穿孔蛋白或顆粒酶等細胞毒殺性分子之放出或巨噬作用之亢進係由於與細胞表面上之人類CRTH2結合的抗體分子經由Fc部分而對表現Fc受體之例如自然殺手細胞(以下，表記為NK細胞)等進行活化所造成的[Chemical Immunology, 65, 88 (1997); Immunol Today, 20, 576 (1999)]。

本發明之抗體包含不具有對於肥大細胞之細胞毒殺性的抗體。此種抗體具有如下優點：並無由於肥大細胞之毒殺所引起之炎症性媒介物之釋放而造成之副作用的擔憂。

本發明之抗體包含於抗體之Fc區結合有N-糖苷結合糖鏈，於該N-糖苷結合糖鏈之還原末端之N-乙醯葡萄糖胺糖並未結合海藻糖之抗體。作為於抗體之Fc區結合有N-糖苷結合糖鏈，於該N-糖苷結合糖鏈之還原末端之N-乙醯葡萄糖胺糖並未結合海藻糖之抗體，例如可列舉使用 α 1,6-海藻糖轉移酶基因缺損之CHO細胞(國際公開第2005/035586號、國際公開第02/31140號)而製作的抗體。於抗體之Fc區結合有N-糖苷結合糖鏈，於該N-糖苷結合糖鏈之還原末端之N-乙醯葡萄糖胺糖並未結合海藻糖之本發明之抗體具有較高之ADCC活性。

本發明之抗體包含以與Fc受體之結合活性變高之方式對抗體之Fc區之胺基酸殘基進行修飾的抗體。作為以與Fc受體之結合活性變高之方式對抗體之Fc區之胺基酸殘基進行修飾的抗體，例如可列舉藉由

美國專利第7317091號說明書中所記載之方法而製作的抗體分子。

本發明之抗體包含改變包含抗體之可變區的多肽之表面電荷或早期內體內之pH中之抗原結合活性而使血中半衰期延長之抗體。

作為改變包含抗體分子之可變區之多肽之表面電荷或早期內體內之pH中之抗原結合活性而使血中半衰期延長之抗體，例如可列舉藉由日本專利特開2013-165716號公報、日本專利特開2012-021004號公報中所記載之方法而製作的抗體。

本發明之抗體包含人類型嵌合抗體(以下，亦簡記為嵌合抗體)、人類型CDR移植抗體(以下，亦簡記為人類化抗體)及人類抗體等基因重組抗體。

嵌合抗體係指包含人類以外之動物(非人類動物)之抗體之VH及VL與人類抗體之CH及CL之抗體。作為非人類動物，若為小鼠、大鼠、倉鼠、兔等可製作融合瘤者，則可使用任意者。

本發明之嵌合抗體可藉由獲得編碼與人類CRTH2特異性反應之人類以外之動物的抗體之VH及VL的cDNA，分別插入至具有編碼人類抗體之CH及CL之基因的動物細胞用表現載體中，構建嵌合抗體表現載體，導入至動物細胞中而使其表現，進行製造。

人類化抗體係表示將人類以外之動物的抗體之VH及VL之CDR移植至人類抗體之VH及VL之適宜位置而成的抗體。

本發明之人類化抗體可藉由構建編碼將與人類CRTH2特異性反應之人類以外之動物之抗體的VH及VL之CDR移植至任意之人類抗體之VH及VL之構架(以下，表記為FR)中的可變區(以下，亦表記為V區)的cDNA，分別插入至具有編碼CH及CL之DNA的動物細胞用表現載體中，構建人類化抗體表現載體，將該表現載體導入至動物細胞中而使其表現，進行製造。

作為人類抗體之VH及VL之FR之胺基酸序列，若為源自人類抗體

之胺基酸序列，則可使用任意者。例如可列舉登錄至蛋白質資料庫 (Protein Data Bank) 等資料庫中之人類抗體之 VH 及 VL 之 FR 之胺基酸序列、或人類抗體之 VH 及 VL 之 FR 之各亞群之共用胺基酸序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) 等。

於該等胺基酸序列中，缺失、附加、置換或插入有 1 個以上胺基酸，且與人類 CRTH2 特異性結合，且於例如細胞毒殺活性等生物活性中具有同等功能之抗體或該抗體片段亦包含於本發明之抗體中。

本發明之抗體包含與猴 CRTH2 結合之抗體。作為猴 CRTH2，例如可列舉狨猴 CRTH2、食蟹猴 CRTH2 及恆河猴 CRTH2。較佳為列舉食蟹猴 CRTH2。

作為本發明之抗體，Fc 與抗體片段結合之 Fc 融合蛋白質、Fc 與天然存在之配位子或受體結合之 Fc 融合蛋白質 (亦稱為免疫黏附素)、使複數個 Fc 區域融合而成之 Fc 融合蛋白質等亦包含於本發明中。又，包含為了使抗體穩定化或為了控制血中半衰期而進行胺基酸殘基置換之胺基酸殘基修飾的修飾 Fc 區域等亦可用於本發明之抗體中。

於本發明中，所謂抗體片段係包含識別序列編號 2 所表示之人類 CRTH2 之胺基酸序列之第 192 號之甘胺酸及第 194 號之天冬胺酸之至少一者並與之結合的抗原結合區，且具有抗原結合活性之片段。作為本發明之抗體片段，可列舉 Fab、Fab'、F(ab')₂、單鏈 Fv (single chain Fv，以下記為 scFv)、雙功能抗體 (diabody)、dsFv 及包含複數個 CDR 之肽等。

Fab 係藉由蛋白質分解酶木瓜酶對 IgG 進行處理而獲得之片段中 (藉由 H 鏈之第 224 號胺基酸殘基而切斷)，H 鏈之 N 末端側約一半與 L 鏈全體藉由雙硫結合而結合之分子量約 5 萬之具有抗原結合活性之抗體片段。

本發明之Fab可藉由蛋白質分解酶木瓜酶對本發明之與人類CRTH2特異性結合之抗體進行處理而獲得。或者可藉由將編碼該抗體之Fab的DNA插入至原核生物用表現載體或真核生物用表現載體中，將該載體導入至原核生物或真核生物中而使其表現，進行製造。

F(ab')₂係藉由蛋白質分解酶胃蛋白酶對IgG進行處理而獲得之片段中(藉由H鏈之第234號之胺基酸殘基而切斷)，比經由鉸鏈區之雙硫結合而結合有Fab者稍大的，分子量約10萬之具有抗原結合活性之抗體片段。

本發明之F(ab')₂可藉由蛋白質分解酶胃蛋白酶對本發明之與人類CRTH2特異性結合之抗體進行處理而獲得。或者可使下述之Fab'進行硫醚結合或雙硫結合而製作。

Fab'係切斷上述F(ab')₂之鉸鏈區之雙硫結合的分子量約5萬之具有抗原結合活性之抗體片段。

本發明之Fab'可對本發明之與人類CRTH2特異性結合之F(ab')₂組合物進行還原劑二硫蘇糖醇處理而獲得。或者可藉由將編碼該抗體之Fab'片段的DNA插入至原核生物用表現載體或真核生物用表現載體，將該載體導入至原核生物或真核生物而使其表現，進行製造。

scFv係使用適當之肽連結子(P)而連結有1根VH與1根VL之VH-P-VL或VL-P-VH多肽，其係具有抗原結合活性之抗體片段，上述肽連結子(P)係任意個數之包含4個Gly及1個Ser殘基之連結子(G4S)連結而成之連結子肽等。

本發明之scFv可藉由獲得編碼本發明之與人類CRTH2特異性結合之抗體之VH及VL的cDNA，構建編碼scFv之DNA，將該DNA插入至原核生物用表現載體或真核生物用表現載體中，將該表現載體導入至原核生物或真核生物中而使其表現，進行製造。

雙功能抗體(diabody)係scFv二聚物化之抗體片段，其係具有二價

之抗原結合活性之抗體片段。二價之抗原結合活性可相同，亦可設為其中一者不同之抗原結合活性。

本發明之雙功能抗體(diabody)可藉由獲得編碼本發明之與人類CRTH2特異性結合之抗體之VH及VL的cDNA，以P之胺基酸序列之長度成為8殘基以下之方式構建編碼scFv之DNA，將該DNA插入至原核生物用表現載體或真核生物用表現載體中，將該表現載體導入至原核生物或真核生物中而使其表現，進行製造。

dsFv係指將VH及VL中之各1個胺基酸殘基置換為半胱胺酸殘基的多肽經由該半胱胺酸殘基間之雙硫結合而結合而成者。置換為半胱胺酸殘基之胺基酸殘基可依照由Reiter等人所揭示之方法(Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)，基於抗體之立體結構預測而選擇。

本發明之dsFv可藉由獲得編碼本發明之與人類CRTH2特異性結合之抗體之VH及VL的cDNA，構建編碼dsFv之DNA，將該DNA插入至原核生物用表現載體或真核生物用表現載體中，將該表現載體導入至原核生物或真核生物中而使其表現，進行製造。

包含CDR之肽係包含VH或VL之CDR之至少1個區以上而構成。包含複數個CDR之肽可直接或經由適當之肽連結子而結合。

包含本發明之CDR之肽可藉由構建編碼本發明之與人類CRTH2特異性結合之抗體之VH及VL之CDR的DNA，將該DNA插入至原核生物用表現載體或真核生物用表現載體中，將該表現載體導入至原核生物或真核生物中而使其表現，進行製造。

又，包含CDR之肽亦可藉由Fmoc法(芴基甲氧基羰基法)、tBoc法(第三丁氧基羰基法)等化學合成法而製造。

於構成上述抗體或該抗體片段之胺基酸序列中，缺失、置換、插入或附加有1個以上胺基酸、且具有與上述之抗體或該抗體片段同樣之活性的單株抗體或該抗體片段亦包含於本發明之抗體或該抗體片

段中。缺失、置換、插入或附加之胺基酸數為1個以上，其個數並無特別限定，其係根據分子選殖第2版、分子生物學之電流操作說明、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)等中所記載之定點突變導入法等周知之技術而可缺失、置換或附加之程度之個數，例如為1~數十個，較佳為1~20個，更佳為1~10個，進而較佳為1~5個。

於本發明之人類CRTH2或抗體之胺基酸序列中缺失、置換、插入或附加1個以上胺基酸殘基係表示於同一序列中之任意且1個或複數個胺基酸序列中存在有1個或複數個胺基酸殘基之缺失、置換、插入或附加，缺失、置換、插入或附加可同時產生，置換、插入或附加之胺基酸殘基無論為天然型與非天然型均可。

作為天然型胺基酸殘基，例如可列舉L-丙胺酸、L-天冬醯胺、L-天冬醯胺、L-麩醯胺、L-麩醯胺酸、甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-白胺酸、L-離胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、L-半胱胺酸等。

以下表示可相互置換之胺基酸殘基之較佳例。同一群中所含之胺基酸殘基可相互置換。

A群：白胺酸、異白胺酸、甘白胺酸、纈胺酸、正纈胺酸、丙胺酸、2-胺基丁酸、甲硫胺酸、O-甲基絲胺酸、第三丁基甘胺酸、第三丁基丙胺酸、環己基丙胺酸

B群：天冬胺酸、麩胺酸、異天冬胺酸、異麩胺酸、2-胺基己二酸、2-胺基辛二酸

C群：天冬醯胺、麩醯胺

D群：離胺酸、精胺酸、鳥胺酸、2,4-二胺基丁酸、2,3-二胺基丙酸

E群：脯胺酸、3-羥基脯胺酸、4-羥基脯胺酸

F群：絲胺酸、蘇胺酸、高絲胺酸

G群：苯丙胺酸、酪胺酸

作為本發明之轉形體，若為將編碼與人類CRTH2特異性結合之抗體分子的DNA導入至宿主細胞而獲得之轉形體，且該轉形體係生產本發明之抗體之轉形體，則可包含任意之轉形體。作為具體例，可列舉將編碼與人類CRTH2特異性結合之抗體分子的DNA導入至以下之

(a)~(i)等宿主細胞中而獲得之轉形體作為較佳例。

(a)源自中國倉鼠卵巢組織之CHO細胞；

(b)大鼠骨髓瘤細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；

(c)小鼠骨髓瘤細胞株NS0細胞；

(d)小鼠骨髓瘤細胞株SP2/0-Ag14細胞；

(e)敘利亞倉鼠腎臟組織由來BHK細胞；

(f)產生抗體之融合瘤細胞；

(g)人類白血病細胞株那馬瓦細胞(Namalwa cell)；

(h)胚胎幹細胞；

(i)受精卵細胞。

又，作為生產於抗體之Fc區結合N-糖苷結合糖鏈、於該N-糖苷結合糖鏈之還原末端之N-乙醯葡萄糖胺糖並未結合海藻糖之抗體的本發明之轉形體，可列舉將編碼與人類CRTH2特異性結合之抗體分子的DNA導入至藉由國際公開第2005/035586號、國際公開第02/31140號中所記載之方法而製作的糖轉移酶降低或缺損之宿主細胞中而獲得之轉形體作為較佳例。

作為本發明之抗體或該抗體片段之製造法，若為培養生產本發

明之抗體或該抗體片段的轉形體之製造方法，則可包含任意之抗體製造方法，作為較佳例，可列舉培養生產本發明之抗體或該抗體片段的轉形體，於培養物中生成、蓄積抗體或該抗體片段，採取該抗體或該抗體片段而進行純化之抗體或該抗體片段之製造方法。

亦可列舉藉由上述製造法而製造之抗體或該抗體片段作為本發明之抗體或該抗體片段。

作為本發明之組合物，若為包含本發明之抗體或該抗體片段之組合物則可為任意組合物，可為包含與抗體結合的糖鏈單一之抗體分子的組合物、或者包含具有複數個糖鏈結構之抗體分子的組合物。又，亦可為包含適當之添加劑、緩衝劑等的組合物。作為本發明之組合物，較佳為列舉含有本發明之抗體或該抗體片段作為有效成分之醫藥、診斷藥等。

作為本發明之醫藥或診斷藥，若為含有本發明之抗體或該抗體片段作為有效成分之醫藥或診斷藥，則可含有任何醫藥或診斷藥。作為較佳例，可列舉與人類CRTH2表現細胞相關聯之疾病之醫藥或診斷藥。

作為本發明之治療方法，若為投入有效量之本發明之抗體或該抗體片段的治療方法，則包含任意之治療方法，較佳為列舉與人類CRTH2表現細胞相關聯之疾病之治療方法。

作為本發明之抗體或該抗體片段之用途，若為用以製造與人類CRTH2表現細胞相關聯之疾病之治療藥的本發明之抗體或該抗體片段之用途，則可包含任意之抗體或該抗體片段之用途。又，本發明之抗體或該抗體片段可用於與人類CRTH2表現細胞相關之障礙或疾病之治療及預防之至少一者中。

作為與人類CRTH2表現細胞相關之障礙或疾病，並無限定，例如可列舉過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進

之至少一者的疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者的疾病以及伴有ILC2增多及功能亢進之至少一者的疾病等。

更具體而言，例如可列舉包含如下者之炎症性或過敏性疾病及狀態：過敏性或非過敏性鼻炎或鼻竇炎、慢性鼻竇炎或鼻炎、鼻息肉、伴有鼻息肉之慢性鼻竇炎、抗酸球性鼻竇炎、急性鼻竇炎、哮喘、小兒哮喘、過敏性支氣管炎、肺泡炎、農夫病 (Farmer's disease)、過敏性呼吸道感染、例如由於細菌或病毒或蠕蟲或真菌或原生動物及其他病原所引起之過敏性結膜炎、支氣管炎或肺炎、支氣管擴張症、成人呼吸促迫症候群、支氣管及肺水腫、由於各種起源、例如毒氣、蒸氣之吸收、吸入所引起之支氣管炎或肺炎或間質性肺炎、心衰竭、由於X射線、放射線、化學療法所引起之支氣管炎或肺炎或間質性肺炎、膠原病、例如與紅斑狼瘡、全身性硬皮病相關聯之支氣管炎或肺炎或間質性肺炎、肺纖維化症、特發性肺纖維化症 (IPF)、各種起源之間質性肺病或間質性肺炎、例如石綿入肺病、矽肺病、m.Boeck或類肉瘤病、肉芽腫病、囊腫性纖維化病或黏液黏稠病、或 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症、嗜酸性球性橙皮脂肪(例如Well症候群)、嗜酸性球性肺炎(例如Loeffler症候群、慢性嗜酸性球性肺炎)、嗜酸性球性筋膜炎(例如Shulman症候群)、抗酸球性食道炎、抗酸球增加症候群、遲發型過敏、非過敏性哮喘、運動誘發性支氣管收縮；慢性阻塞性肺病(COPD)、急性支氣管炎、慢性支氣管炎、肺氣腫；全身性過敏反應或過敏性反應、藥物過敏(例如對於青黴素、頭孢菌素)、由於污染色胺酸之攝取所造成之嗜酸性球增多肌痛症候群、昆蟲咬傷過敏；自體免疫疾病、例如關節風濕病、牛皮癬性關節炎、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡、重症肌無力症、免疫性血小板減少症(成人ITP、新生兒血小板減少症、小兒ITP)、免疫性溶血性貧血(自體免疫及藥物誘發)、Evans症候群(血小板及紅血球免疫性血球減少

症)、新生兒之Rh病、Goodpasture症候群(抗GBM病)、乳糜瀉(Celiac)、自體免疫性心肌症、幼年發病糖尿病；絲球體腎炎、自體免疫性甲狀腺炎、白塞氏病；移植物排斥(例如於移植中)、例如同種移植物排斥或移植物抗宿主病；炎症性腸病、例如克隆氏病及潰瘍性結腸炎；脊椎關節症；硬皮病；牛皮癬(包含T細胞媒介牛皮癬)及炎症性皮膚病、例如皮膚炎、濕疹、異位性皮膚炎、過敏性接觸性皮膚炎、蕁麻疹(例如慢性突發性、慢性自發性、物理性蕁麻疹)、大水疱性天皰瘡樣病；血管炎(例如壞死性、皮膚性、肉芽腫性及過敏性血管炎、抗酸球性多發血管炎性肉芽腫病)；結節性紅斑；嗜酸性球性肌炎、嗜酸性球性肌膜炎、伴有皮膚或器官之白血球浸潤之癌。

作為人類CRTH2表現細胞相關之障礙或疾病，較佳為列舉哮喘、小兒哮喘、慢性阻塞性肺病、異位性皮膚炎、過敏性鼻炎及急性或慢性鼻竇炎。

含有本發明之抗體或該抗體片段、或該等之衍生物的醫藥可為僅包含作為有效成分之該抗體或該抗體片段、或該等之衍生物者，但通常與藥理學上所容許之1種以上載體一起混合，作為藉由在製藥學之技術領域中所公知之方法而製造的醫藥製劑而提供。

作為投予路徑，例如可列舉經口投予或口腔內、呼吸道內、直腸內、皮下、肌內、靜脈內、或腹腔內等非經口投予。作為投予形態，例如可列舉噴霧劑、膠囊劑、片劑、散劑、顆粒劑、糖漿劑、乳劑、栓劑、注射劑、軟膏、或貼劑等。

作為適合經口投予之製劑，例如可列舉乳劑、糖漿劑、膠囊劑、片劑、散劑、或顆粒劑等。

本發明之抗體包含於本發明之抗體或其抗體片段上化學性或基因工程性結合有射性同位元素、低分子藥劑、高分子藥劑、蛋白質、核酸等之抗體衍生物。

於將抗體之衍生物用作治療方法、預防方法、治療藥或治療藥之情形時，作為與本發明之抗體或其抗體片段結合之藥劑，可列舉化學治療劑、抗體醫藥、免疫活化劑、高分子藥劑等。作為蛋白質，可列舉細胞激素、生長因子、毒素蛋白質等。作為核酸，可列舉誘餌(decoy)、反義、siRNA、miRNA等。

於將抗體之衍生物用作檢測方法、定量方法、檢測用試劑、或定量用試劑之情形時，作為與本發明之抗體或其抗體片段結合之藥劑，可列舉通常之免疫學檢測或測定法中所使用之標記物。

本發明中之抗體之衍生物係藉由化學方法[抗體工程入門、地人書館(1994)中所記載之方法等]，使放射性同位元素、低分子藥劑、高分子藥劑、蛋白質等結合於本發明之抗體或其抗體片段之H鏈或L鏈之N末端側或C末端側、抗體或其抗體片段中之適當之取代基或側鏈、進而抗體或該抗體片段中之糖鏈等上而製造。

又，本發明中之抗體之衍生物可藉由如下之基因工程方法而製造：使本發明之抗體或抗體片段與編碼DNA連結，使所欲結合之蛋白質與編碼DNA連結而插入至表現載體中，將該表現載體導入至適當之宿主細胞中而使其表現。

作為放射性同位元素，例如可列舉 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 、或 ^{211}At 等。放射性同位元素可藉由氫胺T法等而與抗體直接結合。又，亦可使螯合有放射性同位元素之物質與抗體結合。作為螯合劑，例如可列舉1-異硫氰酸苄酯-3-甲基二仲乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)等。

作為低分子藥劑，例如可列舉吡啶鎊酯或咯吩等發光物質、或螢光素異硫氰酸鹽(FITC)或異硫氰酸四甲基羅丹明(RITC)等螢光物質等。

作為使低分子藥劑與抗體結合之方法，例如可列舉經由戊二醛

而使藥劑與抗體之胺基結合之方法、或經由水溶性碳二醯亞胺而使藥劑之胺基與抗體之羧基結合之方法等。

作為高分子藥劑，例如可列舉聚乙二醇(以下，表記為PEG)、白蛋白、聚葡萄糖、聚氧乙烯、苯乙烯馬來酸共聚物、聚乙烯吡咯啉酮、吡喃共聚物、或經丙基甲基丙烯醯胺等。

所謂免疫學檢測或測定方法係使用實施了表記之抗原或抗體，檢測或測定抗體量或抗原量之方法。作為免疫學檢測或測定方法，可列舉放射性物質標記免疫抗體法(RIA)、酶免疫測定法(EIA或ELISA)、螢光免疫測定法(FIA)、發光免疫測定法(luminescent immunoassay)、西方點墨法或物理化學之方法等。

藉由使用本發明之抗體或該抗體片段，依照上述方法而檢測或測定表現人類CRTH2之細胞，可診斷與人類CRTH2相關聯之疾病。

作為於本發明中成為檢測或測定人類CRTH2之對象之生物試樣，若為組織細胞、血液、血漿、血清、胰液、尿、糞便、組織液、肺泡清洗液或培養液等存在含有分泌至細胞外之人類CRTH2或包含其一部分之肽片段、或表現人類CRTH2之細胞之可能性者，則並無特別限定。

含有本發明之抗體或其抗體片段、或該等之衍生物的診斷藥亦可根據目標診斷法而包含用以進行抗原抗體反應之試劑、該反應之檢測用試劑。作為用以進行抗原抗體反應之試劑，可列舉緩衝劑、鹽等。作為檢測用試劑，可列舉識別該抗體或其抗體片段、或該等之衍生物之進行了標記之二次抗體、或與表記對應之受質等通常之免疫學檢測或測定法中所使用之試劑。

以下，關於本發明之抗體之製造方法、疾病之治療方法、及疾病之診斷方法而加以具體說明。

1.抗體之製造方法

(1) 抗原之製備

成為抗原之人類CRTH2或表現人類CRTH2之細胞可藉由如下方式獲得：將包含編碼人類CRTH2全長或其部分長度之cDNA的表現載體導入至大腸桿菌、酵母、昆蟲細胞、或動物細胞等中。

又，亦可藉由如下方式獲得自大量表現人類CRTH2之各種人類培養細胞、人類組織等而純化人類CRTH2。又，亦可將該培養細胞、或該組織等直接作為抗原而使用。進而亦可藉由Fmoc法、或tBoc法等化學合成法而製備具有人類CRTH2之部分序列的合成肽，於抗原中使用。

於人類CRTH2或具有人類CRTH2之部分序列之合成肽上，亦可於C末端或N末端附加FLAG或His等公知之標籤。

本發明中所使用之人類CRTH2可使用Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)或Current Protocols in molecular Biology、John Wiley & Sons (1987-1997)等中所記載之方法等，藉由例如以下之方法使編碼該人類CRTH2之DNA於宿主細胞中表現，進行製造。

首先，將包含編碼人類CRTH2之部分的全長cDNA插入至適當之表現載體之啟動子之下游，藉此製作重組載體。亦可使用基於全長cDNA而製備的包含編碼多肽之部分的適當長度之DNA片段而代替上述全長cDNA。其次，藉由將所獲得之該重組載體導入至適合該表現載體之宿主細胞中，可獲得生產多肽之轉形體。

作為表現載體，若為可於所使用之宿主細胞中自主複製或併入至染色體中，於可轉錄編碼多肽之DNA的位置含有適當之啟動子者，則可使用任意者。

作為宿主細胞，若為屬於大腸桿菌等埃希菌屬等之微生物、酵母、昆蟲細胞、或動物細胞等可表現目標基因者，則可使用任意者。

於將大腸桿菌等原核生物作為宿主細胞而使用之情形時，重組載體較佳為可於原核生物中自主複製，同時包含啟動子、核糖體結合序列、含有編碼人類CRTH2之部分的DNA、及轉錄終止序列的載體。

又，於該重組載體中未必需要轉錄終止序列，但較佳為於結構基因之正下方配置轉錄終止序列。進而，於該重組載體中亦可包含控制啟動子之基因。

作為該重組載體，較佳為使用將作為核糖體結合序列之 Shine-Dalgarno 序列(亦稱為SD序列)與起始密碼子之間調節為適當之距離(例如6~18鹼基)之質體。

又，作為編碼該人類CRTH2之DNA之鹼基序列，可以成為最適合宿主內之表現之密碼子之方式置換鹼基，藉此可使目標之人類CRTH2之生產率提高。

作為表現載體，若為可於所使用之宿主細胞中發揮功能者，則可使用任意者，例如可列舉pBTrp2、pBTac1、pBTac2(以上為羅氏醫學儀器(Roche Diagnostics)公司)、pKK233-2(Pharmacia公司)、pSE280(Invitrogen公司)、pGEMEX-1(Promega公司)、pQE-8(基亞源(Qiagen)公司)、pKYP10(日本專利特開昭58-110600號公報)、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry、48、669(1984)]、pLSA1[Agric Biol. Chem.、53、277(1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)(Stratagène公司)、pTrs30[由大腸桿菌JM109/pTrS30(FERM BP-5407)而製備]、pTrs32[由大腸桿菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)製備]、pGHA2[由大腸桿菌IGHA2(FERM BP-400)製備、日本專利特開昭60-221091號公報]、pGKA2[由大腸桿菌IGKA2(FERM BP6798)製備、日本專利特開昭60-221091號公報]、pTerm2(美國專利第4686191號說明書、美國專利第4939094號說明書、美國專利第5160735號說明書)、pSupex、

pUB110、pTP5、pC194、pEG400[J.Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX(Pharmacia公司)、pET系統(Novagen公司)、或pME18SFL3等。

作為啟動子，若為可於所使用之宿主細胞中發揮功能者，則可為任意者。例如可列舉trp啟動子(Ptrp)、lac啟動子、PL啟動子、PR啟動子、或T7啟動子等源自大腸桿菌或噬菌體等之啟動子。又，亦可使用串聯有2個Ptrp之串聯啟動子、tac啟動子、lacT7啟動子、或letI啟動子等人為性設計修飾之啟動子等。

作為宿主細胞，例如可列舉大腸桿菌XL-1Blue、大腸桿菌XL2-Blue、大腸桿菌DH1、大腸桿菌MC1000、大腸桿菌KY3276、大腸桿菌W1485、大腸桿菌JM109、大腸桿菌HB101、大腸桿菌No.49、大腸桿菌W3110、大腸桿菌NY49、或大腸桿菌DH5 α 等。

作為於宿主細胞中導入重組載體之方法，若為可於所使用之宿主細胞中導入DNA之方法，則可使用任意者，例如可列舉使用鈣離子之方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972); Gene, 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]。

於使用動物細胞作為宿主之情形時，作為表現載體，若為可於動物細胞中發揮功能者，則可使用任意者，例如可列舉pcDNA I、pcDM8(舟越公司)、pAGE107[日本專利特開平03-22979號公報；Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3(日本專利特開平02-227075號公報)、pcDM8[Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA I/Amp(Invitrogen公司)、pcDNA3.1(Invitrogen公司)、pREP4(Invitrogen公司)、pAGE103[J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93(國際公開第97/10354號)、N5KG1val(美國專利第6001358號說明書)、INPEP4(Biogen-IDEC公司)及轉位子載體(國際公開第2010/143698號)等。

作為啟動子，若為可於動物細胞中發揮功能者，則可使用任意

者，例如可列舉巨細胞病毒(CMV)之即刻早期(immediate early, 'IE) 基因之啟動子、SV40之初始啟動子、反轉錄病毒之啟動子、金屬硫蛋白啟動子、熱震啟動子、SR α 啟動子、或Moloney小鼠白血病毒之啟動子或促進子。又，亦可將人類CMV之IE基因之促進子與啟動子一同使用。

作為宿主細胞，例如可列舉人類白血病細胞Namalwa細胞、猴細胞COS細胞、中國倉鼠卵巢細胞CHO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)]、CHO/DG44、CHO-K1(ATCC編號：CCL-61)、DUkXB11(ATCC編號：CCL-9096)、Pro-5(ATCC編號：CCL-1781)、CHO-S(Life Technologies、Cat # 11619)、Pro-3、大鼠骨髓瘤細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(或者亦稱為YB2/0)、小鼠骨髓瘤細胞NS0、小鼠骨髓瘤細胞SP2/0-Ag14、敘利亞倉鼠細胞BHK或HBT5637(日本專利特開昭63-000299號公報)等。

作為於宿主細胞中導入重組載體之方法，若為可於動物細胞中導入DNA之方法，則可使用任意者。例如可列舉電穿孔法[*Cytotechnology*、3、133(1990)]、磷酸鈣法(日本專利特開平02-227075號公報)、或脂轉染法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413(1987)]等。

可於培養基中培養保有如上所述而獲得之重組載體(該重組載體併入有編碼人類CRTH2之DNA)之源自微生物、或動物細胞等之轉形體，於培養物中生成、蓄積該人類CRTH2，自該培養物進行採取，藉

此而製造人類CRTH2。於培養基中培養該轉形體之方法可依照宿主之培養中所使用之通常之方法而進行。

於藉由源自真核生物之細胞而表現之情形時，可獲得附加有糖或糖鏈之人類CRTH2。

於培養藉由使用誘導性啟動子之重組載體而進行轉形之微生物時，亦可視需要將誘導物添加於培養基中。例如於培養藉由使用lac啟動子之重組載體而進行轉形之微生物之情形時，亦可將異丙基- β -D-硫代半乳呔喃糖苷等添加於培養基中，於培養藉由使用trp啟動子之重組載體而進行轉形之微生物之情形時，亦可將吲哚丙烯酸等添加於培養基中。

作為培養以動物細胞為宿主而獲得之轉形體之培養基，例如可列舉一般所使用之RPMI1640培養基[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、Eagle之MEM培養基[Science, 122, 501(1952)]、杜爾貝科改良MEM培養基[Virology, 8, 396(1959)]、199培養基[Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1(1950)]、Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)培養基、或於該等培養基中添加有胎牛血清(FBS)等之培養基等。培養通常於pH值6~8、30~40°C、5% CO₂之存在下等條件下進行1~7日。又，於培養中，亦可視需要將康黴素或青黴素等抗生素添加於培養基中。

作為編碼人類CRTH2之基因之表現方法，除了直接表現以外，可使用分泌生產或融合蛋白質表現等方法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]。

作為人類CRTH2之生產方法，存在有於宿主細胞內生產之方法、分泌至宿主細胞外之方法、或於宿主細胞外膜上生產之方法，可藉由改變所使用之宿主細胞、或所生產之人類CRTH2之結構而選擇適

宜之方法。

於宿主細胞內或宿主細胞外膜上生產人類CRTH2之情形時，可藉由使用Paulsson等人之方法[J. Biol. Chem., 264, 17619(1989)]、Lowe等人之方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本專利特開平05-336963號公報、或國際公開第94/23021號等中所記載之方法，使人類CRTH2積極地分泌至宿主細胞外。

又，亦可利用使用有二氫葉酸還原酶基因等之基因擴增系(日本專利特開平02-227075號公報)而使人類CRTH2之生產量上升。

所獲得之人類CRTH2例如可如下所述進行而單離、純化。於人類CRTH2於細胞內以溶解狀態而表現之情形時，於培養結束後藉由離心分離而回收細胞，懸浮於水系緩衝液中之後，使用超音波破碎機、法式壓碎機、Manton Gaulin均質機、或球磨機等而使細胞破碎，獲得無細胞提取液。

可單獨或組合使用通常之蛋白質之單離純化法，即溶劑提取法、利用硫酸銨等之鹽析法、除鹽法、利用有機溶劑之沈澱法、使用二乙基胺基乙基(DEAE)-瓊脂糖凝膠、DIAION HPA-75(三菱化學公司)等樹脂之陰離子交換層析法、使用S-Sepharose FF(Pharmacia公司)等樹脂之陽離子交換層析法、使用丁基瓊脂糖凝膠、苯基瓊脂糖凝膠等樹脂之疏水性層析法、使用分子篩之凝膠過濾法、親和層析法、層析聚焦法、或等電點電泳等電泳法等方法，自藉由對上述無細胞提取液進行離心分離而獲得之上清液獲得純化標本。

人類CRTH2於細胞內形成不溶體而進行表現之情形時，可與上述同樣地對細胞進行回收後破碎，進行離心分離，藉此作為沈澱組分而回收該人類CRTH2之不溶體。藉由蛋白質變形劑對所回收之該人類CRTH2之不溶體進行可溶化。藉由對該可溶化液進行稀釋或透析，使

該人類CRTH2返回至正常之立體結構後，藉由與上述同樣之單離純化法而獲得多肽之純化標本。

於人類CRTH2或其糖修飾體等衍生物分泌至細胞外之情形時，於培養上清液中回收該人類CRTH2或其糖修飾體等衍生物。可與上述同樣地藉由離心分離等方法對該培養物進行處理而獲得可溶性組分，藉由使用與上述同樣之單離純化法而自該可溶性組分獲得純化標本。

又，於本發明中所使用之人類CRTH2亦可藉由Fmoc法、或tBoc法等化學合成法而製造。又，亦可利用Advanced Chemtec公司、珀金埃爾默公司、Pharmacia公司、Protein Technology Instrument公司、Synthecell-Vega公司、PerSeptive公司、或島津製作所公司等之肽合成機而化學合成。

(2)動物之免疫與融合用抗體產生細胞之製備

於3~20週齡之小鼠、大鼠或倉鼠等動物中，對(1)中所獲得之抗原進行免疫，採取該動物之脾臟、淋巴結、末梢血液中之抗體產生細胞。又，於免疫原性較低，且於上述動物中未發現充分之抗體效價上升之情形時，亦可使用人類CRTH2基因剔除小鼠作為被免疫動物。

免疫係藉由如下方式而進行：於動物之皮下、尾根部、靜脈內或腹腔內，與例如傅氏完全佐劑、或氫氧化鋁凝膠與百日咳菌疫苗等適當之佐劑一同投予抗原。於抗原為部分肽之情形時，與BSA(牛血清白蛋白)、或KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin，匙孔螺血氫蛋白)等載體蛋白質製作偶聯物，將其用作免疫原。

抗原之投予係於第1次之投予後，每隔1~2週而進行1~10次。於各投予後第3~7日，自眼底靜脈叢或尾靜脈進行採血，使用酶免疫測定法 [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]等而測定該血清之抗體效價。將對於免疫中所使用之抗原，其血清顯示充分之抗體效價之動物作為融合用抗體產生細胞

之供給源。

於抗原之最終投予後第3~7日，自免疫之動物摘出脾臟等含有抗體產生細胞之組織，採取抗體產生細胞。於使用脾臟細胞之情形時，將脾臟切碎、使其解散後進行離心分離，進行除去紅血球而獲得融合用抗體產生細胞。

(3)骨髓瘤細胞之製備

作為骨髓瘤細胞，使用自小鼠獲得之培養細胞株，例如使用耐8-氮鳥嘌呤性小鼠(源自BALB/c)骨髓瘤細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1(1978)]、P3-NS1/1Ag41(NS-1)[European J. Immunology, 6, 511(1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2)[Nature, 276, 269(1978)]、P3-X63-Ag8653(653)[J. Immunology, 123, 1548(1979)]、或P3-X63-Ag8(X63)[Nature, 256, 495(1975)]等。

該骨髓瘤細胞係藉由正常培養基[加入有麩醯胺、2-巰基乙醇、慶大黴素、FBS、及8-氮鳥嘌呤之RPMI1640培養基]進行繼代，於細胞融合之3~4日前於正常培養基中進行繼代，確保融合當日為 2×10^7 個以上之細胞數。

(4)細胞融合與單株抗體產生融合瘤之製備

藉由MEM (Minimum Essential Medium, 最低必需培養基)培養基或PBS(磷酸氫鈉1.83 g、磷酸二氫鉀0.21 g、氯化鈉7.65 g、蒸餾水1升、pH值7.2)對(2)中所獲得之融合用抗體產生細胞與(3)中所獲得之骨髓瘤細胞進行充分清洗，以細胞數成為融合用抗體產生細胞：骨髓瘤細胞=5~10:1之方式加以混合，進行離心分離後將上清液除去。

使沈澱之細胞群充分解散後，於37°C下一面攪拌一面加入聚乙二醇-1000(PEG-1000)、MEM培養基及二甲基亞砷之混合液。進而，每隔1~2分鐘地加入數次MEM培養基1~2 mL後，加入MEM培養基

以使總量成為50 mL。進行離心分離後將上清液除去。

使沈澱之細胞群緩緩地解散後，於融合用抗體產生細胞中，於HAT培養基[加入有次黃嘌呤、胸苷、及胺喋呤之正常培養基]中緩緩地懸浮細胞。將該懸浮液於37°C、5% CO₂之恆溫箱中培養7~14日。

於培養後，抽取培養上清液之一部分，藉由對於後述之人類CRTH2表現細胞的反應性分析等融合瘤之選擇方法，使其與含有人類CRTH2之抗原反應，選擇不與不含人類CRTH2之抗原反應的細胞群。其次，藉由限制稀釋法反覆進行2次選殖[第1次使用HT培養基(自HAT培養基除去胺喋呤之培養基)、第2次使用正常培養基]，選擇穩定地發現較強之抗體效價者作為單株抗體產生融合瘤。

(5)純化單株抗體之製備

對於進行了姥鯨烷處理[將2,6,10,14-四甲基十五烷(Pristane)0.5 mL投予至腹腔內，飼養2週]之8~10週齡之小鼠或裸小鼠，將(4)中所獲得之單株抗體產生融合瘤注射至腹腔內。於10~21日融合瘤進行腹水癌化。自該小鼠採取腹水，進行離心分離而將固形物成分除去後，藉由40~50%硫酸銨進行鹽析，進行利用辛酸沈澱法、DEAE-瓊脂糖凝膠管柱、蛋白質A-管柱或凝膠過濾管柱之純化，收集IgG或IgM組分作為純化單株抗體。

又，亦可藉由添加有10%FBS添加之RPMI1640培養基等對(4)中所獲得之單株抗體產生融合瘤進行培養後，藉由離心分離將上清液除去，使其懸浮於融合瘤(Hybridoma)-SFM培養基中而進行3~7日之培養。對所獲得之細胞懸浮液進行離心分離，藉由所獲得之上清液而進行利用蛋白質A-管柱或蛋白質G-管柱之純化，收集IgG組分而獲得純化單株抗體。再者，亦可於融合瘤(Hybridoma)-SFM培養基中添加5%Daigo's GF21。

抗體之亞型之確定係使用亞型鑑定套組並藉由酶免疫測定法進

行。蛋白量之定量係藉由洛利(Lowry)法或280 nm之吸光度而算出。

(6)單株抗體之選擇

單株抗體之選擇可如下所示，利用流式細胞儀分析針對表現人類CRTH2之細胞的反應性而進行。

作為表現人類CRTH2之細胞，例如可列舉(1)中所獲得之將包含編碼人類CRTH2之cDNA的表現載體導入至動物細胞等中而獲得之基因導入細胞，或人類之嗜酸性球、嗜鹼性球、Th2、ILC2、非典型單核球(non classical monocyte)及Th2/Th17細胞等。

將細胞分注至96孔板等板中，然後分注作為第1抗體之血清、融合瘤之培養上清液或純化單株抗體等被試驗物質而使其反應。藉由包含1~10%之BSA (bovine serum albumin, 牛血清白蛋白)之PBS(以下記為BSA-PBS)等對反應後之細胞進行充分清洗後，分注作為第2抗體之藉由螢光試劑等進行標記之抗免疫球蛋白抗體而使其反應。藉由BSA-PBS等進行充分清洗後，使用流式細胞儀而測定標記化抗體之螢光量，藉此選擇對於表現細胞而特異性反應之單株抗體。

又，與本發明之單株抗體競爭而與人類CRTH2結合之單株抗體可藉由在上述使用流式細胞儀之結合反應檢測系中添加受檢抗體，使其反應而獲得。

即，藉由篩選於加入受檢抗體時抑制本發明之單株抗體之結合的抗體，可獲得關於與人類CRTH2之胺基酸序列、或其立體結構之結合，與本發明中所獲得之單株抗體進行競爭之單株抗體。

進而，與抗原決定基(該抗原決定基係與識別與本發明之人類CRTH2之胺基酸序列、或其立體結構結合之單株抗體的抗原決定基相同者)結合之抗體可藉由如下方式獲得：藉由上述使用流式細胞儀之結合反應檢測系而鑑定所獲得之抗體之抗原決定基，製作所鑑定之抗原決定基之部分性合成肽、或擬態抗原決定基之立體結構的合成肽

等，並進行免疫。

2. 基因重組抗體之製作

作為基因重組抗體之製作例，於以下表示人類型嵌合抗體及人類化抗體之製作方法。

(1) 基因重組抗體表現用載體之構建

基因重組抗體表現用載體係併入有編碼人類抗體之CH及CL的DNA之動物細胞用表現載體，可藉由在動物細胞用表現載體中分別選殖編碼人類抗體之CH及CL的DNA而進行構建。

人類抗體之C區可使用任意之人類抗體之CH及CL。例如使用人類抗體之 $\gamma 1$ 亞型之CH及 κ 型之CL等。於編碼人類抗體之CH及CL之DNA中使用cDNA，但亦可使用包含外顯子與內含子之染色體DNA。

於動物細胞用表現載體中，若為可併入編碼人類抗體之C區之基因而表現者，則可使用任意者。例如使用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)]、或pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol., 13, 79(1993)]等。

於動物細胞用表現載體中之啟動子與促進子中，使用SV40之初始啟動子[J. Biochem., 101, 1307(1987)]、Moloney小鼠白血病病毒LTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960(1987)]、或免疫球蛋白H鏈之啟動子[Cell, 41, 479(1985)]與促進子[Cell, 33, 717(1983)]等。

於基因重組抗體表現用載體中，自基因重組抗體表現載體之構建之容易性、導入至動物細胞中之容易性、於動物細胞內之抗體H鏈及L鏈之表現量之平衡均衡等方面考慮，可使用抗體H鏈及L鏈存在於同一載體上之類型(串聯型)之基因重組抗體表現用載體[J. Immunol.

Methods, 167, 271 (1994)]，亦可使用抗體H鏈及L鏈存在於不同之載體上之隔離載體。串聯型之基因重組抗體表現用載體使用pKANTEK93(國際公開第97/10354號)、pEE18[Hybridoma, 17, 559 (1998)]等。

(2)編碼源自人類以外之動物之抗體之V區的cDNA之獲得及胺基酸序列之分析

編碼非人類抗體之VH及VL的cDNA之獲得及胺基酸序列之分析可如下所述進行。

自產生非人類抗體之融合瘤細胞提取mRNA，合成cDNA。於噬菌體或質體等載體中對所合成之cDNA進行選殖而製作cDNA基因庫。

使用編碼小鼠抗體之C區部分或V區部分之DNA作為探針，自上述基因庫分別單離具有編碼VH或VL之cDNA的重組噬菌體或重組質體。分別確定重組噬菌體或重組質體上之目標小鼠抗體之VH或VL之所有鹼基序列，根據鹼基序列而分別推斷VH或VL之所有胺基酸序列。

於製作生產非人類抗體之融合瘤細胞的人類以外之動物中，使用小鼠、大鼠、倉鼠、或兔等，但若可製作融合瘤細胞，則可使用任意動物。

於由融合瘤細胞製備所有RNA之製備中，使用硫氰酸胍-三氟乙酸銨法[Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、或RNA快速檢測套組(easy kit)(基亞源(Qiagen)公司)等套組等。

於自所有RNA製備mRNA之製備中，使用寡聚(dT)固定化纖維素管柱法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]、或Oligo-dT30<超級>mRNA純化套組(塔卡拉生物公司)等套組等。又，亦可使用Fast Track mRNA隔離套組(Invitrogen公司)、或QuickPrep mRNA純化套組(Pharmacia公

司)等套組而由融合瘤細胞製備 mRNA。

於 cDNA 之合成及 cDNA 基因庫之製作中，使用公知之方法 [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 (Invitrogen 公司)、或 ZAP-cDNA 合成套組(Stratagene 公司)等套組等。

於 cDNA 基因庫之製作時，於併入有自融合瘤細胞提取之以 mRNA 為模板而合成之 cDNA 的載體中，若為併入有該 cDNA 之載體，則可使用任意者。

例如使用 ZAP Express[Strategies, 5, 58(1992)]、pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)]、λZAPII(Stratagene 公司)、λgt10、λgt11[DNA Cloning:A Practical Approach, I, 49(1985)]、Lambda BlueMid(Clontech 公司)、λEx Cell、pT7T3-18U(Pharmacia 公司)、pcD2[Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、或 pUC18[Gene, 33, 103 (1985)]等。

於導入藉由噬菌體或質體載體而構建之 cDNA 基因庫的大腸桿菌中，若為可導入、表現及維持該 cDNA 基因庫者，則可使用任意者。例如使用 XL-1Blue MRF[Strategies, 5, 81(1992)]、C600[Genetics, 39, 440(1954)]、Y1088、Y1090[Science, 222, 778(1983)]、NM522[J. Mol. Biol., 166, 1(1983)]、K802[J. Mol. Biol., 16, 118(1966)]、或 JM105[Gene, 38, 275(1985)]等。

於自 cDNA 基因庫選擇編碼非人類抗體之 VH 或 VL 的 cDNA 純系之選擇中使用：使用進行了同位素或螢光標記之探針的菌落雜交法、或噬菌斑雜交法 [Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]等。

又，亦可製備引子，以由mRNA而合成之cDNA或cDNA基因庫為模板，藉由進行聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction)法[以下記為PCR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)]而製備編碼VH或VL的cDNA。

藉由適當之限制酶等將所選擇之cDNA切斷後，於pBluescript SK(-)(Stratagene公司)等質體中進行選殖，藉由通常所使用之鹼基序列分析方法等而確定該cDNA之鹼基序列。於鹼基序列分析方法中，例如進行雙脫氧法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)]等之反應後，使用ABI PRISM3700(PE Biosystems公司)或A.L.F.DNA定序儀(Pharmacia公司)等鹼基序列自動分析裝置等。

根據所確定之鹼基序列分別推斷VH及VL之所有胺基酸序列，與已知之抗體之VH及VL之所有胺基酸序列[A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]加以比較，藉此分別確認所獲得之cDNA是否編碼包含分泌訊息序列之抗體之VH及VL的完全之胺基酸序列。

關於包含分泌訊息序列之抗體之VH及VL的完全胺基酸序列，藉由與已知之抗體之VH及VL的所有胺基酸序列[A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]比較，可推斷分泌訊息序列之長度及N末端胺基酸序列，進而可知該等所屬之亞群。又，關於VH及VL之各CDR之胺基酸序列，亦可藉由與已知之抗體之VH及VL之胺基酸序列[A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]比較而發現。

又，使用所獲得之VH及VL之完全胺基酸序列，例如對於SWISS-PROT或PIR-Protein等任意之資料庫進行BLAST法[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]等之同源性檢索，可確認VH及VL之完全胺基酸序列係新

穎者。

(3)人類型嵌合抗體表現載體之構建

於(1)中所獲得之基因重組抗體表現用載體之編碼人類抗體之CH或CL之各個基因之上游，分別選殖分別編碼非人類抗體之VH或VL的cDNA，藉此可構建人類型嵌合抗體表現載體。

將編碼非人類抗體之VH或VL之cDNA之3'末端側與人類抗體之CH或CL之5'末端側連結，製作以連結部分之鹼基序列編碼適宜之胺基酸，且成為適當之限制酶識別序列之方式而設計的VH及VL之cDNA。

將所製作之VH及VL之cDNA，以於(1)中所獲得之人類化抗體表現用載體之編碼人類抗體之CH或CL的各個基因之上游藉由適宜之形態表現該等之方式分別進行選殖，構建人類型嵌合抗體表現載體。

又，亦可使用於兩端具有適當之限制酶之識別序列的合成DNA，藉由PCR法而分別擴增編碼非人類抗體VH或VL之cDNA，於(1)中所獲得之基因重組抗體表現用載體中進行選殖。

(4)編碼人類化抗體之V區的cDNA之構建

編碼人類化抗體之VH或VL的cDNA可如下所述進行構建。

分別選擇移植非人類抗體之VH或VL之CDR之胺基酸序列的人類抗體之VH或VL之FR之胺基酸序列。於所選擇之FR之胺基酸序列中，若為源自人類抗體者，則可使用任意者。

例如使用蛋白質資料庫(Protein Data Bank)等資料庫中所登錄之人類抗體之FR之胺基酸序列、或人類抗體之FR之各亞群之共用胺基酸序列[A.L.F.DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]等。為了抑制抗體之結合活性降低，選擇與原來抗體之VH或VL之FR之胺基酸序列儘可能高之同源性(至少60%以上)之FR之胺基酸序列。

其次，於所選擇之人類抗體之VH或VL之FR之胺基酸序列分別移

植原來之抗體之CDR之胺基酸序列，分別設計人類化抗體之VH或VL之胺基酸序列。考慮抗體基因之鹼基序列中所見之密碼子之使用頻度[A.L.F.DNA,US Dept. Health and Human Services(1991)]而將所設計之胺基酸序列轉換為DNA序列，分別設計編碼人類化抗體之VH或VL之胺基酸序列的DNA序列。

基於所設計之DNA序列，合成包含100鹼基前後之長度的數根合成DNA，使用該等進行PCR反應。於此情形時，根據PCR反應中之反應效率及可合成之DNA之長度，較佳為關於H鏈、L鏈分別設計各6根合成DNA。又，藉由在位於兩端之合成DNA之5'末端導入適當之限制酶之識別序列，可容易地於(1)中所獲得之人類化抗體表現用載體中選殖編碼人類化抗體之VH或VL的cDNA。

於PCR反應後，於pBluescript SK(-)(Stratagene公司)等質體中分別選殖擴增產物，藉由與(2)中所記載之方法同樣之方法，確定鹼基序列，將獲得所期望之具有如下DNA序列之質體，上述DNA序列編碼人類化抗體之H鏈全長或L鏈全長之胺基酸序列。

或者亦可使用基於所設計之DNA序列，將VH全長及VL全長分別合成為1根長鏈DNA者而代替上述PCR擴增產物。進而，可藉由在合成長鏈DNA之兩端導入適當之限制酶之識別序列，於(1)中所獲得之人類化抗體表現用載體中容易地選殖編碼人類化抗體之VH或VL的cDNA。

(5)人類化抗體之V區之胺基酸序列之修飾

人類化抗體僅於僅將非人類抗體之VH及VL之CDR移植至人類抗體之VH及VL之FR中，其抗原結合活性與原來之非人類抗體相比而言降低[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。藉由人類化抗體而鑑定人類抗體之VH及VL之FR之胺基酸序列中，直接參與與抗原之結合的胺基酸殘基、與CDR之胺基酸殘基相互作用之胺基酸殘基、及維持抗體

之立體結構、間接參與與抗原之結合的胺基酸殘基，藉由將該等胺基酸殘基置換為原來之非人類抗體之胺基酸殘基，可使降低之抗原結合活性上升。

為了鑑定與抗原結合活性相關之FR之胺基酸殘基，可藉由使用X射線結晶分析[J. Mol. Biol.、112、535 (1977)]或電腦模型化[Protein Engineering, 7, 1501 (1994)]等而進行抗體之立體結構之構建及分析。又，關於各個抗體而製作數種修飾體，反覆研究各自之與抗原結合活性之關係，進行試誤，藉此可獲得具有必要之抗原結合活性的人類化抗體。

人類抗體之VH及VL之FR之胺基酸殘基可藉由使用修飾用合成DNA進行(4)中所記載之PCR反應而置換。關於PCR反應後之擴增產物，可藉由(2)中所記載之方法而確定鹼基序列，確認實施了目標之修飾。

(6)人類化抗體表現載體之構建

於(1)中所獲得之基因重組抗體表現用載體之編碼人類抗體之CH或CL的各個基因之上游，分別選殖編碼所構建之基因重組抗體之VH或VL的cDNA，可構建人類化抗體表現載體。

例如，於(4)及(5)中所獲得之構建人類化抗體之VH或VL時所使用之合成DNA中，藉由在位於兩端之合成DNA之5'末端導入適當之限制酶之識別序列，以於(1)中所獲得之人類化抗體表現用載體之編碼人類抗體之CH或CL的各個基因之上游藉由適宜之形態表現該等之方式分別進行選殖。

(7)基因重組抗體之短暫性表現

使用(3)及(6)中所獲得之基因重組抗體表現載體、或對該等進行修飾之表現載體而進行基因重組抗體之短暫性表現，可有效率地評價所製作之多種基因重組抗體之抗原結合活性。

於導入表現載體之宿主細胞中，若為可表現基因重組抗體之宿主細胞，則可使用任意細胞，例如使用COS-7細胞(ATCC編號：CRL1651)[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283(1991)]。

於COS-7細胞中導入表現載體之導入中，使用DEAE-聚葡萄糖法[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press(1991)]、或脂轉染法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)]等。

於表現載體之導入後，培養上清液中之基因重組抗體之表現量及抗原結合活性係使用酶免疫抗體法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、單株抗體實驗手冊、Kodansha Scientific(1987)]等而測定。

(8)穩定地表現基因重組抗體之轉形株之獲得與基因重組抗體之製備

藉由將(3)及(6)中所獲得之基因重組抗體表現載體導入至適當之宿主細胞中，可獲得穩定地表現基因重組抗體之轉形株。

於宿主細胞中導入表現載體之導入中，使用電穿孔法[日本專利特開平02-257891號公報；Cytotechnology, 3, 133(1990)]等。

導入基因重組抗體表現載體之宿主細胞中，若為可表現基因重組抗體之宿主細胞，則可使用任意細胞。例如使用CHO-K1(ATCC編號：CCL-61)、DUkXB11(ATCC編號：CCL-9096)、Pro-5(ATCC編號：CCL-1781)、CHO-S(Life Technologies, Cat# 11619)、大鼠骨髓瘤細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(或者亦稱為YB2/0)、小鼠骨髓瘤細胞NS0、小鼠骨髓瘤細胞SP2/0-Ag14(ATCC編號：CRL1581)、小鼠P3-X63-Ag8653細胞(ATCC編號：CRL1580)、二氫葉酸還原酶基因(Dihydroforate Reductase, 以下表記為DHFR)缺損之CHO細胞[Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)]、獲得耐凝聚素性之 Lec13[Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 55(1986)]、 α 1,6-海藻糖轉移酶基因缺損之CHO細胞(國際公開第2005/035586號、國際公開第02/31140號)、大鼠 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞(ATCC 編號：CRL1662)等。

於表現載體之導入後，穩定地表現基因重組抗體之轉形株係藉由以含有G418硫酸鹽等藥劑之動物細胞培養用培養基進行培養而選擇(日本專利特開平02-257891號公報)。

於動物細胞培養用培養基中，使用RPMI1640培養基(Invitrogen公司)、GIT培養基(日本製藥公司)、EX-CELL301培養基(JRH公司)、IMDM培養基(Invitrogen公司)、融合瘤(Hybridoma)-SFM培養基(Invitrogen公司)、或於該等培養基中添加有FBS等各自添加物之培養基等。

藉由在培養基中培養所獲得之轉形株而於培養上清液中表現蓄積基因重組抗體。培養上清液中之基因重組抗體之表現量及抗原結合活性可藉由ELISA法等而測定。又，可利用DHFR擴增系(日本專利特開平02-257891號公報)等，使轉形株所產生之基因重組抗體之表現量上升。

基因重組抗體係使用蛋白質A-管柱而由轉形株之培養上清液進行純化[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]。又，亦可組合凝膠過濾、離子交換層析法及超濾等蛋白質純化中所使用之方法。

進行了純化之基因重組抗體之H鏈、L鏈或抗體分子全體之分子量可使用聚丙烯醯胺凝膠電泳法[Nature, 227, 680(1970)]、或西方墨點法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition,

Academic Press(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]等而測定。

3.純化單株抗體或該抗體片段之活性評價

進行了純化之本發明之單株抗體或該抗體片段之活性評價可如下所述進行。

對於人類CRTH2表現細胞株之結合活性例如可使用前述之1.(6)中所記載之使用流式細胞儀之結合反應檢測系等螢光抗體法[Cancer Immunol.Immunother., 36, 373(1993)]而測定。

對於人類CRTH2陽性培養細胞株之CDC活性、或ADCC活性係藉由公知之測定方法[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)]而測定。

4.控制抗體之效應活性之方法

作為控制本發明之單株抗體之效應活性的方法，已知有控制與抗體之Fc區之第297號之天冬醯胺(Asn)上結合之N結合偶聯物型糖鏈之還原末端所存在的N-乙醯葡萄糖(GlcNAc) α 1,6結合之海藻糖(亦稱為核心海藻糖)之量的方法(國際公開第2005/035586號、國際公開第2002/31140號、國際公開第00/61739號)、或藉由對抗體之Fc區之胺基酸殘基進行修飾而控制之方法等。於本發明之單株抗體中可使用任意之方法而控制效應活性。

所謂效應活性係指經由抗體之Fc區而引起之抗體依賴性之活性，已知有ADCC活性、CDC活性、或巨噬細胞或樹狀細胞等吞噬細胞之抗體依賴性吞噬作用(Antibody-dependent phagocytosis、ADP活性)等。

作為效應活性之測定法，例如將作為標的之炎症性細胞、作為

效應之人類末梢血液單核球(PBMC)、以及炎症性細胞特異性抗體加以混合，進行4小時左右之培養後，測定作為細胞障礙之指標而釋放之乳酸脫氫酶(LDH)。或者可於人類PBMC中混合例如CD20這樣的識別血液細胞特異性抗原之抗體，進行培養後，進行游離LDH之測定或者利用流式細胞儀而測定該細胞數之減少作為效應活性。

藉由控制抗體之Fc之N結合偶聯物型糖鏈的核心海藻糖之含量，可使抗體之效應活性增加或降低。作為使抗體之Fc上所結合之N結合偶聯物型糖鏈上所結合的海藻糖之含量降低之方法，例如可列舉使用 α 1,6-海藻糖轉移酶基因缺損之CHO細胞而使抗體表現之方法，可獲得並未結合海藻糖之抗體。並未結合海藻糖之抗體具有較高之ADCC活性。

另一方面，作為使抗體之Fc上所結合之N結合偶聯物型糖鏈上所結合的海藻糖之含量增加的方法，例如可列舉使用導入有 α 1,6-海藻糖轉移酶基因之宿主細胞而使抗體表現之方法，可獲得結合有海藻糖之抗體。結合有海藻糖之抗體具有比並未結合海藻糖之抗體更低之ADCC活性。

又，藉由對抗體之Fc區之胺基酸殘基進行修飾，可使ADCC活性或CDC活性增加或降低。例如可藉由使用美國專利公開第2007/0148165號說明書中所記載之Fc區之胺基酸序列而使抗體之CDC活性增加。

又，藉由進行美國專利第6737056號說明書、美國專利第7297775號說明書或美國專利第7317091號說明書中所記載之胺基酸修飾，可使ADCC活性或CDC活性增加，亦可使其降低。

又，於本發明之抗體中，亦包含進行上述之抗體固定區之胺基酸修飾或糖鏈修飾且進行例如日本專利特開2013-165716號公報、日本專利特開2012-021004號公報等中所記載之胺基酸修飾，藉此控制

於Fc受體中之反應性而控制血中半衰期之抗體。

進而，藉由組合上述方法，於一種抗體中使用，可獲得抗體之效應活性或血中半衰期得到控制之抗體。

5.使用本發明之單株抗體或該抗體片段之疾病之治療方法

本發明之抗體可於與人類CRTH2相關之疾病之治療中使用。作為投予路徑，例如可列舉經口投予或口腔內、呼吸道內、直腸內、皮下、肌內、靜脈內、或腹腔內等非經口投予。作為投予形態，例如可列舉噴霧劑、膠囊劑、片劑、散劑、顆粒劑、糖漿劑、乳劑、栓劑、注射劑、軟膏、或貼劑等。

作為於經口投予中適當之製劑，例如可列舉乳劑、糖漿劑、膠囊劑、片劑、散劑、或顆粒劑等。

如乳劑或糖漿劑這樣之液體製備物係使用水、蔗糖、山梨糖醇或果糖等糖類，聚乙二醇或丙二醇等二醇類，芝麻油、橄欖油或大豆油等油類，對羥基苯甲酸酯類等防腐劑，或草莓香精或胡椒薄荷等香料類等作為添加劑而製造。

膠囊劑、片劑、散劑或顆粒劑等係使用乳糖、葡萄糖、蔗糖或甘露醇等賦形劑，澱粉或海藻酸鈉等崩解劑，硬脂酸鎂或滑石等潤滑劑，聚乙烯醇、羥丙基纖維素或明膠等結合劑，脂肪酸酯等界面活性劑或甘油等塑化劑等作為添加劑而製造。

作為於非經口投予中適當之製劑，例如可列舉注射劑、栓劑、或噴霧劑等。

注射劑係使用鹽溶液、葡萄糖溶液、或包含其兩者之混合物的載體等而製造。

栓劑係使用可可脂、氫化脂肪、或羧酸等載體而製造。

噴霧劑係使用並不刺激接受者之口腔及呼吸道黏膜，且使本發明之單株抗體或該抗體片段分散為微細粒子，使吸收變容易之載體等

而製造。作為載體，例如使用乳糖或甘油等。又，亦可製造為氣溶膠或乾粉。

進而，於上述非經口劑中，亦可添加於經口投予中適當之製劑中作為添加劑而例示之成分。

6.使用本發明之抗體或該抗體片段之疾病之診斷方法

可藉由使用本發明之抗體或該抗體片段，檢測或測定人類CRTH2或表現人類CRTH2之細胞而診斷與人類CRTH2相關聯之疾病。

與人類CRTH2相關聯之疾病之一的過敏疾病之診斷例如可藉由如下方式而進行：使用流式細胞儀等免疫學方法而檢測源自患者之末梢血液、痰、鼻涕或肺泡清洗液等中所存在之炎症性細胞中所表現之人類CRTH2。

作為免疫學方法，係使用實施了標記之抗原或抗體，檢測或測定抗體量或抗原量之方法。例如使用放射性物質標記免疫抗體法、酶免疫測定法、螢光免疫測定法、發光免疫測定法、西方點墨法或物理化學方法等。

放射性物質標記免疫抗體法例如為使抗原或表現抗原之細胞等與本發明之抗體或該抗體片段反應，進而使其與實施了放射線標記之抗免疫球蛋白抗體或結合片段反應，然後藉由閃爍計數器等進行測定。

酶免疫測定法例如為使抗原或表現抗原之細胞等與本發明之抗體或該抗體片段反應，進而使其與實施了標記之抗免疫球蛋白抗體或結合片段反應，然後藉由吸光光度計測定。例如使用三明治ELISA法等。

作為酶免疫測定法中所使用之標記物，可使用公知[酶免疫測定法、醫學書院(1987)]之酶標記。例如使用鹼性磷酸酶標記、過氧化酶標記、螢光酶標記、或生物素標記等。

三明治ELISA法係於固相上結合抗體後，捕獲作為檢測或測定對象之抗原，使所捕獲之抗原與第2抗體反應之方法。於該ELISA法中，準備識別所欲檢測或測定之抗原的抗體或抗體片段，且其係抗原識別部位不同之2種抗體，其中使第1抗體或抗體片段預先吸附於板(例如96孔板)上，其次預先藉由FITC等螢光物質、過氧化酶等酶、或生物素等對第2抗體或抗體片段進行標記。

使吸附有上述抗體之板，與自生物內所分離之細胞或其破碎液、組織或其破碎液、細胞培養上清液、血清、胸水、腹水、或眼液等反應後，使其與進行了標記之單株抗體或抗體片段反應，進行與標記物質相應之檢測反應。根據將濃度已知之抗原階段性稀釋而製作之校準曲線，算出被試驗樣品中之抗原濃度。

作為三明治ELISA法中所使用之抗體，可使用多株抗體或單株抗體之任意者，亦可使用Fab、Fab'、或F(ab')₂等抗體片段。作為三明治ELISA法中所使用之2種抗體之組合，可為識別不同之抗原決定基的單株抗體或抗體片段之組合，亦可為多株抗體與單株抗體或抗體片段之組合。

螢光免疫測定法係藉由文獻[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、單株抗體實驗手冊、Kodansha Scientific(1987)]等中所記載之方法而進行測定。作為螢光免疫測定法中所使用之標記物，例如可列舉公知[螢光抗體法、soft science公司(1983)]之螢光標記。例如可列舉螢光素異硫氰酸鹽(FITC)、或異硫氰酸四甲基羅丹明(RITC)等。

發光免疫測定法係藉由文獻[生物發光與化學發光 臨床檢查42、廣川書店(1998)]等中所記載之方法而進行測定。作為發光免疫測定法中所使用之標記物，例如可列舉公知之發光體標記，可列舉吡啶鎘酯、咯吩等。

西方點墨法係藉由如下方式而測定：藉由SDS(十二烷基硫酸鈉)-PAGE[Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]對抗原或表現抗原之細胞等進行區分，於聚偏二氟乙烯(PVDF)膜或硝化纖維膜中點墨該凝膠，使該膜與識別抗原之抗體或抗體片段反應，進而使其與實施了FITC等螢光物質、過氧化酶等酶標記、或生物素標記等之抗小鼠IgG抗體或結合片段反應後，對該標記進行可視化。以下表示一例。

使表現具有序列編號2所表示之胺基酸序列之多肽的細胞或組織溶解，於還原條件下藉由SDS-PAGE法使每區帶之蛋白量為0.1~30 μg 而移動。將移動之蛋白質轉移至PVDF膜中，於1~10%之BSA-PBS中、室溫下使其反應30分鐘而進行阻斷操作。

於此處，使本發明之抗體反應，藉由含有0.05~0.1%之Tween-20的PBS(以下記為Tween-PBS)進行清洗，使進行了過氧化酶標記之山羊抗小鼠IgG於室溫下進行2小時反應。藉由Tween-PBS進行清洗，使用ECL西方墨點檢測試劑(ECL Western Blotting Detection Reagent)(Amersham公司製造)等而檢測結合有單株抗體之帶，藉此檢測出具有序列編號2所表示之胺基酸序列的多肽。作為利用西方墨點法之檢測中所使用之抗體，使用可與並不保持天然型立體結構之多肽結合的抗體。

物理化學方法例如藉由如下方式而進行：藉由使作為抗原之人類CRTH2與本發明之單株抗體或該抗體片段結合而形成凝集體，檢測出該凝集體。作為其他之物理化學方法，例如可列舉毛細管法、一維免疫擴散法、免疫比濁法或乳膠免疫比濁法[臨床檢查法概要、金原出版(1998)]等。

乳膠免疫比濁法係若使用使抗體或抗原致敏之粒徑為0.1~1 μm 左右之聚苯乙烯乳膠等載體，藉由對應之抗原或抗體而產生抗原抗體

反應，則反應液中之散射光增加，透射光減少。藉由檢測該變化作為吸光度或積分球濁度而測定被試驗樣品中之抗原濃度等。

作為使用本發明之抗體或該抗體片段，於治療開始前判斷該抗體之治療有效性之方法，例如可列舉以下者。

首先，於治療開始前，自患者體內採取例如末梢血液、痰、肺胞清洗液、鼻涕等，於該懸浮液中添加本發明之抗體或該抗體片段，於一定時間後測定以炎症性細胞之除去或對於Th2型細胞激素等生物功能分子之抑制活性為首之抗炎症性細胞活性。測定之結果，於檢測出抗炎症性細胞活性之情形時，於具有該末梢血液、痰、鼻涕等之患者之治療中，若本發明之抗體或該抗體片段有效，則可於治療開始前判斷。

[實施例]

以下，藉由實施例而對本發明加以說明，但本發明並不限定於該等。

[實施例1]

人類CRTH2表現細胞之作成

(1)人類CRTH2表現載體之製作

全合成人類CRTH2(以下有時亦記為CRTH2)之cDNA，於以後之試驗中使用。將人類CRTH2之cDNA序列記載於序列編號1中，將胺基酸序列記載於序列編號2中。

(i)人類CRTH2基因表現pKANTEK93載體之構建

使用限制酶EcoRI及KpnI，將人類CRTH2之cDNA與載體pKANTEK93(國際公開第97/10354號)連結，構建人類CRTH2基因表現pKANTEK93載體。

(ii)人類CRTH2基因表現pAMoh載體之構建

對於pAMoh(國際公開第03/087366號)，亦使用限制酶KpnI及

HindIII而併入人類CRTH2基因，構建人類CRTH2基因表現pAMoh載體。

(2)人類CRTH2表現CHO/DG44細胞之作成

自三菱化學股份有限公司橫濱綜合研究所獲得DHFR基因缺損CHO(中國倉鼠卵巢)細胞DG44株(CHO/DG44細胞)，用於人類CRTH2表現細胞作成中。於培養中使用添加有10%透析胎牛血清(dFBS)(GIBCO公司)、HT[次黃嘌呤(H)、胸苷(T)]添加物(GIBCO公司)、及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 建它黴素(Nacalai Tesque公司)之IMDM(GIBCO公司)(以下簡稱為IMDM培養培養基)。

首先，藉由限制酶AatII處理將(1)-(i)中所製作之人類CRTH2基因表現pKANTEK93載體切斷，對所獲得之直鏈狀DNA進行純化，將其溶解於殺菌水中。藉由電穿孔法將該DNA導入至CHO/DG44細胞中，於除去了HT添加物之IMDM培養培養基中培養3日左右。

其後，藉由加入有10%之dFBS、0.5 mg/mL 之G418(Nacalai Tesque公司)、及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之建它黴素(Nacalai Tesque公司)之IMDM(以下簡稱為IMDM選擇培養基)而選擇耐藥劑性細胞。將所選擇之耐藥劑性細胞以成為75個細胞/板之方式播種於96孔板中，進而於IMDM選擇培養基上培養2週左右。於顯微鏡下對每個孔進行觀察，依序對成為單株者進行擴大培養。

藉由0.02% EDTA溶液(Nacalai Tesque公司)剝離所獲得之耐藥劑性細胞，藉由PBS(phosphate buffered saline, 磷酸鹽緩衝鹽水)進行清洗後，藉由含有2%胎牛血清(FBS)、0.05% NaN_3 及1mM EDTA之PBS(Staining Medium, 染色介質、以下略記為SM)進行懸浮。其次，以成為 2×10^5 個細胞/孔之方式播種於96孔板中，藉由1700 rpm進行2分鐘之離心分離。

除去上清液後，添加藉由SM而製備之PE標記抗人類CRTH2抗體

(貝克曼庫爾特公司)，於4℃下進行1小時之反應。對細胞進行清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)分析螢光強度。選擇高表現人類CRTH2之純系，將該細胞作為人類CRTH2表現CHO/DG44細胞。

(3)FLAG融合人類CRTH2表現載體之製作

(i)FLAG融合人類CRTH2基因表現pAMoh載體之構建

由(1)-(ii)中所製作之人類CRTH2基因表現pAMoh，使用引子人類CRTH2FLAG-A(序列編號3)及人類CRTH2FLAG-B(序列編號4)，藉由聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction，以下記為PCR)對於C末端附加有FLAG標籤之人類CRTH2(序列編號5)進行擴增，使用限制酶KpnI及HindIII而與載體pAMoh(國際公開第03/087366號)連結，構建FLAG融合人類CRTH2基因表現pAMoh載體。

(ii)FLAG融合人類CRTH2基因表現pKANTEK93載體之構建

由(3)-(i)中所構建之FLAG融合人類CRTH2基因表現pAMoh載體，使用引子人類CRTH2FLAG-C(序列編號6)及人類CRTH2FLAG-D(序列編號7)，藉由PCR對於C末端附加有FLAG標籤之人類CRTH2進行擴增，使用限制酶EcoRI及KpnI而與載體pKANTEK93(國際公開第97/10354號)連結，構建FLAG融合人類CRTH2基因表現pKANTEK93載體。

(4)FLAG融合人類CRTH2表現3Y1-B細胞之作成

自理研生物學資源中部獲得大鼠3Y1-B細胞，用於FLAG融合人類CRTH2表現細胞作成中。培養使用添加有10%FBS(GIBCO公司)、及50 µg/mL 建它黴素(Nacalai Tesque公司)之DMEM(GIBCO公司)(以下略記為DMEM培養培養基)。

藉由限制酶AatII處理將(3)-(ii)中所製作之FLAG融合人類CRTH2基因表現pKANTEK93載體切斷，對所獲得之直鏈狀DNA進行純化，

溶解於殺菌水中。藉由使用Fugene6(Promega公司)之Lipofection法而將該DNA導入至3Y1-B細胞中，於DMEM培養培養基中培養3日左右。其後，藉由添加有10% FBS、0.8 mg/mL G418(Nacalai Tesque公司)、及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 建它黴素(Nacalai Tesque公司)之DMEM(以下稱為DMEM選擇培養基)而選擇耐藥劑性細胞。

藉由0.05%胰蛋白酶溶液(invitrogen公司)剝離所獲得之耐藥劑性細胞，藉由PBS進行清洗後，藉由SM進行懸浮。其次，以成為 2×10^5 個細胞/孔之方式播種於96孔板中，以1700 rpm進行2分鐘之離心分離。除去上清液後，添加藉由SM而製備之PE標記抗人類CRTH2抗體(貝克曼庫爾特公司)，於4°C下進行1小時之反應。對細胞進行清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS Aria)分析螢光強度。對高表現FLAG融合人類CRTH2之組分進行單細胞分離，進行擴大培養，作為FLAG融合人類CRTH2表現3Y1-B細胞。

[實施例2]

對於人類CRTH2之抗體單株抗體之製作

(1)於大鼠中之免疫

為了獲得對於人類CRTH2之單株抗體，於初次投予時之週齡為9週齡之雌性WKY/NCr1Cr1j大鼠(WKY大鼠)(CHARLES RIVER公司)中進行免疫。

初次投予係使 5×10^6 個細胞之FLAG融合人類CRTH2表現3Y1-B細胞懸浮於100 μL 之生理鹽液(大塚製藥工場公司)中，與Sigma Adjuvant System(註冊商標)(Sigma-Aldrich公司)100 μL 一同製備200 μL 之細胞懸浮液，以每1處為100 μL 而於WKY大鼠之尾根部左右2處進行肌內投予。

又，初次投予2週後，使 5×10^6 個細胞之FLAG融合人類CRTH2表

現3Y1-B細胞懸浮於200 μL 之生理鹽液中，藉由同樣之方法進行投予。

(2)融合瘤之製作

於(1)中進行第2次免疫之3日後，外科性地自WKY大鼠摘出髌骨淋巴結，供至細胞融合。

首先，將摘出之髌骨淋巴結於載玻片上磨碎，使組織解散。使該髌骨淋巴結組織懸浮於初代細胞培養液(Minimum Essential Media, MEM)(invitrogen公司)上，使其通過細胞過濾器，藉此除去剩餘之組織。以1200 rpm進行5分鐘之離心分離，藉此將上清液除去後，再次藉由MEM進行懸浮，作為髌骨淋巴結細胞。

對於所獲得之髌骨淋巴結細胞數，混合1/5細胞數之小鼠骨髓瘤細胞株P3-U1(ATCC)。藉由離心分離將上清液除去後，於37°C之溫浴中進行保溫，緩緩添加500 μL 之PEG溶液[分別混合有聚乙二醇1000(純正化學公司)及MEM各1 mL，且加入有DMSO(二甲基亞砷)(Sigma-Aldrich公司)350 μL 者]，於其中每隔1分鐘加入MEM 1 mL共5次後，進而添加45 mL之MEM。

藉由以900 rpm進行5分鐘離心分離而將上清液除去後，藉由HAT培養基[相對於500 mL之RPMI-1640(和光純藥公司)，添加有10 mL之HAT(次黃嘌呤(H)、胺喋呤(A)、胸苷(T))溶液(GIBCO公司)、0.5 mL之55 mmol/L 2-巰基乙醇(2-Mercaptoethanol) (invitrogen公司)、50 mL之胎牛血清(Moregate Biotech公司)、及0.5 mL之10 mg/mL建它黴素溶液(Nacalai Tesque公司)者]使細胞懸浮，播種於96孔板中而進行培養。

(3)融合瘤篩選

將(2)中播種之融合瘤進行7日培養後，採取各孔之培養上清液，分析對於人類CRTH2之反應性。陽性對照細胞及陰性對照細胞分別為

人類CRTH2表現CHO/DG44細胞及CHO/DG44細胞。首先，藉由0.02% EDTA溶液(Nacalai Tesque公司製造)剝離陽性對照細胞及陰性對照細胞，以每1個孔中分別成為 1×10^5 個細胞/50 μL 之方式播種於96孔板中，添加50 μL 之培養上清液，於4°C下進行30分鐘之反應。

對細胞進行清洗後，使其懸浮於藉由SM稀釋為300倍之抗大鼠IgG(Fc)-Dylight488(abcam公司)100 μL 中，於4°C下進行30分鐘之反應。再次對細胞進行清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)分析螢光強度。

關於發現與人類CRTH2表現CHO/DG44細胞特異性反應之孔之融合瘤，使用選殖培養基[於S-Clone cloning medium CM-B(Eidia公司)中添加有0.5 mL之10 mg/mL建它黴素溶液(Nacalai Tesque公司)、5 mL之HT添加物(Gibco公司)者]而進行2次利用限制稀釋法之單細胞選殖。最終於人類CRTH2表現CHO/DG44細胞中創造顯示出最強之流式細胞儀反應性之融合瘤Lym2純系(以下記為融合瘤Lym2)。

(4)融合瘤Lym2之培養上清液中所含之抗體之亞型之鑑定

藉由PBS(Nacalai Tesque公司製造)將融合瘤Lym2培養3日而成之培養上清液稀釋為10倍，使用該稀釋液150 μL ，藉由大鼠單株抗體同型測試套組(Rat Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit) (AbD Serotec公司)依照隨附之說明書進行亞型之分析。

其結果可知：融合瘤Lym2之培養上清液中所含之大鼠抗人類CRTH2單株抗體(以下亦存在簡單略記為Lym2抗體之情形)係大鼠IgG2b抗體。

(5)Lym2抗體之純化

於融合瘤(Hybridoma)-SFM(invitrogen公司)中加入有5%之胎牛血清超低IgG (Fetal Bovine Serum Ultra Low IgG) (invitrogen公司)之培養基中，將融合瘤Lym2培養1週。回收培養上清液而供於純化。

自培養上清液，使用Prosep-G(GE healthcare公司)而純化Lym2抗體。首先，將培養上清液裝載至管柱中，藉由PBS而對管柱進行清洗後，以pH值5.0、3.5及3.0之溶出緩衝劑(0.1 M檸檬酸單水合物-NaOH/pH值5.0、3.5及3.0)依序溶出。所溶出之溶出分迅速地由中和緩衝劑(2M Tris-HCl/pH值8.5)而中和。

測定各個溶出分之吸光度(280 nm)，回收測定值較高之連續溶出分作為抗體組分。藉由PBS進行透析，將通過0.22 μm 之過濾器者作為純化蛋白質。將280 nm之吸光係數設為1.4而算出濃度。

[實施例3]

Lym2抗體之利用流式細胞儀之抗原結合性評價

藉由0.05%之胰蛋白酶溶液(invitrogen公司)而剝離FLAG融合人類CRTH2表現3Y1-B細胞，藉由PBS加以清洗後，藉由SM進行懸浮。其次，以每1個孔中成為 2×10^5 個細胞之方式播種於96孔板中，以1700 rpm進行2分鐘之離心分離。除去上清液後，添加100 μL 之藉由SM以成為10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之方式而製備之Lym2抗體，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下進行1小時之反應。

對細胞進行清洗後，添加藉由SM稀釋為100倍之抗大鼠IgG-FITC(貝克曼庫爾特公司)，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下進行1小時之反應。再次對細胞進行清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司製造、FACS CantoII)分析螢光強度。其結果為，確認Lym2抗體結合於FLAG融合人類CRTH2表現3Y1-B細胞中。

[實施例4]

Lym2抗體重鏈及輕鏈可變區基因之選殖

使用RNAiso plus(塔卡拉生物公司)，依照附隨之說明書，溶解藉由PBS進行了清洗之融合瘤Lym2而製備全RNA。所獲得之全RNA溶解於DEPC處理水(invitrogen公司)中。其次，使用Oligotex-

dT30<Super>mRNA 純化套組(來自全RNA)(塔卡拉生物公司)，依照附隨之說明書，自所獲得之全RNA純化mRNA。進而，使用SMART RACE cDNA放大套組(Clontech公司)，依照附隨之說明書，自進行了純化之mRNA製備cDNA。

將所獲得之cDNA於模板中，分別藉由PCR而使用引子大鼠IgG2bH-A(序列編號8)及大鼠IgG2bH-B(序列編號9)對大鼠IgG2b重鏈基因進行擴增，使用引子大鼠k-A(序列編號10)及大鼠k-B(序列編號11)對大鼠輕鏈(κ 鏈)基因進行擴增。對進行了擴增之基因進行次選殖，分析鹼基序列。

其結果為，鑑定包含訊息序列之Lym2抗體之VH及VL之鹼基序列及胺基酸序列。將VH、VL各自之鹼基序列表示於序列編號12、14中，將胺基酸序列表示於序列編號13、15中。又，根據Kabat等人[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]之報告，鑑定不含訊息序列之Lym2抗體之VH及VL之序列。

將除去了訊息序列之VH、VL各自之鹼基序列表示於序列編號16、18中，將胺基酸序列表示於序列編號17、19中。又，將Lym2抗體之VH之CDR1、CDR2、及CDR3之胺基酸序列分別示於序列編號20、21、及22中，將Lym2抗體之VL之CDR1、CDR2、及CDR3之胺基酸序列分別示於序列編號23、24、及25中。

[實施例5]

大鼠/人類嵌合型Lym2抗體之製作

(1)大鼠/人類嵌合型Lym2抗體表現載體之構建

大鼠/人類嵌合型Lym2抗體表現載體係藉由以下之方法，將Lym2抗體重鏈及輕鏈可變區基因分別連結於人類IgG1重鏈及 κ 鏈固定區基因而製作。

首先，全合成序列編號26之序列作為VH，全合成序列編號27之序列作為VL。自所合成之序列，藉由PCR使用引子chLym2VH-A(序列編號28)及引子chLym2VH-B(序列編號29)對VH進行擴增，使用引子chLym2VL-A(序列編號30)及引子chLym2VL-B(序列編號31)對VL進行擴增。

基因片段係進行瓊脂糖凝膠電泳，藉由QIA快速凝膠提取套組(QIAquick Gel Extraction Kit)(QIAGEN公司)進行純化。使用該片段與人類κ鏈固定區表現載體(BglII/BsiWI處理)及人類重鏈(IgG1)固定區表現載體(SalI/NheI處理)，依照附隨之說明書而進行利用In-Fusion HD選殖套組(Clontech公司)所進行之向載體中之次選殖。

藉由轉形為大腸桿菌DH5α勝任細胞(塔卡拉生物公司)，實施質體提取、序列確認，而製作大鼠/人類嵌合型Lym2抗體(以下記為chLym2)表現載體。

(2)chLym2短暫性表現細胞株之製備

為了製作chLym2之短暫性表現株，依照附隨之說明書使用FreeStyle(商標)MAX CHO表現系統(Lifetechnologies公司)，藉由以下之方法於宿主細胞中導入(1)中所製作之表現載體。宿主細胞係使用於FreeStyle(商標)CHO表現介質(Lifetechnologies公司)中使FUT8剔除CHO細胞(國際公開第2005/035586號、國際公開第02/31140號)進行適應之株。

分別將(1)中所製作之312.5 μg之chLym2抗體表現載體(將輕鏈表現載體與重鏈表現載體以1：2混合而成者)溶解於20 mL之Opti-Pro SFM(invitrogen公司)中，又，將312.5 μL之Freestyle MAX試劑(invitrogen公司)溶解於20 mL之Opti-Pro SFM中，於室溫下放置5分鐘。將上述二液加以混合，於室溫下放置15分鐘。將該混合溶液總量添加於250 mL之宿主細胞培養液(1×10^6 個細胞/mL)中，而獲得chLym2

短暫性表現細胞株。

(3)chLym2之純化

使(2)中所獲得之chLym2短暫性表現細胞株懸浮於添加有8 mM之L-麩醯胺酸(invitrogen公司)的Free style CHO表現介質(invitrogen公司)中，於錐形瓶中培養5日後，回收培養上清液。對所回收之培養上清液進行離心分離，使用0.22 μm 過濾器進行過濾，藉此製備含有chLym2之培養上清液。

自所製備之培養上清液，使用MabSelect SuRe(GE healthcare公司)而純化chLym2。首先，將培養上清液裝入管柱中，藉由PBS對管柱進行清洗後，藉由pH值5.0、3.5、3.0之溶出緩衝劑(0.1 M檸檬酸單水合物-NaOH/pH值5.0、3.5、3.0)依序進行溶出。所溶出之溶出分迅速被中和緩衝劑(2M Tris-HCl/pH值8.5)所中和。

測定各個溶出分之280 nm之吸光度(A_{280})，回收測定值較高之連續溶出分作為抗體組分。藉由PBS對抗體組分進行透析，將通過0.22 μm 之過濾器者作為純化蛋白質。將280 nm之吸光係數設為1.37而算出濃度。

[實施例6]

人類化抗體之製作

(1)人類化Lym2抗體重鏈及輕鏈可變區之設計

(i)人類化Lym2抗體之VL及VH之胺基酸序列之設計

如下所述設計人類化Lym2抗體之VL之胺基酸序列。

首先，如下所述選擇適合Lym2抗體之VL之CDR1~3之胺基酸序列(序列編號23、24、25)之移植的人類抗體之VL之FR之胺基酸序列。

已知之人類抗體重鏈可變區序列係自美國國家生物技術信息中心(The National Center for Biotechnology Information)提供之BLASTP

資料庫，檢索與Lym2抗體之VL之FR序列的同源性較高之人類抗體序列。其結果為，GeneBank ID：ABA71374.1係同源性最高之人類抗體序列，因此選擇該抗體之FR。於如上所述而確定之人類抗體FR序列之適宜位置移植序列編號23、24、25所表示之Lym2抗體之VL之CDR1~3之胺基酸序列，藉此設計LV0(序列編號33)。

其次，如下所述設計人類化Lym2抗體之VH之胺基酸序列。如下所述選擇適合Lym2抗體之VH之CDR1~3之胺基酸序列(序列編號20、21、22)之移植的人類抗體VH之FR之胺基酸序列。VL亦同樣地自BLASTP資料庫檢索與Lym2之VH之FR序列的同源性較高之人類抗體序列。

其結果為，GeneBank ID：AAY33331.1係同源性最高之人類抗體序列，因此選擇該抗體之FR。於如上所述而確定之人類抗體FR序列之適宜位置移植序列編號20、21、22所表示之Lym2抗體之VH之CDR1~3之胺基酸序列，藉此設計HV0(序列編號49)。

上述所設計之人類化Lym2抗體之VL之胺基酸序列LV0、及VH之胺基酸序列HV0係於所選擇之人類抗體之FR之胺基酸序列中僅移植作為大鼠單株抗體之源自Lym2之CDR之胺基酸序列的序列。然而，通常於製作人類化抗體之情形時，僅將源自啮齒類之抗體的CDR之胺基酸序列移植至人類抗體之FR時結合活性降低之情況較多。

為了避免此種結合活性之降低，而進行CDR之胺基酸序列之移植，並且進行人類抗體與啮齒類抗體間不同之FR之胺基酸殘基中認為對結合活性產生影響之胺基酸殘基之置換。因此，於本實施例中，亦如下所述對認為對結合活性產生影響之FR之胺基酸殘基進行鑑定、置換。

首先，使用電腦模型化之方法而構建上述所設計之人類化Lym2抗體之包含VL之胺基酸序列LV0、及VH之胺基酸序列HV0的抗體可

變區(以下記為LV0HV0)之三維結構。

於三維結構座標製作及三維結構之顯示中使用 Discovery Studio(Accelrys公司)。又，Lym2抗體之可變區之三維結構之電腦模型亦同樣地進行而構建。進而，於LV0HV0之VL及VH之FR之胺基酸序列中，選擇與Lym2抗體不同之胺基酸殘基，製作修飾為Lym2抗體之胺基酸殘基之胺基酸序列，同樣地構建三維結構模型。對該等所製作之Lym2抗體、LV0HV0及修飾體之各可變區之三維結構進行比較，若對抗體之結合活性造成影響，則鑑定所預測之胺基酸殘基。

其結果為，於LV0HV0之FR之胺基酸殘基中使抗原結合部位之三維結構變化，作為認為對抗體之結合活性造成影響之胺基酸殘基，分別於LV0中選擇序列編號33之胺基酸序列之第2號之Ile、第4號之Met、第15號之Pro、及第85號之Ala，於HV0中選擇序列編號49之胺基酸序列之第18號之Leu、第77號之Asn、第93號之Val、及第117號之Thr。

該等所選擇之胺基酸殘基中，進行將至少1個以上胺基酸序列置換為Lym2抗體之相同部位所存在之胺基酸殘基的胺基酸修飾，設計具有各種修飾之人類化抗體之VL及VH。具體而言，關於VL，導入將序列編號33之胺基酸序列之第2號之Ile置換為Val、將第4號之Met置換為Leu、將第15號之Pro置換為Leu、或將第85號之Ala置換為Pro的胺基酸修飾中之至少1個修飾。關於VH，導入將序列編號49之胺基酸序列之第18號之Leu置換為Met、將第77號之Asn置換為Ser、將第93號之Val置換為Thr、或將第117號之Thr置換為Val之胺基酸修飾中之至少1個修飾。

作為將LV0HV0、或LV0HV0之FR中所存在之至少1個胺基酸殘基修飾而成之人類化Lym2抗體之抗體可變區，分別設計LV0HV0、LV1HV0、LV2aHV0、LV2bHV0、LV2cHV0、LV3aHV0、LV3bHV0、

LV4HV0、LV0HV4、LV1HV4、LV2aHV4、LV2bHV4、LV2cHV4、LV3aHV4、LV3bHV4、LV4HV4、LV0HV1、LV0HV2a、LV0HV2b、及LV0HV3。

於以下之記述中，將包含上述可變區之人類化Lym2抗體分別略記為LV0HV0、LV1HV0、LV2aHV0、LV2bHV0、LV2cHV0、LV3aHV0、LV3bHV0、LV4HV0、LV0HV4、LV1HV4、LV2aHV4、LV2bHV4、LV2cHV4、LV3aHV4、LV3bHV4、LV4HV4、LV0HV1、LV0HV2a、LV0HV2b、及LV0HV3。

將輕鏈可變區LV0(序列編號33)、LV1(序列編號35)、LV2a(序列編號37)、LV2b(序列編號39)、LV2c(序列編號41)、LV3a(序列編號43)、LV3b(序列編號45)、LV4(序列編號47)、及重鏈可變區HV0(序列編號49)、HV1(序列編號51)、HV2a(序列編號53)、HV2b(序列編號55)、HV3(序列編號57)、HV4(序列編號59)之胺基酸序列分別示於圖1及圖2中。

(ii)人類化Lym2抗體之可變區基因之設計

編碼人類化抗體之可變區之胺基酸序列的鹼基序列係使用於動物細胞中高頻度地使用之密碼子而設計。使用該等鹼基序列，進行以下所示之人類化Lym2抗體表現載體之構建及對應之抗體之表現。

(2)人類化Lym2抗體表現載體之構建

基於實施例5-(1)中所記載之方法，構建人類化Lym2抗體表現載體。即，全合成分別編碼序列編號33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57及59所示之胺基酸序列的序列編號32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56及58所示之鹼基序列之DNA，藉由序列編號28-31所示之引子，以PCR擴增對應之VL、VH基因片段。基因片段係使用瓊脂糖凝膠電泳，藉由QIA快速凝膠提取套組(QIAGEN公司)而進行純化。

使用In-Fusion HD選殖套組(Clontech公司)，依照附隨之說明書，將VL或VH片段分別向人類κ鏈固定區表現載體(BglII/BsiWI處理)及人類重鏈(IgG1)固定區表現載體(SalI/NheI處理)進行次選殖。使用所製作之載體而對大腸桿菌 DH5α勝任細胞(塔卡拉生物公司)進行轉形，實施質體提取、序列確認，選擇插入有正確之序列的菌落，為了短暫性表現而進行質體之大量製備。

(3)人類化Lym2抗體之短暫性表現

所製作之人類化Lym2抗體之短暫性表現係以實施例5-(2)中所記載之FreeStyle(商標)CHO表現介質(Lifetechnologies公司)中所適應之CHO細胞為宿主，使用FreeStyle(商標)MAX CHO表現系統(Lifetechnologies公司)而進行。質體導入之方法依照附隨之說明書。輕鏈表現載體與重鏈表現載體以1：2之比率加以混合而使用。

於培養液量為200 mL下進行，於37°C、8%CO₂、125 rpm之設定條件下培養5日。於培養後，進行細胞懸浮液之離心分離，通過0.2 μm過濾器(ThermoScientific公司)而回收含有人類化Lym2抗體之培養上清液。

(4)人類化Lym2抗體之純化

藉由以下所示之使用MabSelect SuRe(GE Healthcare公司)之親和純化，對人類化Lym2抗體進行純化。藉由PBS對樹脂進行平衡化之後，裝載(3)中所獲得之培養上清液，藉由PBS進行2次清洗。

於清洗後，使用溶出緩衝劑(20 mM 檸檬酸、50 mM NaCl、pH值3.4)使抗體溶出，加入1/10量之中和緩衝劑(1 M 磷酸-NaOH、pH值7.0)進行中和。繼而使用NAP25(GE Healthcare公司)於PBS中進行緩衝劑置換。使用Amicon Ultra-4離心過濾裝置(Centrifugal Filter Units)(Millipore公司)進行利用超濾之濃縮，使用Nanodrop8000(Thermo Scientific公司)而測定280 nm之吸光度(A₂₈₀)，

進行抗體溶液之濃度測定及製備。

[實施例7]

chLym2及人類化Lym2抗體之抗原結合活性

藉由0.25% Trypsin-EDTA(Nacalai Tesque公司)剝離FLAG融合人類CRTH2表現3Y1-B細胞，藉由PBS進行清洗後，藉由SM進行懸浮。其次，以細胞數於每1個孔成為 1×10^5 個之方式播種於96孔板中，添加各最終濃度為50000、12500、3125、781、195、49、12及3 ng/mL之chLym2或人類化Lym2抗體，於4°C下進行60分鐘之反應。

藉由SM對細胞進行清洗後，添加藉由SM稀釋為500倍之山羊F(ab')₂抗人類IgG PE(γ 鏈特異性)(Southern Biotech公司)，於4°C下進行60分鐘之反應。藉由SM對細胞進行清洗後，藉由50 μ L之SM對細胞進行再懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)而測定螢光強度。

藉由FlowJo 7.65(Tomy Digital Biology公司)分析資料，根據各濃度之Geomean值進行Logistic曲線之曲線擬合，使用統計分析語言R(Ver.3.02)而算出chLym2及各人類化Lym2抗體之結合之50%有效濃度(50% effective concentration)(EC₅₀)值及其標準誤差(standard error, SE)值。將結果表示於表1中。

[表1]

No.	mAb	EC ₅₀ 值(μ g/mL)	No.	mAb	EC ₅₀ 值(μ g/mL)
1	chLym2	0.54±0.072	13	chLym2	0.50±0.077
2	LV0HV0	0.87±0.052	14	LV2bHV4	0.59±0.038
3	LV1HV0	0.69±0.057	15	LV2cHV4	0.54±0.070
4	LV2aHV0	0.66±0.053	16	LV3aHV4	0.76±0.135
5	LV2bHV0	0.67±0.061	17	LV3bHV4	0.53±0.095
6	LV2cHV0	0.68±0.071	18	LV4HV4	0.68±0.116
7	LV3aHV0	0.70±0.078	19	LV0HV0	0.55±0.052
8	LV3bHV0	0.81±0.050	20	LV0HV1	0.78±0.088
9	LV4HV0	0.74±0.076	21	LV0HV2a	0.65±0.077
10	LV0HV4	0.58±0.052	22	LV0HV2b	0.72±0.064

11	LV1HV4	0.58±0.045	23	LV0HV3	0.69±0.032
12	LV2aHV4	0.51±0.068	24	LV0HV4	0.67±0.023

其結果為，如表1所示那樣，暗示了各種人類化抗體具有與嵌合抗體同等之人類CRTH2反應性。

[實施例8]

chLym2及人類化Lym2抗體對於嗜酸性球、嗜鹼性球之除去(depletion)活性

將加入肝素鈉注射液而採取之人類末梢血液於4°C下進行1500 rpm、30分鐘之離心分離而回收血漿。

● 於回收血漿後之包含紅血球之顆粒中加入PBS(Nacalai Tesque公司)而恢復為原來之血液體積，相對於1 mL懸浮者而添加10 mL之溶血用溶液[藉由殺菌水將10×RBC Lysis buffer(e-bioscience公司)稀釋為10倍而成者]而進行倒置混合。於室溫下放置10分鐘後，於常溫下進行1500 rpm、5分鐘之離心分離，除去上清液，藉由PBS進行2次清洗。

其後，藉由所回收之血漿使細胞顆粒懸浮，以300 μL/孔播種於48孔板中，添加各最終濃度為1000、100、33、11、3.7、1.2、0.4及0.01 ng/mL之chLym2、各人類化Lym2抗體LV0HV0、LV0HV1、● LV0HV2a、或同型對照抗體[使用Clin Cancer Res 2005, 11(8), 3126-3135中所記載之抗2,4-二硝基酚(DNP)IgG1抗體之載體，基於實施例5中所記載之方法而製作之IgG1抗體(以下記為抗DNP IgG1抗體)]，於37°C、5% CO₂之培養箱內進行20小時之反應。

於反應後，回收各孔之細胞液，添加10 mL添加之SM，以200 μL/樣品而添加作為對照顆粒之CountBright Absolute Counting Beads、for flow cytometry(Molecular Probes公司)後，於4°C下進行2000 rpm、10分鐘之離心分離，除去上清液。藉由SM進行2次清洗，以300 μL/樣品添加藉由SM而稀釋之10000 μg/mL 源自人類血清之

IgG (IgG from human serum)(Sigma-Aldrich公司)，進行懸浮後，於4℃下進行30分鐘之反應。

其後，以40 μL/孔播種於96孔板中，作為嗜酸性球之檢測，添加5 μL/孔之PE 抗人類Siglec-8抗體(BioLegend公司)，作為嗜鹼性球之檢測，添加5 μL/孔之PE-Cy7小鼠抗人類CD123(BD Bioscience公司)及抗人類 Fc ε受體 I α (FcεR1) APC (eBioscience公司)，於4℃下進行40分鐘之反應。

藉由SM進行2次清洗後，藉由含有1%之7-AAD染色溶液(BD Bioscience公司)之SM而使細胞懸浮，於4℃下進行10分鐘放置後，使用流式細胞儀(BD Bioscience公司製造、FACS CantoII)而分析螢光強度。

人類嗜酸性球係作為FSC-SSC展開之顆粒球組分中之7-AAD陰性、siglec8-PE陽性組分而檢測出。人類嗜鹼性球係作為FSC-SSC展開之淋巴球組分中之7-AAD陰性、CD123-PC-Cy7陽性、FcεRI-APC陽性組分而檢測出。細胞除去活性係藉由分析一定數量之CountBright之統計數中之各個細胞之統計數而進行評價。

其結果為，如圖3(A)~圖3(C)所示那樣，可知所評價之人類化Lym2抗體LV0HV0、LV0HV1及LV0HV2a均顯示出與嵌合Lym2抗體chLym2同等之對於嗜酸性球及嗜鹼性球之細胞毒殺活性。

[實施例9]

比較對照用抗人類CRTH2抗體之製作

(1)比較對照用抗人類CRTH2抗體表現載體之製作

全合成國際公開第2014/144865號中所記載之編碼抗人類CRTH2單株抗體hu19A2 v52、hu8B1 v1、mu8B1、mu3C12及mu31A5之VH及VL之胺基酸序列(分別於國際公開第2014/144865號中以SEQ ID NOs：57及40、64及52、62及50、63及51、以及65及53而表示)的鹼

基序列。

基於實施例5-(1)中所記載之方法，以成為各個抗體之VH及VL之組成之方式將上述鹼基序列併入至抗體表現載體中，分別製作5種比較對照用人類化或嵌合抗人類CRTH2抗體(分別為hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch8B1、ch3C12及ch31A5)表現載體。

(2)比較對照用抗人類CRTH2抗體之短暫性表現細胞之製作及抗體之純化

基於實施例5-(2)及(3)中所記載之方法，使hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch8B1、ch3C12或ch31A5之抗體表現載體於宿主細胞中短暫性表現，自培養上清液進行各個抗體之純化。

[實施例10]

使用人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞之抗人類CRTH2單株抗體之抗原決定基分析

(1)人類CRTH2胺基酸置換體表現載體之製作

製作於人類CRTH2之胺基酸序列中，將細胞外區域之胺基酸殘基部分性地置換為其他胺基酸殘基的胺基酸置換體的表現載體。具體而言，分別製作表現如下之胺基酸置換體之載體，上述胺基酸置換體於序列編號2所表示之胺基酸序列中進行了S2A；N4A；T6A及L7A；K8A、P9A及L10A；P12A、L14A及E15A；Q16E、R19H及Q21R；H23A、S24A及N25A；T26A、S27A及I28A；D171A、T172A及I173A；S174A、R175A及L176A；D177A、G178A及R179A；I180A及M181A；Y183A、Y184A及N185A；L187A、L188A及L189A；N190A；P191A；G192A；P193A；D194A；R195A；D196A及T198A；N275A、G277A及L278A；P276A；P279A及L281A；P280A；或V282A、R283A及R284A之置換。再者，上述胺基酸置換之記號係表示[置換前之胺基酸殘基之1字元表記][自N末端數起之置

換之位置][置換後之胺基酸殘基之1字元表記]。

作為表現載體，使用phmAG1-MNLinker(MBL公司)，於BamHI及HindIII之限制酶部位插入編碼使起始終止密碼子缺失而成之各種胺基酸置換體的基因，藉此於細胞內C末端區附加Azami-Green之標籤。

表現上述胺基酸置換體之載體可藉由如下方法而製作：1)全合成編碼胺基酸置換體的基因序列，插入至載體中的方法；或者2)自插入有編碼序列編號1中所示之野生型人類CRTH2胺基酸序列的DNA之載體，進行定點突變導入。

(2)人類CRTH2胺基酸置換體短暫性表現細胞之作成

於人類CRTH2胺基酸置換體之表現細胞株之製備中使用CHO-S細胞(LifeTechnologies公司)。於細胞之繼代中使用含有8 mM L-麩醯胺酸(invitrogen公司)之Free style CHO表現介質(invitrogen公司)，於37℃、5% CO₂之條件下進行振盪培養。

分別將(1)中所製作之25 μg之人類CRTH2胺基酸置換體表現載體溶解於400 μL之Opti-Pro SFM(invitrogen公司)中，而且將25 μL之Freestyle MAX 試劑(invitrogen公司)溶解於400 μL之Opti-Pro SFM中，於室溫下放置5分鐘。將上述二液加以混合，於室溫下放置15分鐘。將該混合溶液添加於上述CHO-S培養液中進行24小時培養，藉此獲得人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞株。

(3)使用人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞的獲得抗體之反應性分析

將(2)中所創造之人類CRTH2胺基酸置換體表現CHO-S細胞藉由SM加以清洗後，以每1個孔中成為 2×10^5 個細胞之方式播種於96孔板中，以1700 rpm進行2分鐘之離心分離。將上清液除去後，添加藉由SM以成為10 μg/mL之方式而製備之chLym2、LV0HV1、實施例9中所製作之抗人類CRTH2抗體hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch3C12或

ch31A5、或市售之大鼠抗人類CRTH2抗體BM16(santa cruz公司)，於4°C下進行1小時之反應。

將細胞加以清洗後，分別以最終濃度成為10 µg/mL之方式於添加有chLym2、LV0HV1、hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch3C12或ch31A5之孔中添加藉由SM而稀釋之山羊抗人類IgG alexa647(Molecular Probes公司)，於添加有BM16之孔中添加藉由SM而稀釋之山羊抗大鼠IgG alexa647(Molecular Probes公司)，於4°C下進行1小時之反應。

於反應後，將細胞加以清洗，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)而分析螢光強度。關於分析，自全細胞中閘控(gating) Azami-Green之陽性細胞，分析該集團中之各抗體之反應性。

又，為了修正各變異體間之表現水準，各抗體之結合的Alexa647之螢光強度除以於C末端區域所附加之Azami-Green之螢光強度而算出相對螢光強度，作為各抗體之反應性。繼而，關於各抗體而分析將各抗體相對於野生型人類CRTH2表現細胞之螢光強度設為100%時的於人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞中之相對螢光強度。

其結果為，如圖4~圖7所示那樣，可知人類化Lym2抗體LV0HV1於P12A、L14A及E15A；D177A、G178A及R179A；I180A及M181A；Y183A、Y184A及N185A；L187A、L188A及L189A；G192A；D194A；R195A；或D196A及T198A之人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞中之反應性消失。

又可知，除此以外，嵌合Lym2抗體chLym2於D171A、T172A及I173A之人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞中之反應性消失。人類化Lym2抗體LV0HV1於包含D171A、T172A及I173A之人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞中之反應性大幅降低，因此暗示著LV1HV0及cLym2均結合於先相同之抗原決定基上。

另一方面，本次進行比較之其他抗人類CRTH2抗體於與本發明之抗人類CRTH2抗體不同之部位的人類CRTH2胺基酸置換體表現細胞中之反應性明顯降低，因此可知既有之其他抗人類CRTH2抗體識別與本申請發明之抗體不同之抗原決定基。

進而，詳細確認於各胺基酸置換體表現細胞中之反應性，結果既有之抗人類CRTH2抗體均於包含G192A或D194A之胺基酸置換體表現細胞中之反應性不降低，僅本申請發明之抗體於該細胞中之反應性降低，可知本申請發明之抗人類CRTH2抗體與包含人類CRTH2之Gly192及Asp194之至少1個胺基酸殘基的抗原決定基結合。

[實施例11]

針對人類嗜酸性球之反應性評價

對於加入肝素鈉注射液而採取之人類末梢血液，添加等量之注射用生理鹽水而加以混合。於50 mL容量之離心管中添加15 mL之Ficoll-Paque PREMIUM1.084(GE healthcare公司)，重層30 mL之藉由生理鹽水而稀釋之上述人類末梢血液，於室溫下、以1500 rpm進行30分鐘之離心分離。

於離心分離後，藉由吸出器將血漿層、單核球層及Ficoll層之一半除去，以及使用殺菌之棉棒將附著於離心間之壁面的血小板除去。其後，將進行了殺菌之冰浴冷卻水27 mL分注於各管中而進行30秒之溶血。

其後，添加3 mL之冰浴冷卻之10×PIPES緩衝液[於500mL之蒸餾水中溶解有32.15 g氯化鈉(和光純藥公司)、1.85 g氯化鉀(Nacalai Tesque公司)、38 g PIPES(piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)、哌嗪-1,4-雙(2-乙基磺酸)，Nacalai Tesque公司)、8.4 g氫氧化鈉(Nacalai Tesque公司)者]而恢復至等張，於4°C下以1200 rpm進行5分鐘之離心分離。於離心分離結束後，抽吸上清液，加入2 mL之

1×PIPES緩衝液[使用蒸餾水將10×PIPES緩衝液稀釋為10倍之溶液]而使細胞顆粒解散。

再次重複上述溶血操作，使用於autoMACS漂洗溶液(Miltenyi Biotec公司)中添加有MACS BSA儲備溶液(Miltenyi Biotec公司)者(以下，略記為MACS緩衝劑)而對所獲得之細胞顆粒進行2次清洗。

於對細胞數進行計數後，使用CD16 MicroBeads、人類(Miltenyi Biotec公司)，依照附隨之說明書而藉由負選擇(negative selection)法對嗜酸性球進行單離。

藉由SM對所單離之細胞進行清洗後，以每1孔中成為 1×10^5 個細胞之方式播種於96孔板中，以2000 rpm進行2分鐘之離心分離。將上清液除去後，添加藉由SM而進行了稀釋的各最終濃度為10、3.3、1.1、0.37、及0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之Lym2抗體、市售CRTH2抗體之BM16(santa cruz公司)或301108(R&D公司)，於 4°C 下進行1小時之反應。

將細胞加以清洗後，分別以最終濃度為10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而於添加有Lym2抗體或BM16之孔中添加藉由SM而進行了稀釋之CELL LAB 小鼠抗大鼠 κ (κ 輕鏈特異性)FITC(貝克曼庫爾特公司)，於添加有301108之孔中添加藉由SM而進行了稀釋之CELL LAB 山羊抗小鼠 IgG(γ 鏈特異性)螢光素(FITC)結合(貝克曼庫爾特公司)，於 4°C 下進行1小時之反應。再次對細胞進行清洗後，藉由SM使懸浮細胞，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司製造、FACS CantoII)而分析螢光強度。

其結果可知：大鼠抗人類CRTH2抗體Lym2針對人類嗜酸性球顯示出比市售之大鼠抗人類CRTH2抗體BM16及小鼠抗人類CRTH2抗體301108更強之反應性(圖8)。

[實施例12]

針對人類嗜鹼性球之chLym2之反應性

對於加入肝素鈉注射液而採取之人類末梢血液，添加等量之注

射用生理鹽水而加以混合。於50 mL容量之離心管中添加15 mL之Ficoll-Paque PREMIUM 1.084(GE healthcare公司)，重層30 mL之藉由生理鹽水而進行了稀釋之人類末梢血液，於室溫下以1500 rpm進行30分鐘之離心分離。

於離心分離後，藉由吸管回收單核球層，使用MACS緩衝劑而進行2次清洗。對細胞數進行計數後，使用嗜鹼性球隔離套組II，人類(Miltenyi Biotec公司製造)，依照附隨之說明書而藉由負選擇法對嗜鹼性球進行單離。

藉由SM將所單離之細胞加以清洗後，以每1個孔中成為 5×10^4 個細胞之方式播種於96孔板中，以2000 rpm進行2分鐘之離心分離。將上清液除去後，藉由100 μ L之SM使細胞懸浮，使用Zenon Alexa Fluor 647 人類IgG標記套組(Molecular Probes公司製造)，依照附隨之說明書而進行標記，以最終濃度成為10 μ g/mL之方式添加chLym2或實施例8中所記載之同型對照抗體，於4°C下進行1小時之反應。對細胞進行清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)而分析螢光強度。

其結果為，針對人類嗜鹼性球而確認chLym2之反應性(圖9)。因此，可知本申請發明之嵌合抗人類CRTH2抗體cLym2與嗜鹼性球結合。

[實施例13]

人類化Lym2抗體對於人類CD4陽性T細胞之反應性

基於實施例12，將使用Ficoll-Paque PREMIUM(GE healthcare公司)代替Ficoll-Paque PREMIUM 1.084而製備之單核球層之細胞懸浮液以100 μ L/孔播種於96孔板中，使用EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，No-Weigh Format(PIERCE公司)，依照附隨之說明書以最終濃度成為10 μ g/mL之方式添加進行了生物素標記之人類化Lym2抗體LV0HV1，

於4°C下進行1小時之反應。

將細胞加以清洗後，添加藉由SM而進行了稀釋之最終濃度為10 µg/mL之抗生蛋白鏈菌素(streptavidin)、及附隨之說明書中所記載之量之Alexa Fluor647結合(Molecular Probes公司)、FITC抗人類CD3抗體(BioLegend公司)及CD4抗體、純系SK3、PE-結合(stem cell technology公司)，於4°C下進行1小時之反應。

再次將細胞加以清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)而分析螢光強度。分析係對於藉由FSC-SSC展開而對淋巴球進行區分，進而藉由CD3陽性且CD4陽性細胞進行區分之細胞群，將人類化Lym2抗體LV0HV1之螢光染色之螢光強度表示於縱軸，將CD4抗體之螢光染色之螢光強度表示於橫軸，藉此算出CD3陽性CD4陽性細胞中之人類化Lym2抗體LV0HV1之反應性組分之比例。其結果為，CD3陽性CD4陽性之T細胞組分之約2~3%與人類化Lym2抗體LV0HV1反應(圖10)。

[實施例14]

對於嗜酸性球、嗜鹼性球之細胞毒殺活性

將與實施例8同樣地進行而製備之細胞懸浮液以95 µL/孔播種於96孔板中，添加各最終濃度為1000、10、3、1、0.3、0.1 ng/mL之被試驗抗體，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應20小時。作為被試驗抗體，使用人類化Lym2抗體LV0HV1、實施例9中所製作之抗人類CRTH2抗體hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch3C12及ch31A5。作為同型對照抗體，使用抗DNP IgG1抗體。

於反應後之各孔中，以100 µL/孔添加SM，以20 µL/孔添加CountBright Absolute Counting Beads,for flow cytometry(Molecular Probes公司)作為對照顆粒，於4°C下以2000 rpm進行2分鐘之離心分離，除去上清液。藉由SM進行2次清洗，以100 µL/孔添加藉由SM而

進行了稀釋之 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 源自人類血清之 IgG(Sigma-Aldrich 公司)，於 4°C 下使其反應 30 分鐘。以後藉由與實施例 8 同樣之方法而進行。

其結果為，人類化抗人類 CRTH2 抗體 LV0HV1 亦抗體濃度依賴性地將嗜酸性球及嗜鹼性球之任意細胞除去。與人類化抗人類 CRTH2 抗體 LV0HV1 相比而言，既有之抗人類 CRTH2 抗體 ch3C12 之除去細胞之活性較弱 [圖 11(A) 及圖 11(B)]。因此，暗示本申請發明之抗人類 CRTH2 抗體可揮發以表現 CRTH2 之嗜酸性球或嗜鹼性球為標的之治療效果。

[實施例 15]

對於 Th2 細胞之細胞毒殺活性

將與實施例 13 同樣地進行而製備之單核球層，藉由添加有 1/10 volume FBS(Gibco 公司)、200 mM-L-麩醯胺酸儲備溶液(Nacalai Tesque 公司)、10 mM MEM 非必要胺基酸溶液(Gibco 公司)、100 mM 丙酮酸鈉(Gibco 公司)、1 M HEPES 緩衝液(Gibco 公司)及 1/100 volume 青黴素-鏈黴素，液體(Gibco 公司)之 RPMI1640(和光純藥公司)[以下記為 PBMC(peripheral blood mononuclear cell, 末梢血液單核細胞)培養培養基]進行 2 次清洗，製備 1×10^7 個細胞/mL 之細胞懸浮液。

將所製備之細胞懸浮液以 100 μL /孔播種於 96 孔板中，以最終濃度為 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而添加 chLym2 抗體、人類化抗人類 CRTH2 抗體 LV0HV1 或實施例 8 中所記載之同型對照抗體，於 37°C 、5% CO_2 之培養箱內進行 20 小時之反應。

將反應後之細胞於 PBMC 培養培養基中進行 7 次清洗，將被試驗抗體充分除去後，使其懸浮於 100 μL 之 PBMC 培養培養基中，將抗 CD3 抗體 OKT3(Abcam 公司)以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度播種於固相化之板上。其後，以 100 μL /孔添加製備為 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之抗 CD28 抗體(BD Bioscience

公司)，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應3日。

回收反應後之上清液，使用人類IFN- γ Flex Set(BD Bioscience公司)、人類 IL-5 Flex Set(BD Bioscience公司)、人類IL-13 Flex Set(BD Bioscience公司)，依照附隨之說明書而進行上清液中細胞激素之定量。

其結果為，嵌合抗人類 CRTH2 抗體 chLym2 及人類化抗人類 CRTH2 抗體 LV0HV1 使作為 Th2 細胞激素之 IL-5 及 IL-13 之產生減少，但其另一方面，作為 Th1 細胞激素之 IFN- γ 之產生不變化。即，暗示了本發明之抗體選擇性除去 Th2 細胞[圖 12(A) 及圖 12(B)]。因此，暗示了本發明之抗人類 CRTH2 抗體可發揮以 Th2 細胞為標的之治療效果。

[實施例 16]

配位子之存在下的反應性評價(293EBNA)

使用 Fugene6(Promega 公司)將實施例 1-(1)-(ii) 中所製作之人類 CRTH2 基因表現 pAMoh 載體導入至 293EBNA 細胞(invitrogen 公司)中，藉由包含 10% FBS、0.25 mg/mL G418(Nacalai Tesque 公司)、100 μ g/mL 青黴素、100 U/mL 鏈黴素(Nacalai Tesque 公司)及 300 μ g/mL 潮黴素 B(和光純藥公司)DMEM 之培養基而選擇耐藥劑性細胞，創造人類 CRTH2 表現 293EBNA 細胞。

藉由 0.02% EDTA 溶液(Nacalai Tesque 公司)剝離人類 CRTH2 表現 293EBNA 細胞，藉由 PBS 而加以清洗後，藉由上述培養基使其懸浮。其次，以成為 1×10^5 個細胞/90 μ L/孔之方式播種於 96 孔板中，以最終濃度成為 10 μ M 之方式添加 DKPGD2(Cayman chemical 公司)。

於 37°C、5% CO₂ 之培養箱內放置 15 分鐘後，添加各最終濃度為 0.3、1 及 3 μ g/mL 之人類化 Lym2 抗體 LV0HV1、公知之抗人類 CRTH2 抗體 hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch3C12、ch31A5、BM16(santa cruz 公司)或 301108(R & D 公司)，於常溫下進行 30 分鐘之反應。

藉由SM對細胞進行5次清洗後，分別以最終濃度為10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而於添加有LV0HV1、hu19A2 v52、hu8B1 v1、ch3C12或ch31A5之孔中添加藉由SM進行了稀釋之10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊抗人類IgG Alexa647(Molecular Probes公司)，於添加有BM16之孔中添加藉由SM而進行了稀釋之10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊抗大鼠IgG Alexa647(Molecular Probes公司)，於添加有301108之孔中添加藉由SM進行了稀釋之10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊抗小鼠IgG Alexa647(Molecular Probes公司)，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下進行40分鐘之反應。再次對細胞進行清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)分析螢光強度。

其結果為，如圖13(A)~(C)所示那樣，既有之抗人類CRTH2抗體均係於作為人類CRTH2配位子之DKPGD2之存在下，於人類CRTH2表現細胞上之結合降低，相對於此，人類化Lym2抗體LV0HV1於所研究之任意抗體濃度下，於人類CRTH2表現細胞上之結合均基本不降低。

即，可知本發明之抗體於高濃度之配位子之存在下亦具有較高之反應性。因此，本發明之抗人類CRTH2抗體即使於配位子之存在下，亦可與配位子之非存在下之反應性同等地結合於人類CRTH2表現細胞上，暗示了其係可對該人類CRTH2表現細胞起作用之有用之抗體。

[實施例17]

對於分化誘導人類肥大細胞之反應性分析

基於Nature Protocols 2006, 1(4), 2178-2183中所記載之方法而製備肥大細胞。藉由SM對分化誘導開始起11週之時間點之肥大細胞進行清洗，以每1個孔中成為 5×10^4 個細胞之方式播種於96孔板中，添加PE 抗人類CD203c(E-NPP3)抗體(BioLegend公司製造)、Brilliant Violet 421(商標)抗人類CD117(c-kit)抗體(BioLegend公司製造)、抗人類Fc ϵ 受體I α (Fc ϵ R1)PE(eBioscience公司製造)，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下進行1小時之

反應。對細胞進行清洗後，藉由SM使其懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司製造、FACS CantoII)而分析螢光強度。

其結果可確認：進行了分化誘導之肥大細胞可表現作為肥大細胞表面標記物之CD203c、CD117、FcεRI之任意者。

於自分化誘導開始起15週之時間點之肥大細胞培養液中，以最終濃度為10 μg/mL而添加將抗DNP IgG1抗體之固定區重組為IgE型之人類IgE，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應3日。

藉由添加有最終濃度為100 μg/mL之青黴素、100 U/mL之鏈黴素(Nacalai Tesque公司)及55 μM之β-ME(Gibco公司)的IMDM(Gibco公司)(以下略記為basic culture medium，基礎培養基)對反應後之肥大細胞進行2次清洗，藉由4 mL之基礎培養基使其懸浮，添加最終濃度為10μg/mL之兔多株抗人類IgE抗體(Dako公司)，一面使用MACS mix tube rotator(Miltenyi Biotec公司)使其旋轉，一面於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應1小時。

藉由SM對反應後之細胞進行二次清洗，以每1個孔中成為 5×10^4 個之方式播種於96孔板中，以2000 rpm進行2分鐘之離心分離。將上清液除去後，以100 μL/孔添加藉由SM進行了稀釋之10000 μg/mL之源自人類血清之IgG(Sigma-Aldrich公司)，於4°C下使其反應30分鐘，使用EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin，No-Weigh Format(PIERCE公司)，依照附隨之說明書，以最終濃度為10 μg/mL而添加分別進行了生物素標記之人類化抗人類CRTH2抗體LV0HV1、抗人類CRTH2抗體hu19A2 v52、ch8B1、ch3C12或ch31A5、或未標記之市售之抗人類CRTH2抗體BM16(santa cruz公司)或301108(R & D公司)，於4°C下進行1小時之反應。

再者，作為同型對照抗體，分別對於BM16而使用純化大鼠IgG2a，κ同型控制抗體(BioLegend公司)，對於301108而使用負控制

小鼠IgG2a(Dako公司)，對於除此以外之抗體而使用抗DNP IgG1抗體。

對細胞進行清洗後，以最終濃度為10 µg/mL而於添加有進行了生物素標記之LV0HV1、hu19A2 v52、ch8B1、ch3C12或ch31A5之孔中添加藉由SM進行了稀釋之抗生蛋白鏈菌素、Alexa Fluor 647結合(Molecular Probes公司)，於添加有BM16之孔中添加藉由SM進行了稀釋之山羊抗大鼠IgG Alexa647(Molecular Probes公司)，於添加有301108之孔中添加藉由SM而進行了稀釋之山羊抗小鼠IgG Alexa647(Molecular Probes公司)，於4°C下進行40分鐘之反應。再次對細胞進行清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)分析螢光強度。

其結果為，如圖14所示那樣，hu19A2 v52對肥大細胞顯示反應性，另一方面含有LV0HV1之hu19A2v52以外之抗體並不顯示反應性。

[實施例18]

對於分化誘導Th1之反應性分析

(1)自PBMC分離初始T細胞

藉由含有50 µL之DNase I重組、無RNase(Roche Diagnostics公司)的20 mL之PBMC培養培養基對源自健康人之凍結PBMC(Allcells公司)進行1次清洗，再次懸浮於含有50 µL之DNase I重組、無RNase的20 mL之PBMC培養培養基，於37°C、5% CO₂之培養箱內放置2小時。

其後，藉由實施例11中所記載之MACS buffer進行兩次清洗，使用初始CD4⁺ T Cell隔離套組II人類(Miltenyi Biotec公司)，依照附隨之說明書藉由負選擇法對初始CD4陽性T細胞進行單離。為了提高初始CD4陽性T細胞之純度，實施2次上述負選擇。

(2)自初始CD4陽性T細胞之Th1細胞之分化誘導

藉由添加有10% FBS(Gibco公司)及2 mM 麩胺酸(Nacalai Tesque公司)之RPMI1640(Gibco公司)(以下，略記為培養培養基)，使基於J Immunol, 2002. 169(5):p. 2498-2506中所記載之方法而分離之初始CD4陽性T細胞以 1×10^6 個細胞/mL地懸浮，作為刺激之步驟，將抗CD3抗體OKT3(Abcam公司)以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度播種於固相化之板中，添加最終濃度為2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之抗CD28抗體(BD Bioscience公司)、100 ng/mL之重組人類IL-12(peprotech公司)、10 ng/mL之重組人類IL-2(peprotech公司)、及5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之抗IL-4抗體(BD Bioscience公司)，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應4日。

其後，回收細胞，藉由離心分離而將上清液除去後，藉由培養培養基以 1×10^6 個細胞/mL地懸浮，作為增殖之步驟，添加最終濃度為100 ng/mL之重組人類IL-12(peprotech公司)、10 ng/mL之重組人類IL-2(peprotech公司)及5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之抗IL-4抗體(BD Bioscience公司)，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應3日。

反覆進行上述刺激、增殖之步驟合計3次，藉此創造分化誘導Th1細胞。

(3)自分化誘導Th1細胞之細胞激素產生分析

於(2)之分化誘導Th1細胞培養液中，添加最終濃度為20 ng/mL之佛波醇 12-豆蔻酸酯 13-乙酸酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate)(Sigma-Aldrich公司)、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之來自鏈黴菌之鈣離子黴素(Ionomycin calcium salt from Streptomyces)(Sigma-Aldrich公司)及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之來自佈雷正青黴菌之佈雷非德菌素A (Brefeldin A from Penicillium brefeldianum)(Sigma-Aldrich公司)，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應6小時。其後，以 2×10^5 個細胞/孔播種於96孔板中，藉由PBS(Nacalai Tesque公司)進行清洗。

其後，使用LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit，for

405 nm excitation(Molecular Probes公司)，依照附隨之說明書而對死細胞進行染色，藉由PBS進行兩次清洗後，將上清液除去，使用Fixation Buffer(BD Bioscience公司)而於4°C下使其反應45分鐘。

於反應後，藉由PBS進行1次清洗，藉由1×Perm/Wash Buffer(BD Bioscience公司)進行2次清洗後，添加最終濃度為2.5 μL之PE 抗人類IFN-γ 抗體 (BioLegend公司)、5 μL之APC 抗人類 IL-4 抗體 (BioLegend公司)、10 μL之抗-IL-5抗體APC(Miltenyi Biotec公司)及20 μL之APC抗人類IL-13抗體(BioLegend公司)，於4°C下使其反應30分鐘。

其後，藉由1×Perm/Wash Buffer進行2次清洗，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)分析螢光強度。

其結果確認：分化誘導Th1係IL-4/5/13為陰性、90%為IFN γ 陽性之族群(population)，且確認其係選擇性產生Th1細胞激素之細胞。

(4)抗人類CRTH2抗體對於分化誘導Th1細胞之反應性分析

藉由SM將於(2)中所創造之分化誘導Th1細胞加以清洗後，以每1個孔中成為 5×10^4 個細胞之方式播種於96孔板中，以2000 rpm進行2分鐘之離心分離。將上清液除去後，添加藉由SM而進行了稀釋之10 μg/mL之大鼠抗人類CRTH2抗體Lym2、公知之抗人類CRTH2抗體BM16(santa cruz公司)或301108(R&D公司)，於4°C下進行1小時之反應。

作為同型對照抗體，分別對於Lym2而使用大鼠IgG2b、 κ 單株[RTK4530]-BSA/Azide free(abcam公司)，對於BM16而使用純化大鼠IgG2a、 κ 同型控制抗體(BioLegend公司)，對於301108而使用負控制小鼠IgG2a(Dako公司)。

對細胞進行清洗後，以最終濃度為10 μg/mL而分別於添加有

Lym2抗體或BM16之孔中添加藉由SM進行了稀釋之10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之CELL LAB小鼠抗大鼠 κ (κ 輕鏈特異性)FITC(貝克曼庫爾特公司)，於添加有301108之孔中添加藉由SM而進行了稀釋之10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之CELL LAB 山羊抗小鼠 IgG(γ 鏈特異性)螢光素(FITC)結合(貝克曼庫爾特公司)，於4°C下進行1小時之反應。再次將細胞加以清洗後，藉由SM使細胞懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)而分析螢光強度。

其結果為，如圖15所示那樣，大鼠抗人類CRTH2抗體Lym2及市售之大鼠抗人類CRTH2抗體BM16於分化誘導Th1中並未顯示反應性。另一方面，市售之小鼠抗人類CRTH2抗體301108對於分化誘導Th1顯示出反應性。

因此，可知本發明之抗人類CRTH2抗體雖然與嗜酸性球、嗜鹼性球及Th2細胞反應，但不與Th1細胞反應。又，可知301108除了表現CRTH2之細胞以外，亦非特異性地顯示反應性。

[實施例19]

以人類嗜酸性球之形態變化為指標之Lym2抗體之拮抗劑活性評價

藉由與實施例11同樣之方法，自人類末梢血液進行嗜酸性球之分離。藉由杜貝可磷酸緩衝生理鹽水(以下記為D-PBS(-))(Nacalai Tesque公司)使所單離之人類嗜酸性球懸浮，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應1小時30分鐘。其後，使用含有10%FBS之RPMI1640而以 2×10^5 個細胞/孔播種於96孔板中。其後，添加最終濃度為10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之同型對照抗體[CELL LAB大鼠IgG2b同型控制(貝克曼庫爾特公司)]、或Lym2抗體、或作為陽性對照之最終濃度為10 μM 之CRTH2低分子拮抗劑OC000459(Cayman chemical公司)，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應30分鐘。

其次，添加各最終濃度為0.1、1、10、100及1000 nM之DKPGD2(Cayman chemical公司)，進而於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應60分鐘。於反應後，藉由冰浴冷卻之PBS進行2次清洗，添加200 μL/孔之Fixation Buffer(BD Bioscience公司)，充分懸浮後，於4°C下放置30分鐘。其後，藉由SM進行兩次清洗，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)分析嗜酸性球之形態變化。

嗜酸性球之形態變化係於利用流式細胞儀之分析中，對作為細胞之大小、細胞之表面積或細胞直徑之指標的Foward Scatter Light(FSC)圖之增加指標性地進行分析，以DKPGD2未處理之嗜酸性球之FSC為基準，算出高FSC之閘(gate)中所檢測出之嗜酸性球之比例(%)。

其結果為，如圖16所示那樣，人類CRTH2配位子DKPGD2進行濃度依賴性之嗜酸性球之形態變化誘導，但CRTH2低分子拮抗劑OC000459抑制DKPGD2依賴性之嗜酸性球之形態變化。相對於此，本發明之抗人類CRTH2抗體Lym2及同型對照抗體均未抑制DKPGD2依賴性之嗜酸性球之形態變化。即，暗示了本發明之抗人類CRTH2抗體不具有拮抗劑活性。

[實施例20]

以人類嗜酸性球之形態變化為指標的Lym2抗體之促效劑活性評價

於與上述實施例19同樣之實驗系中，加入各最終濃度為0、0.01、0.1、1及10 μg/mL之大鼠抗人類CRTH2抗體Lym2，使其反應1小時，分析嗜酸性球之形態變化。

其結果為，如圖17所示那樣，Lym2抗體即使於抗體濃度為0-10 μg/mL之範圍進行處理，亦不產生嗜酸性球之形態變化。即，暗示了本發明之抗人類CRTH2抗體不具有促效劑活性。

[實施例21]

以人類嗜酸性球之形態變化為指標的抗人類CRTH2抗體之促效劑活性、拮抗劑活性、配位子之訊息增強活性之評價

藉由與實施例11同樣之方法，自人類末梢血液進行嗜酸性球之分離。但並未進行於血液中添加等量之注射用生理鹽水之操作，直接於Ficoll-Paque PREMIUM 1.084(GE healthcare公司)中進行重層。藉由D-PBS(-)(Nacalai Tesque公司)使所單離係人類嗜酸性球懸浮，於5% CO₂之培養箱內、37°C下使其反應1小時30分鐘。

其後，使用含有10%FBS之RPMI1640，以 0.7×10^5 個細胞/孔而播種於96孔板中。其後，以最終濃度為10 µg/mL而添加同型對照抗體、人類化Lym2抗體LV0HV1、實施例9中所製成之抗人類CRTH2抗體hu19A2 v52、ch8B1、ch3C12或ch31A5、或市售之抗人類CRTH2抗體BM16(santa cruz公司)或301108(R&D公司)，於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應30分鐘。

再者，作為同型對照抗體，對於BM16而使用純化大鼠IgG2a、κ同型控制抗體(BioLegend公司)，對於301108而使用負控制小鼠IgG2a(Dako公司)，對於其他抗體而使用抗DNP IgG1抗體。

其次，添加最終濃度為100 nM之DKPGD2(Cayman chemical公司)或含有10%FBS之RPMI1640，進而於37°C、5% CO₂之培養箱內使其反應60分鐘。於反應後，藉由冰浴冷卻之PBS進行2次清洗，添加100 µL/孔之Fixation Buffer(BD Bioscience公司)，使其充分懸浮後，於4°C下放置30分鐘。其後，藉由SM進行兩次清洗，藉由與實施例19同樣之方法分析嗜酸性球之形態變化。

其結果為，如圖18(A)~(C)所示那樣，關於配位子之非存在下之抗人類CRTH2抗體處理之形態變化，雖然於hu19A2 v52中發現若干形態變化之傾向，但並不存在產生較強之形態變化的抗體，暗示了於任

意之抗體中均不具有促效劑活性。

又，關於DKPGD2處理條件下之抗人類CRTH2抗體處理之形態變化，藉由ch8B1、ch3C12、ch31A5之處理而抑制由於DKPGD2所誘發之形態變化，因此暗示了該等抗體具有拮抗劑活性。本結果與先前專利文獻(國際公開2014/144865號)中之見解一致。

另一方面，可知hu19A2 v52及BM16增強由於DKPGD2而誘發之形態變化。特別所hu19A2 v52將由於100 nM之DKPGD2而誘發之形態變化增強至約2倍。

如上所述，hu19A2 v52及BM16抗體於配位子之非存在下並不誘發形態變化，因此暗示了該等抗體具有作為CRTH2配位子之DKPGD2之訊息增強活性。

另一方面，LV0HV1及301108與同型對照抗體同樣地，於DKPGD2之非存在下、存在下之任意條件下均未對形態變化顯示影響，因此暗示了不具有DKPGD2之訊息增強活性。

本發明之抗人類CRTH2抗體於並不遮斷或增強生理訊息之方面而言較佳。

[實施例22]

CRTH2單株抗體對於便隨著CRTH2活化狀態之變遷的構形變化之反應性評價

(1)辣根過氧化酶(HRP)標記抗體之製作

使用Peroxidase標記套組-NH₂(Dojindo公司)，依照隨附文書，於人類化Lym2抗體LV0HV1及hu19A2 v52上直接標記HRP之後，藉由D-PBS(-)(Nacalai Tesque公司)稀釋為1 mg/mL。

(2)人類CRTH2表現細胞之膜組分之製備

於0.02% EDTA溶液(Nacalai Tesque公司)中剝離實施例1中所創造之人類CRTH2表現CHO/DG44細胞，使用冷卻至4°C之D-PBS(-)而對細

胞進行清洗。使用 Minute 質膜蛋白隔離套組 (Invent Biotechnologies)，依照附隨文書製備膜組分。

(3) 抗人類 CRTH2 抗體對於人類 CRTH2 表現細胞之膜組分的反應性之評價

將添加有 50 mM HEPES(Gibco 公司)、5 mM $MgCl_2$ (Nacalai Tesque 公司)、100 mM NaCl(Nacalai Tesque 公司)及 1 mM EDTA(invitorgen 公司)之 50 mM Tris-HCl buffer pH 值 7.4(Nacalai Tesque 公司)(以下記為 ELISA 反應液)加入至(2)中所製備之膜組分中，以成為 1 mg/mL 之方式進行製備，以 50 μ L/管添加於 Proteosave 1.5 mL 微管(住友電木公司)中。

其次，以 50 μ L/管添加 ELISA 反應液，於 30°C 下進行 1 小時之保溫，上述 ELISA 反應液添加有 500 μ M $GTP\gamma S$ (Roche Diagnostics 公司)或 500 μ M GDP(Sigma-Aldrich 公司)。

繼而，分別以 50 μ L/管添加藉由 D-PBS(-)稀釋為 10 mg/mL 之源自人類血清之 IgG(Sigma-Aldrich 公司)及 30%w/v 之無脂肪酸 BSA-PBS(Wako 公司)，於 30°C 下進行 30 分鐘之保溫。

其次，藉由 ELISA 反應液將(1)中所製作之進行了 HRP 標記之 LV0HV1 或 hu19A2 v52 稀釋為 5 μ g/mL，於以 50 μ L/管進行添加後，於 30°C 下進行 1 小時之保溫，藉此進行對於膜組分之抗體反應。藉由 16000 g 而於 4°C 下進行 30 分鐘之離心後，將上清液除去。

其後，分別於本來添加有 $GTP\gamma S$ 之管中以 1 mL/管添加添加有 100 μ M $GTP\gamma S$ 之 ELISA 反應液，於添加有 GDP 管中，以 1 mL/管添加添加有 100 μ M GDP 之 ELISA 反應液，再次以 16000 g 而於 4°C 下進行 30 分鐘之離心後，除去上清液。反覆進行 4 次同樣之操作後，以 100 μ L/管而添加 D-PBS(-)，使膜組分充分地懸浮。

將懸浮液以 30 μ L/孔添加於 96 孔板中，以 100 μ L/孔添加 1-Step

Ultra TMB-ELISA試劑(Thermo scientific公司)。於室溫下進行10分鐘反應後，以100 μ L/孔添加0.5 mol/L之硫酸(Wako公司)而使反應停止。

藉由SPECTRA max 340PC而測定480 nm之吸光度，使用Graphpad Prism(ver.6.05)而分析所獲得之結果。又，適應Tukey多重比較測試(Tukey's multiple comparisons test)，一併實施有意義差之檢驗。

其結果為，如圖19所示那樣，GDP處理時之hu19A2 v52對於膜組分之反應性與GTP γ S處理時相比而言顯著降低($p < 0.0001$)。另一方面，LV0HV1之反應性於GTP γ S或GDP處理時均未變化($p > 0.1$)。

已知道CRTH2係GPCR，GPCR一般情況下於活化型構形中與GTP結合，於非活化型構形中與GDP結合。如上述結果所示，本發明之抗人類CRTH2抗體無論有無GTP類似物之GTP γ S或GDP之處理，於CRTH2中之反應性均不變化，因此暗示了如下之可能性，並不對伴有CRTH2之活化之構形變化造成影響地顯示一定反應性。

[實施例23]

Azami-Green融合人類及食蟹猴CRTH2表現phmAG1-MNLinker載體之製作

(1)Azami-Green融合人類CRTH2表現phmAG1-MNLinker載體之製作

對於實施例1之(1)-(ii)中所製作之人類CRTH2基因表現pAMoh，使用引子人類CRTH2azami-A(序列編號60)及人類CRTH2azami-B(序列編號61)，藉由PCR對目標片段進行擴增，使用限制酶BamHI及HindIII而與載體phmAG1-MNLinker(MBL公司)連結，構建Azami-Green融合人類CRTH2表現phmAG1-MNLinker載體。

(2)Azami-Green融合食蟹猴CRTH2表現phmAG1-MNLinker載體之

製作

對於使用全合成之食蟹猴CRTH2之cDNA(cDNA序列：序列編號62、胺基酸序列：序列編號63)，藉由與實施例1之(1)-(ii)同樣之方法而構建的食蟹猴CRTH2表現pMoh載體，使用引子cyno CRTH2 azami-A(序列編號64)及cyno CRTH2 azami-B(序列編號65)，與(1)同樣地進行而構建Azami-Green融合食蟹猴CRTH2表現phmAG1-MNLinker載體。

[實施例24]

Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞及食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞之作成

藉由限制酶BsaI處理而切斷實施例23中所製作之人類及食蟹猴CRTH2基因表現phmAG1-MNLinker載體，對所獲得之直鏈狀DNA進行純化，溶解於殺菌水中。藉由電穿孔法將該DNA導入至CHO/DG44細胞中，於IMDM培養培養基中培養3日左右。

其後，藉由加入有0.5 mg/mL G418(Nacalai Tesque公司)之IMDM選擇培養基選擇耐藥劑性細胞。藉由0.25% Trypsin-EDTA(Nacalai Tesque公司)剝離所選擇之耐藥劑性細胞，藉由PBS加以清洗後，藉由IMDM選擇培養基進行懸浮。其後，使用Cell Sorter SH800(Sony公司)而分別閘控於人類CRTH2表現細胞及食蟹猴CRTH2表現細胞中顯示出同等程度之Azami-Green螢光強度之細胞集團，以1個細胞/孔而進行分選，進行擴大培養，分別創造Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞及食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞。

關於Azami-Green融合人類CRTH2表現CHO/DG44細胞及食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞，藉由與上述同樣之方法而進行細胞製備，使用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)而進行Azami-Green之表現確認。其結果為，如圖20所示那樣，確認各個細

胞之Azami-Green之表現同等。

[實施例25]

人類化Lym2抗體LV0HV1對於人類或食蟹猴CRTH2之結合活性評價

藉由0.02% EDTA溶液(Nacalai Tesque公司)剝離實施例24中所創造之Azami-Green融合人類或食蟹猴CRTH2表現CHO/DG44細胞，藉由PBS加以清洗後，藉由SM進行懸浮。其次，以細胞數於1個孔中成為 2×10^5 個之方式播種於96孔板中，添加各最終濃度為30000、7500、1875、469、117、29、7及2 ng/mL之人類化Lym2抗體LV0HV1或抗DNP IgG1抗體，於4°C下進行40分鐘之反應。

藉由SM對細胞進行3次清洗後，以每1個孔中為100 μ L地添加藉由SM稀釋為10 μ g/mL之濃度的山羊抗人類IgG alexa647(Molecular Probes公司)，於4°C下進行40分鐘之反應。藉由SM而對細胞加以清洗後，藉由100 μ L之SM對細胞進行再懸浮，利用流式細胞儀(BD Bioscience公司、FACS CantoII)而測定螢光強度。

藉由FlowJo 7.65(Tomy Digital Biology公司)而分析資料。其結果為，如圖21所示那樣，可知LV0HV1對於人類CRTH2及猴CRTH2顯示出基本同等之結合性。

[產業上之可利用性]

藉由本發明可提供藉由識別人類CRTH2之特徵性抗原決定基並與之結合而具有所期望之活性的抗人類CRTH2抗體、該抗體片段、編碼該抗體之胺基酸序列的DNA、包含該DNA之載體、生產該抗體之融合瘤及抗體生產細胞、該抗體之製造方法、包含該抗體或抗體片段之組合物、使用該抗體或抗體片段之過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多或功能亢進之疾病、伴有Th2細胞增多或功能亢進之疾病等之治療方法及診斷方法、以及包含該抗體或抗體片段之醫藥及

診斷藥。

對於業者而言，應明白雖然使用特定之態樣對本發明加以詳細說明，但可並不脫離本發明之意圖與範圍地進行各種變更及變化。再者，本申請係基於2015年7月15日提出申請之日本專利申請(特願2015-141633)，其全體內容引用至此。

[序列表非關鍵文字]

序列編號3：人工序列之記載：人類CRTH2 FLAG-A之鹼基序列

序列編號4：人工序列之記載：人類CRTH2 FLAG-B之鹼基序列

序列編號5：人工序列之記載：附有FLAG標籤之人類CRTH2 cDNA之鹼基序列

序列編號6：人工序列之記載：人類CRTH2 FLAG-C之鹼基序列

序列編號7：人工序列之記載：人類CRTH2 FLAG-D之鹼基序列

序列編號8：人工序列之記載：大鼠IgG2bH-A之鹼基序列

序列編號9：人工序列之記載：大鼠IgG2bH-B之鹼基序列

序列編號10：人工序列之記載：大鼠k-A之鹼基序列

序列編號11：人工序列之記載：大鼠k-B之鹼基序列

序列編號20：人工序列之記載：Lym2抗體 VH CDR1之胺基酸序列

序列編號21：人工序列之記載：Lym2抗體 VH CDR2之胺基酸序列

序列編號22：人工序列之記載：Lym2抗體 VH CDR3之胺基酸序列

序列編號23：人工序列之記載：Lym2抗體 VL CDR1之胺基酸序列

序列編號24：人工序列之記載：Lym2抗體 VL CDR2之胺基酸序列

序列編號25：人工序列之記載：Lym2抗體 VL CDR3之胺基酸序列

序列編號26：人工序列之記載：chLym2表現載體用VH之合成DNA

序列編號27：人工序列之記載：chLym2表現載體用VL之合成DNA

序列編號28：人工序列之記載：chLym2 VH-A之鹼基序列

序列編號29：人工序列之記載：chLym2 VH-B之鹼基序列

序列編號30：人工序列之記載：chLym2 VH-C之鹼基序列

序列編號31：人工序列之記載：chLym2 VH-D之鹼基序列

序列編號32：人工序列之記載：LV0之鹼基序列

序列編號33：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

序列編號34：人工序列之記載：LV1之鹼基序列

序列編號35：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

序列編號36：人工序列之記載：LV2a之鹼基序列

序列編號37：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

序列編號38：人工序列之記載：LV2b之鹼基序列

序列編號39：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

序列編號40：人工序列之記載：LV2c之鹼基序列

序列編號41：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

序列編號42：人工序列之記載：LV3a之鹼基序列

序列編號43：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

序列編號44：人工序列之記載：LV3b之鹼基序列

序列編號45：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

序列編號46：人工序列之記載：LV4之鹼基序列

序列編號47：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列

- 序列編號48：人工序列之記載：HV0之鹼基序列
- 序列編號49：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列
- 序列編號50：人工序列之記載：HV1之鹼基序列
- 序列編號51：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列
- 序列編號52：人工序列之記載：HV2a之鹼基序列
- 序列編號53：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列
- 序列編號54：人工序列之記載：HV2b之鹼基序列
- 序列編號55：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列
- 序列編號56：人工序列之記載：HV3之鹼基序列
- 序列編號57：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列
- 序列編號58：人工序列之記載：HV4之鹼基序列
- 序列編號59：人工序列之記載：合成構建物之胺基酸序列
- 序列編號60：人工序列之記載：人類CRTH2 azami-A之鹼基序列
- 序列編號61：人工序列之記載：人類CRTH2 azami-B之鹼基序列
- 序列編號64：人工序列之記載：cyno CRTH2 azami-A之鹼基序列
- 序列編號65：人工序列之記載：cyno CRTH2 azami-B之鹼基序列

【符號說明】

無

序列表

<110> 日商協和醱酵麒麟有限公司

<120> 與人類CRTH2特異性結合之抗體

<130> W520787

<150> JP2015-141633

<151> 2015-7-15

<160> 65

<170> PatentIn第3.3版

<210> 1

<211> 1188

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1188)

<400> 1

atg tgg gcc aac gcc aca atg aag oca otc tgc ccc atc ctg gag cag 48
 Met Ser Ala Asn Ala Thr Leu Lys Pro Leu Cys Pro Ile Leu Glu Gln
 1 5 10 15

atg agc cgt ctc cag agc cac agc aac acc ago ato cgc tac atc gac 96
 Met Ser Arg Leu Gln Ser His Ser Asn Thr Ser Ile Arg Tyr Ile Asp
 20 25 30

cac gcg gcc gtg atg ctg cac ggg ctg gcc tgg ctg ctg ggc ctg gtg 144
 His Ala Ala Val Leu Leu His Gly Leu Ala Ser Leu Leu Gly Leu Val
 35 40 45

gag aat gga gtc atc otc ttc gtg gtg ggc tgc cgc atg cgc cag acc 192
 Glu Asn Gly Val Ile Leu Phe Val Val Gly Cys Arg Met Arg Gln Thr
 50 55 60

gtg gtc acc acc tgg gtg ctg cac atg ggg atg tcc gac ctg ttg gcc 240
 Val Val Thr Thr Trp Val Leu His Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ala
 65 70 75 80

tct gct tcc atg ccc ttc ttc acc tac ttc ttg gcc gtg ggc cac tgg 288
 Ser Ala Ser Leu Pro Phe Phe Thr Tyr Phe Leu Ala Val Gly His Ser
 85 90 95

tgg gag ctg ggc acc acc ttc tgc aaa ctg cac tcc tcc atc ttc ttt Trp Glu Leu Gly Thr Thr Phe Cys Lys Leu His Ser Ser Ile Phe Phe 100 105 110	336
ctc aac atg ttc gcc agc ggc ttc ctg ctc agc gcc atc ago ctg gac Leu Asn Met Phe Ala Ser Gly Phe Leu Leu Ser Ala Ile Ser Leu Asp 115 120 125	384
cgc tgc ctg cag gtg gtg cgg ccg gtg tgg gcg oag aac cac cgc acc Arg Cys Leu Gln Val Val Arg Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr 130 135 140	432
gtg gcc gcg gcg cac aaa gtc tgc ctg gtg ott tgg gca cta gcg gtg Val Ala Ala Ala His Lys Val Cys Leu Val Leu Trp Ala Leu Ala Val 145 150 155 160	480
ctc aac acg gtg ooc tat ttc gtg ttc cgg gac acc atc tcc cgg ctg Leu Asn Thr Val Pro Tyr Phe Val Phe Arg Asp Thr Ile Ser Arg Leu 165 170 175	528
gac ggg cgc att atg tgc tac tac aat gtg ctg ctc ctg aac ccg ggg Asp Gly Arg Ile Met Cys Tyr Tyr Asn Val Leu Leu Leu Asn Pro Gly 180 185 190	576
cot gao cgc gat gcc acg tgc aac tog cgg cag gtg gcc ctg gcc gtc Pro Asp Arg Asp Ala Thr Cys Asn Ser Arg Gln Val Ala Leu Ala Val 195 200 205	624
agc aag ttc ctg ctg gcc ttc ctg gtg ccg ctg gcg atc atc gcc tog Ser Lys Phe Leu Leu Ala Phe Leu Val Pro Leu Ala Ile Ile Ala Ser 210 215 220	672
agc cac gcg gcc gtg ago ctg cgg ttg cag cac cgc gcc cgc cgg cgg Ser His Ala Ala Val Ser Leu Arg Leu Gln His Arg Gly Arg Arg Arg 225 230 235 240	720
cca gcc cgc ttc gtg cgc ctg gtg gcg gcc gtc gtg gcc gcc ttc gcg Pro Gly Arg Phe Val Arg Leu Val Ala Ala Val Val Ala Ala Phe Ala 245 250 255	768
ctc tgc tgg ggg ccc tac cac gtg ttc ago ctg ctg gag gcg cgg gcg Leu Cys Trp Gly Pro Tyr His Val Phe Ser Leu Leu Glu Ala Arg Ala 260 265 270	816
cac gca aac ccg ggg ctg cgg ccg ctc gtg tgg cgc ggg ctg ccc ttc His Ala Asn Pro Gly Leu Arg Pro Leu Val Trp Arg Gly Leu Pro Phe 275 280 285	864
gtc acc agc ctg gcc ttc ttc aac agc gtg gcc aac ccg gtg ctc tac	912

Val Thr Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Val Ala Asn Pro Val Leu Tyr
 290 295 300
 gtg ctc acc tgc ccc gac atg ctg ogo aag ctg ogg ogo tog ctg ogo 960
 Val Leu Thr Cys Pro Asp Met Leu Arg Lys Leu Arg Arg Ser Leu Arg
 305 310 315 320
 aag gtg ctg gag ago gtg ctg gtg gac gac ago gag ctg ggt ggc ggc 1008
 Thr Val Leu Glu Ser Val Leu Val Asp Asp Ser Glu Leu Gly Gly Ala
 325 330 335
 gga agc agc cgc ogo ogo ogo acc tcc tcc acc gcc ogo tog gcc tcc 1056
 Gly Ser Ser Arg Arg Arg Thr Ser Ser Thr Ala Arg Ser Ala Ser
 340 345 350
 cct tta gct ctc tgc agc cgc ccg gag gaa ccg ogg ggc ccc ggc cgt 1104
 Pro Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Glu Glu Pro Arg Gly Pro Ala Arg
 355 360 365
 ctc ctc ggc tgg ctg ctg ggc agc tgc gca ggc tcc ccg cag acg ggc 1152
 Leu Leu Gly Trp Leu Leu Gly Ser Cys Ala Ala Ser Pro Gln Thr Gly
 370 375 380
 ccc ctg aac ogg ggc ctg ago agc acc tcg agt tag 1188
 Pro Leu Asn Arg Ala Leu Ser Ser Thr Ser Ser
 385 390 395

<210> 2
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Met Ser Ala Asn Ala Thr Leu Lys Pro Leu Cys Pro Ile Leu Glu Gln
 1 5 10 15

Met Ser Arg Leu Gln Ser His Ser Asn Thr Ser Ile Arg Tyr Ile Asp
 20 25 30

His Ala Ala Val Leu Leu His Gly Leu Ala Ser Leu Leu Gly Leu Val
 35 40 45

Glu Asn Gly Val Ile Leu Phe Val Val Gly Cys Arg Met Arg Gln Thr
 50 55 60

Val Val Thr Thr Trp Val Leu His Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ala
65 70 75 80

Ser Ala Ser Leu Pro Phe Phe Thr Tyr Phe Leu Ala Val Gly His Ser
85 90 95

Trp Glu Leu Gly Thr Thr Phe Cys Lys Leu His Ser Ser Ile Phe Phe
100 105 110

Leu Asn Met Phe Ala Ser Gly Phe Leu Leu Ser Ala Ile Ser Leu Asp
115 120 125

Arg Cys Leu Gln Val Val Arg Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr
130 135 140

Val Ala Ala Ala His Lys Val Cys Leu Val Leu Trp Ala Leu Ala Val
145 150 155 160

Leu Asn Thr Val Pro Tyr Phe Val Phe Arg Asp Thr Ile Ser Arg Leu
165 170 175

Asp Gly Arg Ile Met Cys Tyr Tyr Asn Val Leu Leu Leu Asn Pro Gly
180 185 190

Pro Asp Arg Asp Ala Thr Cys Asn Ser Arg Gln Val Ala Leu Ala Val
195 200 205

Ser Lys Phe Leu Leu Ala Phe Leu Val Pro Leu Ala Ile Ile Ala Ser
210 215 220

Ser His Ala Ala Val Ser Leu Arg Leu Gln His Arg Gly Arg Arg Arg
225 230 235 240

Pro Gly Arg Phe Val Arg Leu Val Ala Ala Val Val Ala Ala Phe Ala
245 250 255

Leu Cys Trp Gly Pro Tyr His Val Phe Ser Leu Leu Glu Ala Arg Ala

260

265

270

His Ala Asn Pro Gly Leu Arg Pro Leu Val Trp Arg Gly Leu Pro Phe
 275 280 285

Val Thr Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Val Ala Asn Pro Val Leu Tyr
 290 295 300

Val Leu Thr Cys Pro Asp Met Leu Arg Lys Leu Arg Arg Ser Leu Arg
 305 310 315 320

Thr Val Leu Glu Ser Val Leu Val Asp Asp Ser Glu Leu Gly Gly Ala
 325 330 335

Gly Ser Ser Arg Arg Arg Arg Thr Ser Ser Thr Ala Arg Ser Ala Ser
 340 345 350

Pro Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Glu Glu Pro Arg Gly Pro Ala Arg
 355 360 365

Leu Leu Gly Trp Leu Leu Gly Ser Cys Ala Ala Ser Pro Gln Thr Gly
 370 375 380

Pro Leu Asn Arg Ala Leu Ser Ser Thr Ser Ser
 385 390 395

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：人類CRTH2 FLAG-A

<400> 3

cataagcttg ccaccatgtc ggccaac

27

<210> 4

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：人類CRTH2 FLAG-B

<400> 4

catggtacco taattatcgt cgtcatcctt gtaatcactc gaggtgctgc tcagcgcgcg 60

gttcag 66

<210> 5

<211> 1212

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：附有FLAG標籤之人類CRTH2 cDNA

<400> 5

atgtcggcca acgccacact gaagccactc tgcccoatcc tggagcagat gagcogtctc 60

cagagccaca gcaacaccag catccgotac atcgaccacg cggccgtgct gctgcacggg 120

ctggcctcgc tgotgggctt ggtggagaat ggagtcaccc tcttcgtggt gggctgcgcg 180

atgcgccaga ccgtggtcac cacctgggtg ctgcacotgg cgotgtccga cctgttggcc 240

tctgcttccc tgcccttctt cacctaottc ttggccgtgg gccactcgtg ggagctgggc 300

accaccttct gcaaactgca ctctccoatc ttctttctca acatgttcgc cagcggcttc 360

ctgctcagcg ccatcagcct ggaccgctgc ctgcaggtgg tgoggcgggt gtgggcgcag 420

aaccaccgca ccgtggcgcg ggccacaaa gtctgcctgg tgctttgggc actagcgggtg 480

ctcaacacgg tgccctatct cgtgttccgg gacaccatct cgcggctgga cgggocatt 540

atgtgctact acaatgtgot gctcctgaac ccggggcctg accgcgatgc cacgtgcaac 600

tgcggcagg tggccctggc cgtcagcaag ttctgtctgg ccttctggt gccgtggcg 660

atcctcgcct cgagccacgc ggccgtgagc ctgcggttgc agcaccgggg ccgcggcgg 720

ccaggccgct tcgtgcgcct ggtggogggc gtctgtggcg ccttcgcgt ctgctggggg 780

ccctaccacg tgttcagcct gotggaggcg cgggocacg caaacccggg gctgcggcog 840

ctcgtgtggc gcgggotgce ctctgtcacc agcctggcct tcttcaacag cgtggccaac 900

ccggtgctct acgigtcac ctgcccgcac atgctgogca agctggggcg ctgctgogc 960
 aoggtgctgg agagcgtgct ggtggaogac agcagctgg gtggcgggg aagcagccgc 1020
 ogccgcogca cctcctccac cgcccgtcg gctcccctt tagctctctg cagccgcccg 1080
 gaggaaccgc ggggcccgc gogtctctc ggtggctgo tgggcagctg cgcagcgtcc 1140
 ccgcagacgg gccccctgaa ccggggcgtg agcagcacct cgagtgatta caaggatgac 1200
 gacgataagt ag 1212

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：人類CRTH2 FLAG-C

<400> 6 27
 catgaattcg ccaccatgtc ggccaac

<210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：人類CRTH2 FLAG-D

<400> 7 27
 catggtaccc tacttatcgt ogtcac

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：大鼠IgG2bH-A

<400> 8 24
 cgctggacag ggctccagag ttcc

<210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：大鼠IgG2bH-B

<400> 9
 gggcatgtag ggcattgtg tccaatgc 28

<210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：大鼠k-A

<400> 10
 gactgaggca cctccagttg ctaactgttc c 31

<210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：大鼠k-B

<400> 11
 cctggtgaag ctcttgacga cgggtgagg 29

<210> 12
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> 溝鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(426)

<400> 12
 atg gac atc agg ctc agc ttg gct ttc ctt gtc ctt ttc ata aaa ggt 48
 Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
 1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

cct gga agg tcc atg aaa ctc tcc tgt goa ggc tca gga ttc act ttc 144
 Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

agt aac tat tac atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca aag aag ggt ctg 192
 Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu
 50 55 60

gag tgg gtc gca acc att agt tat gat ggt agt agc act tac tat cga 240
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg
 65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa agc 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser
 85 90 95

acc cta tac ctg caa atg gac agt ctg agg tot gag gac acg gcc act 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

tat tac tgt gca aga cat cgg ggt tat tac tac agt ggg gcg ggg tac 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr
 115 120 125

ttt gat tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc tca 426
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 13
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 溝鼠

<400> 13

Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr
 115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 14
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> 溝鼠

<220>
 <221> GDS
 <222> (1).. (393)

<400> 14

atg aaa gtg oot ggt agg ctg ctg gtg ctg ttg ttt tgg att cca gct 48
 Met Lys Val Pro Gly Arg Leu Leu Val Leu Leu Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

tcc agg agt gat gtt gtg ttg aca caa aot oca gtt tcc ctg tct gtc 96
 Ser Arg Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val
 20 25 30

aca ott gga gat caa gct tct ata tct tgc agg tct agt oag agc ctg 144
 Thr Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

gaa tat agt gat gga tao act tat ttg gaa tgg tac cta cag aag cca 192
 Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

ggc cag tct oca cag gtc ctc atc tat gga gtt tcc aac cga ttt tot 240
 Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

ggg gtc oca gac agg ttc att ggc agt ggg tca ggg aca gat ttc acc 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

ctc aag atc agc aga gta gag cct gag gac ttg gga gtt tat tac tgc 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

ttc caa gct aca cat gat cct ctc acg ttc ggc tca ggg acg aag ttg 384
 Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

gaa ata aaa 393
 Glu Ile Lys
 130

<210> 15
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 溝鼠

<400> 15

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

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

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

Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

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

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

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

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

Glu Ile Lys
 130

<210> 16
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 溝鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)

<400> 16

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cot gga agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc atg aaa ctg tcc tgt gca goo tca gga ttc act ttc agt aac tat 96
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

tac atg gcc tgg gtc cgc cag got cca aag aag ggt ctg gag tgg gtc 144
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca acc att agt tat gat ggt agt agc act tac tat cga gac tcc gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc oga ttc aot atc tcc aga gat aat gca aaa agc acc cta tac 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg goo act tat tac tgt 288

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga cat cgg ggt tat tac tac agt ggg gcg ggg tac ttt gat tac 336
 Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc toa 369
 Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 溝鼠

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 溝鼠

<220>
 <221> GDS
 <222> (1).. (336)

<400> 18
 gat gtt gtg ttg aca caa act cca gtt tcc ctg tot gtc aca ctt gga 48
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

gat caa got tot ata tot tgc agg tot agt cag agc ctg gaa tat agt 96
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gat gga tac act tat ttg gaa tgg tac cta cag aag cca ggc cag tct 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag gtc ctc atc tat gga gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc att ggc agt ggg tca ggg aca gat ttc acc ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gta gag cct gag gac ttg gga gtt tat tac tgc ttc caa gct 288
 Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

aca cat gat cot ctc aag ttc ggc tca ggg acg aag ttg gaa ata aaa 336
 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 溝鼠

<400> 19
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：Lym2 VH CDR1胺基酸

<400> 20

Asn Tyr Tyr Met Ala
 1 5

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：Lym2 VH CDR2胺基酸

<400> 21

Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：Lym2 VH CDR3胺基酸

<400> 22

His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：Lym2 VL CDR1胺基酸

<400> 23

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：Lym2 VL CDR2胺基酸

<400> 24

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：Lym2 VL CDR3胺基酸

<400> 25

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 437
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：chLym2表現載體用VH之合成DNA

<400> 26
 gaccctcac catgaatctg gggctgtgc tgatcttctt ggcgctgac ctgaagggcg 60
 tgcagtgcga agtgcagctt gtcgaatcgc gcggcgggct tgttcagccc gggcgcctga 120
 tgaagctgtc gtgocccgcg tccggcttca cgtttctgaa ctactacatg gcgtgggtgc 180
 gccaggcgcg gaagaagggg ctggagtggg tcgcgacgat ctcgtacgac ggcctcctga 240
 cgtactatcg cgattccgtg aaggggcgct tcacgatoto gcgcgacaac gogaagtcga 300
 cgctgtatct gcagatggat tcgctgcgct ccgaggatac cgcgacgtac tactgcgcgc 360
 gccatcgagg ctactactac tcggcgccg gotacttoga ctactggggg cagggcgtga 420
 tggtgaccgt gtcgtcc 437

<210> 27
 <211> 404
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：chLym2表現載體用VH之合成DNA

<400> 27
 gcctcttcaac catgaagctg ccgcttcgcc tgcctgtgct gatggttgg atccccgct 60
 cgtcgtccga cgtcgtgctg acgcagaagc ccgtgtcgt gtcctgacg ctgggcgac 120
 aggcgtgat ctcgtgtgc tcgtcgcagt cgcctggagta ctccgaagc tacacgtatc 180
 tggagtggta totgoagaag ccggggcagt ccgcgcaggt gctgatctac ggctgtoga 240
 atcgtttctc cggcgttccc gatcgttca tggctccgg ctccgggacc gacttcaagc 300
 tgaagatctc gcgcgtcga ccgaggatc tggcgtgta ctactgctc caggcgaagc 360
 acgatccgct gacgttcggo tccgggacga agctggagat caag 404

<210> 28
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：chLym2 VH-A

<400> 28
 atcacagatc gtcgacgacc cctcacoatg aatctg 36

<210> 29
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：chLym2 VH-B

<400> 29
 ggcccttggc gctagoggac gacacggtca ccate 35

<210> 30
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：chLym2 VH-C

<400> 30
 acgcatcac agatctgctt cttcaccatg aagctg 36

<210> 31
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：chLym2 VH-D

<400> 31

gtgcagccac cgtacgcttg atctccagct tcgtc 35

<210> 32
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：LV0 DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 32

gac atc gtg atg acg cag acg cgg ctg tog ctg ccc gtt acg ccc ggc 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gaa tcc gcg tog atc tog tgt cgc tog tog cag tog ctg gag tac tcc 96
 Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gac ggc tac acg tat ctg gag tgg tat ctg cag aag ccc ggg cag tog 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cgc cag gtg ctg atc tac ggc gtg tog aat cgc ttc tcc ggc gtt ccc 192
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gat cgc ttc tcc ggc tcc ggc tcc ggg acc gac ttc acg ctg aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tgc cgc gtc gag gcc gag gac gtc ggc gtg tac tac tgc ttc cag gcc 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala

85

90

95

acg cao gat cog ctg acg ttc ggg cag ggg acg aag ctg gag atc aag 336
 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 33

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 34
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：LV1 DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (336)

<400> 34

gac atc gtg atg acg cag acg ccg ctg tgg ctg ccc gtg acg ctg ggc 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

gag tcc gcg tgg atc tog tgt cgc tog tgg cag tog ctg gag tac tcc 96
 Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gac ggc tac acg tat ctg gag tgg tat ctg cag aag ccc ggc oag tgg 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg tgg aat cgc ttc tcc ggc gtt ccc 192
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gat cgc ttc tcc ggc tcc ggc tcc ggg acc gac ttc acg ctg aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tgg cgc gtc gag gcc gag gac gtc ggc gtg tac tac tgc ttc cag gcg 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

acg cao gat ccg ctg acg ttc ggg cag ggg acg aag ctg gag atc aag 336
 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成構建物

<400> 35

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 36

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：LV2a DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 36

gac atc gtg ctg acg cag acg ccg ctg tcg ctg ccc gtg acg ctg ggc 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

gag tcc gcg tog atc tog tgt cgc tcg tcg cag tcg ctg gag tac tcc 96
 Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gac ggc tac acg tat ctg gag tgg tat ctg cag aag ccc ggg cag tcg 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35	40	45	
cgc cag gtc ctg atc tac ggc gtc tcg aat cgc ttc tcc ggc gtt ccc			192
Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
gat cgc ttc tcc ggc tcc ggc tcc ggg acc gac ttc aag ctg aag atc			240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
tgc cgc gtc gag gcc gag gac gtc ggc gtc tac tac tgc ttc cag gcc			288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala			
85	90	95	
acg cac gat cgc ctg acg ttc ggc cag ggc acc aag ctg gag atc aag			336
Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 37
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 37

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala

85

90

95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 38
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：LV2b DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)

<400> 38
 gac atc gtg atg acg cag acg ccg ctg tog ctg ooc gtg acg ctg ggc 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

gag tcc gcg tgg atc tgg tgt cgc tog tgg cag tog ctg gag tac tcc 96
 Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gac ggc tac acg tat ctg gag tgg tat ctg cag aag ooc ggc cag tog 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg tog aat cgc ttc tcc ggc gtt ooc 192
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gat cgc ttc tcc ggc tcc ggc tcc ggg acc gac ttc acg ctg aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tgg cgc gtc gaa ooc gag gac gtc ggc gtg tac tac tgc ttc cag gcg 288
 Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

aag cac gat ccg ctg acg ttc ggg cag ggg acc aag ctg gag atc aag 336
 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 39
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 40
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：LV2c DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (336)

<400> 40

gac gtc gtg ctg acg cag aog ocg ctg tgc ctg ccc gtt acg ccc ggc 48
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gaa tcc gog tgc atc tgc tgt cgc tgc tog cag tgc ctg gag tac tcc 96
 Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gac ggc tao acg tat ctg gag tgg tat ctg cag aag ccc ggg cag tgc 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

ccg cag gtg ctg atc tao ggc gtg tgc aat cgc ttc tcc ggc gtt ccc 192
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gat cgc ttc tcc ggc tcc ggc tcc ggg acc gac ttc aog ctg aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tgc cgc gtc gag gcc gag gac gtc ggc gtg tac tac tgc ttc cag ggc 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

acg cac gat ccg ctg acg ttc ggc cag ggc acg aag ctg gag atc aag 336
 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成構造物

<400> 41

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

tgc cgc gtc gaa occ gag gac gtc ggc gtg tac tac tgc ttc cag ggc 288
Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95

aag cac gat cag ctg acg ttc ggg cag ggc acg aag ctg gag atc aag 336
Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成構造物

<400> 43

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 44
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> LV3b DNA

<220>
 <221> GDS
 <222> (1).. (336)

<400> 44

gao gtc gtg ctg acg cag acg ccg ctg tcg ctg ccc gtg acg ctg ggc 48
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

gag tcc gcg tog ato tog tgt ogo tog tog cag tog ctg gag tac tcc 96
 Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gac ggc tac acg tat ctg gag tgg tat ctg cag aag ccc ggg cag tcg 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cog cag gtg ctg ato tac ggc gtg tog aat cgc ttc tcc ggc gtt ccc 192
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gat cgc ttc tcc ggc tcc ggc tcc ggg acc gac ttc acg ctg aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tog cgc gtc gag gcc gag gac gtc ggc gtg tac tac tgc ttc cag gcg 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

acg cac gat cgg ctg acg tto ggg cag ggg acg aag ctg gag ato aag 336
 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 45
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 45

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 46

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：LV4 DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (336)

<400> 46

gac gtc gtg ctg acg cag aog ccg ctg tgg ctg ccc gtg acg ctg ggc 48
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

gag tcc gcg tgg atc tgg tgt cgc tgg tgg cag tgg ctg gag tac tcc 96

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

gac ggc tac acg tat ctg gag tgg tat ctg cag aag ccc ggg cag tgg 144
 Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg tgg aat cgc ttc tcc ggc gtt ccc 192
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gat cgc ttc tcc ggc tcc ggc tcc ggg acc gac ttc acg ctg aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tgg cgc gtc gaa ccc gag gac gtc ggc gtg tac tac tgc ttc cag ggc 288
 Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

acg cac gat cgc ctg acg ttc ggg cag ggg acc aag ctg gag atc aag 336
 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 47
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 47

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 48
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列之說明：HV0 DNA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(369)

<400> 48

gaa gtg cag ott gtc gaa tcc ggc ggc ggc gtc gtt cag coo ggg cgc 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcg ctg cgc ctg tog tgc gcc gcg tcc ggc ttc acg ttc tcg aac tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

tac atg gcg tgg gtg cgc cag gcg coo ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcg acg ato tog tac gac ggc tog tog aog tac tat cgc gat too gtg 192
Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aag ggg cgc ttc acg atc tcg ogo gac aac gcg aag aac tcg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac tcg ctg cgc gcc gag gat acc gcc gtg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gog cgc cat cgc ggc tac tac tac tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac 336
 Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggg cag ggg acg atg gtg acc gtg tog tcc 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：HVI DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (369)

<400> 50

gaa gtg cag ott gtc gaa tcc ggc ggc ggc gtc gtg cag ccc ggg cgc 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tgc ctg cgc ctg tog tgc gcc ggc tcc ggc ttc acg ttc tog aac tac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

tac atg gcg tgg gtg cgc cag gcg ccc ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gcg acg atc tog tac gac gcc tgc tgc acg tac tat cgc gat tcc gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggg cgc ttc acg atc tog cgc gac aac gcg aag aac tgc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac tog ctg cgc gcc gag gat acc gcg acg tac tac tgc 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg cgc cat cgc gcc tac tac tac tcc gcc gcc gcc tac ttc gac tac 336
 Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggg cag ggg acg atg gtg acc gtg tog tcc 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 123

<212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：HV2a DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (369)

<400> 52

gaa gtg cag ctt gtc gaa tcc ggc ggc ggc gtc gtg cag ccc ggg ogc 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tgc ctg cgc ctg tog tgc gcc gcg tcc ggc ttc aag ttc tog aac tac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

tac atg gag tgg gtg ogc cag gcg ooc ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gag acg atc tgc tac gac ggc tgc tog aag tac tat ogc gat tcc gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggg cgc ttc acg atc tog cgc gac aac gcg aag aac tog ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac tgc ctg cgc gcc gag gat acc gcg acg tac tac tgc 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ggc cgc cat cgc ggc tac tac tac tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac 336
 Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggg cag ggc gtg atg gtg acc gtg tog tcc 369
 Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 53

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成構造物

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：HV2b DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (369)

<400> 54
 gaa gtg oag ctt gtc gaa tcc ggc ggc ggc gtc gtt cag ccc ggg cgc 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tgc atg cgc ctg tgc tgc gcc ggc tcc ggc ttc aag ttc tgc aac tac 96
 Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

tao atg gog tgg gtg cgc cag gog ccc ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gog aog atc tog tao gao ggc tog tog aog tac tat cgc gat tcc gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggg cgc ttc aog atc tog cgc gac aag gog aag aac tog ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg oag atg aac tog ctg cgc gcc gag gat acc gcc gtg tao tao tgc 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gog cgc cat cgc ggc tao tao tao tcc ggc gcc ggc tao ttc gac tao 336
 Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggg cag ggo gtg atg gtg acc gtg tog tcc 369
 Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 55
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：HV3 DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 56

gaa gtg cag ott gtc gaa tcc ggc ggc ggc gtc gtt cag ccc ggg ogo 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tgc atg cgc ctg tgc tgc gcc ggc tcc ggc ttc acg ttc tgc aac tac 96
Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

tac atg ggc tgg gtg ogc cag ggc ccc ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gag acg atc tgc tac gac ggc tgc tgc acg tac tat ogc gat tcc gtg 192
Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aag ggg ogc ttc acg atc tog ogc gac aac ggc aag aac tgc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65		70		75		80	
ctg cag atg aac tog ctg cgc gcc gag gat acc gcg acg tac tac tgc							288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys							
		85		90		95	
gcg cgc cat cgc gcc tac tac tac too ggc gcc gcc tac ttc gac tac							336
Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr							
		100		105		110	
tgg ggg cag gcc gtg atg gtg acc gtg tog too							369
Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser							
		115		120			

<210> 57
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr

100

105

110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列之說明：HV4 DNA

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (369)

<400> 58

gaa gtg oag ctt gtc gaa tcc ggc ggc ggc gtc gtt cag ccc ggg cgc 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tgc atg cgc ctg tgc tgc gcc gcg tcc ggc ttc aag ttc tgc aac tac 96
Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

tao atg gcg tgg gtg cgc cag gcg ccc ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcg acg atc tgc tac gac ggc tgc tgc acg tac tat cgc gat tcc gtg 192
Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aag ggg cgc ttc acg atc tgc cgc gac aac gcg aag tgc tgc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac tgc ctg cgc gcc gag gat acc gcg acg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg cgc cat cgc ggc tac tac tao tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac 336
Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

tgg ggg cag ggc gtg atg gtg acc gtg tgc tcc 369

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 59
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成構造物

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 60
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：人類CRTH2 azami-A

<400> 60

catggetcgc ccaccatgtc ggccaacgcc aactgaag

39

<210> 61

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列之說明：人類CRTH2 azami-B

<400> 61

cataagctta ctcgaggcgc tgctcagc

28

<210> 62

<211> 1191

<212> DNA

<213> 食蟹猴

<400> 62

atgtccgcc aagccaagct gaagccgctc tgccccatcc tagaggagat gagccatctc 60

cgagaccaca goaacaccag catccgctac atcgaccacg cgaccgtgct gctgcacggg 120

ctggcctcgc tgotgggcct ggtggagaac ggagtcctcc tottcgtggt gggctgcgcg 180

atgogccaga ccgtggctac cacctgggtg ctacacctgg cactgtotga cctgttgcc 240

totgottccc tgcccttctt cacctacttc ttggccgtgg gccactcgtg ggagctgggo 300

accaccttct gcaaacctga ttctccatc ttctttctca acatgtttgc cagcggcttc 360

otgctcagcg ccctcagcct ggaccgctgc ctgcaggtgg tgtggccggt gtgggogcag 420

aaccaccgca ccgtggccgc agcgcacaaa gtctgcctgg tgctctgggc actagoagtg 480

ctcaaacagg tgccotatct cgtgttccgg gacacctct caaggctgga tgggcgcctc 540

atgtgctact acaacgtgct gctcctgaac ccggggcctg accgtgacgc cacgtgcaac 600

tcgogccagg cggccctggc agtcagcaag ttctgtctgg ccttctctgt gcegotggcg 660

atcatgcct cgagccatgc ggccgtgagc ctgcgactgc agcacccggc acgcccggcg 720

cccggccgct ttgtgcgct ggtggcggoo gtogtggogg ccttcgcaot ctgctggggg 780
 coctaccacg tgttcagoot gotggaggcg cgggcgcacg coaaccocgg gttgcggccg 840
 cttgtgtggc ggggctgoc cttogtcacc agootggoot tottcaacag cgtggccaac 900
 cgggtgotct acgtgctcac ctgccccgac atgctgcgca agctgcggcg ctogotgogo 960
 acgggtgotgg agagcgtgct ggtggacgac agcgagctgg gtggcggggg aagcagccgc 1020
 cgcgcgcgcg gcacccccctc cacggccgcg tggcctcct ccttagctot cagcagccgc 1080
 cccgaggaac ggcggggccc cgcgcgcctc ttgggctggc tgctgggggg ctgcgcagcg 1140
 tccccgcaga ggggcccot gaacggggcg ctgagcagca cctcgagta g 1191

<210> 63
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴

<400> 63

Met Ser Ala Asn Ala Thr Leu Lys Pro Leu Cys Pro Ile Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Met Ser His Leu Arg Ser His Ser Asn Thr Ser Ile Arg Tyr Ile Asp
 20 25 30

His Ala Thr Val Leu Leu His Gly Leu Ala Ser Leu Leu Gly Leu Val
 35 40 45

Glu Asn Gly Val Ile Leu Phe Val Val Gly Cys Arg Met Arg Gln Thr
 50 55 60

Val Val Thr Thr Trp Val Leu His Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Ala Ser Leu Pro Phe Phe Thr Tyr Phe Leu Ala Val Gly His Ser
 85 90 95

Trp Glu Leu Gly Thr Thr Phe Cys Lys Leu His Ser Ser Ile Phe Phe
 100 105 110

Leu Asn Met Phe Ala Ser Gly Phe Leu Leu Ser Ala Ile Ser Leu Asp
 115 120 125

Arg Cys Leu Gln Val Val Trp Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr
 130 135 140

Val Ala Ala Ala His Lys Val Cys Leu Val Leu Trp Ala Leu Ala Val
 145 150 155 160

Leu Asn Thr Val Pro Tyr Phe Val Phe Arg Asp Thr Ile Ser Arg Leu
 165 170 175

Asp Gly Arg Ile Met Cys Tyr Tyr Asn Val Leu Leu Leu Asn Pro Gly
 180 185 190

Pro Asp Arg Asp Ala Thr Cys Asn Ser Arg Gln Ala Ala Leu Ala Val
 195 200 205

Ser Lys Phe Leu Leu Ala Phe Leu Val Pro Leu Ala Ile Ile Ala Ser
 210 215 220

Ser His Ala Ala Val Ser Leu Arg Leu Gln His Arg Gly Arg Arg Arg
 225 230 235 240

Pro Gly Arg Phe Val Arg Leu Val Ala Ala Val Val Ala Ala Phe Ala
 245 250 255

Leu Cys Trp Gly Pro Tyr His Val Phe Ser Leu Leu Glu Ala Arg Ala
 260 265 270

His Ala Asn Pro Gly Leu Arg Pro Leu Val Trp Arg Gly Leu Pro Phe
 275 280 285

Val Thr Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Val Ala Asn Pro Val Leu Tyr
 290 295 300

Val Leu Thr Cys Pro Asp Met Leu Arg Lys Leu Arg Arg Ser Leu Arg
 305 310 315 320

Thr Val Leu Glu Ser Val Leu Val Asp Asp Ser Glu Leu Gly Gly Ala
 325 330 335

Gly Ser Ser Arg Arg Arg Arg Thr Pro Ser Thr Ala Arg Ser Ala
 340 345 350

Ser Ser Leu Ala Leu Ser Ser Arg Pro Glu Glu Arg Arg Gly Pro Ala
 355 360 365

Arg Leu Phe Gly Trp Leu Leu Gly Gly Cys Ala Ala Ser Pro Gln Arg
 370 375 380

Gly Pro Leu Asn Arg Ala Leu Ser Ser Thr Ser Ser
 385 390 395

<210> 64
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：cyno CRTH2 azami-A

<400> 64
 catggatcgg ccaccatgtc cgccaaogcc acgctgaag

39

<210> 65
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列之說明：cyno CRTH2 azami-B

<400> 65
 cataagotta ctogagggtgo tgctcago

28

申請專利範圍

1. 一種抗體或該抗體片段，其識別序列編號2所表示之人類CRTH2之胺基酸序列之第192號之甘胺酸及第194號之天冬胺酸之至少一者並與之結合，且抗體係選自由以下之(a)~(d)所組成之群中之任一種抗體：

(a)抗體重鏈可變區(以下，略記為VH)之互補決定區(以下，略記為CDR)1~3分別包含序列編號20~22所表示之胺基酸序列，且抗體輕鏈可變區(以下，略記為VL)之CDR1~3分別包含序列編號23~25所表示之胺基酸序列之抗體、

(b)包含如下之VH以及VL之抗體，該VH包含序列編號49所表示之胺基酸序列或導入有選自將序列編號49所表示之胺基酸序列中之第18號之白胺酸置換為甲硫胺酸、第77號之天冬醯胺置換為絲胺酸、第93號之纈胺酸置換為蘇胺酸、及第117號之蘇胺酸置換為纈胺酸之修飾的至少1個修飾之胺基酸序列，該VL包含序列編號33所表示之胺基酸序列或導入有選自將序列編號33所表示之胺基酸序列中之第2號之異白胺酸置換為纈胺酸、第4號之甲硫胺酸置換為白胺酸、第15號之脯胺酸置換為白胺酸、及第85號之丙胺酸置換為脯胺酸之修飾的至少1個修飾之胺基酸序列、

(c)包含含有序列編號49、51、53、55、57及59所表示之胺基酸序列之任一個之VH以及含有序列編號33、35、37、39、41、43、45及47所表示之胺基酸序列之任一個之VL的抗體、以及

(d)包含含有序列編號17所表示之胺基酸序列之VH及含有序列編號19所表示之胺基酸序列之VL的抗體。

2. 如請求項1之抗體或該抗體片段，其中抗體係具有選自由下述(a)

~(h)所組成之群中之至少1個特徵之抗體：

(a)於人類CRTH2之配位子之存在下，對人類CRTH2之反應性不降低、

(b)不具有中和活性、

(c)具有抗體依賴性細胞毒殺(ADCC)活性、

(d)不與肥大細胞及Th1細胞之至少一者反應、

(e)與選自嗜酸性球、嗜鹼性球、Th2細胞及2型自然淋巴球(ILC2)之至少一種細胞反應、

(f)不具有促效劑活性、

(g)不增強人類CRTH2之配位子之訊息、以及

(h)針對活化狀態或非活化狀態之人類CRTH2之反應性不變化。

3. 如請求項1之抗體或該抗體片段，其中抗體係包含人類Fc區之抗體。
4. 如請求項1之抗體或該抗體片段，其中抗體係單株抗體。
5. 如請求項1之抗體或該抗體片段，其中抗體係基因重組抗體。
6. 如請求項5之抗體或該抗體片段，其中基因重組抗體係選自人類型嵌合抗體、人類型CDR移植抗體及人類抗體中之任一種基因重組抗體。
7. 如請求項1之抗體或該抗體片段，其中抗體係與猴CRTH2結合之抗體。
8. 如請求項1之抗體或該抗體片段，其係選自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、雙功能抗體(diabody)及dsFv中之任一個抗體片段。
9. 一種融合瘤，其生產如請求項1至8中任一項之抗體或該抗體片段。
10. 一種DNA，其編碼如請求項1至8中任一項之抗體或該抗體片

段。

11. 一種重組體載體，其含有如請求項10之DNA。
12. 一種轉形株，其係將如請求項11之重組體載體導入至宿主細胞而獲得。
13. 一種如請求項1至8中任一項之抗體或該抗體片段之製造方法，其特徵在於：於培養基中培養如請求項9之融合瘤或如請求項12之轉形株，於培養物中生產蓄積如請求項1至8中任一項之抗體或該抗體片段，並自該培養物採取抗體或該抗體片段。
14. 一種與人類CRTH2相關之疾病之治療劑，其含有如請求項1至8中任一項之抗體或該抗體片段作為有效成分。
15. 一種與人類CRTH2相關之疾病之診斷劑，其含有如請求項1至8中任一項之抗體或該抗體片段作為有效成分。
16. 如請求項14或15之劑，其中與CRTH2相關之疾病為過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進之至少一者之疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者之疾病、或伴有2型自然淋巴球(ILC2)增多及功能亢進之至少一者之疾病。
17. 如請求項1之抗體或該抗體片段，其係用以於與人類CRTH2相關之疾病之治療及診斷之至少一者中使用。
18. 如請求項17之抗體或該抗體片段，其中與人類CRTH2相關之疾病為過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進之至少一者之疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者之疾病、或伴有ILC2增多及功能亢進之至少一者之疾病。
19. 一種如請求項1至8中任一項之抗體或該抗體片段之用途，其用於製造與人類CRTH2相關之疾病之治療及診斷藥劑之至少一者。
20. 如請求項19之抗體或該抗體片段之用途，其中與人類CRTH2相

關之疾病為過敏性疾病、自體免疫疾病、伴有嗜酸性球增多及功能亢進之至少一者之疾病、伴有Th2細胞增多及功能亢進之至少一者之疾病、或伴有ILC2增多及功能亢進之至少一者之疾病。

圖式

	12345678901234567890123	4567890123456789	012345678901234	5678901
Lym2 VL	DVVLVTQTPLSVLSTLGDQASISC	RSSQSLEYSDBGYTYLE	WYLQKPGQSPQVLIY	GVSNRFS
LV0	DIVMTQTPLSLPVTLPGESASISC		WYLQKPGQSPQVLIY	
LV1	DIVMTQTPLSLPVTLPGESASISC		WYLQKPGQSPQVLIY	
LV2a	DIVLTQTPLSLPVTLPGESASISC		WYLQKPGQSPQVLIY	
LV2b	DIVMTQTPLSLPVTLPGESASISC	CDR L1	WYLQKPGQSPQVLIY	CDR L2
LV2c	DVVLVTQTPLSLPVTLPGESASISC		WYLQKPGQSPQVLIY	
LV3a	DVVLVTQTPLSLPVTLPGESASISC		WYLQKPGQSPQVLIY	
LV3b	DVVLVTQTPLSLPVTLPGESASISC		WYLQKPGQSPQVLIY	
LV4	DVVLVTQTPLSLPVTLPGESASISC		WYLQKPGQSPQVLIY	

	23456789012345678901234567890123	456789012	3456789012
Lym2 VL	GVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLVGVYYC	FQATHDPLT	FGSGTKLEIK
LV0	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGQGTKLEIK
LV1	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGQGTKLEIK
LV2a	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGQGTKLEIK
LV2b	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDVGVYYC	CDR L3	FGQGTKLEIK
LV2c	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGQGTKLEIK
LV3a	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDVGVYYC		FGQGTKLEIK
LV3b	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGQGTKLEIK
LV4	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDVGVYYC		FGQGTKLEIK

圖 1

	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	01234567890123456
Lym2 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFS	NYNYMA	WVRQAPGKGLEWVA	TISYDGSSTYYRDSVKG
HV0	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV2a	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	CDR H1	WVRQAPGKGLEWVA	CDR H2
HV2b	EVQLVESGGGVVQPGRSMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV3	EVQLVESGGGVVQPGRSMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV4	EVQLVESGGGVVQPGRSMRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	

	78901234567890123456789012345678	90123456789012	34567890123
Lym2 VH	RFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDATYYCAR	HRGYYYSAGYFDY	WGQGMVTVSS
HV0	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR		WGQGMVTVSS
HV1	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR		WGQGMVTVSS
HV2a	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR		WGQGMVTVSS
HV2b	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	CDR H3	WGQGMVTVSS
HV3	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR		WGQGMVTVSS
HV4	RFTISRDNAKSSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR		WGQGMVTVSS

圖 2

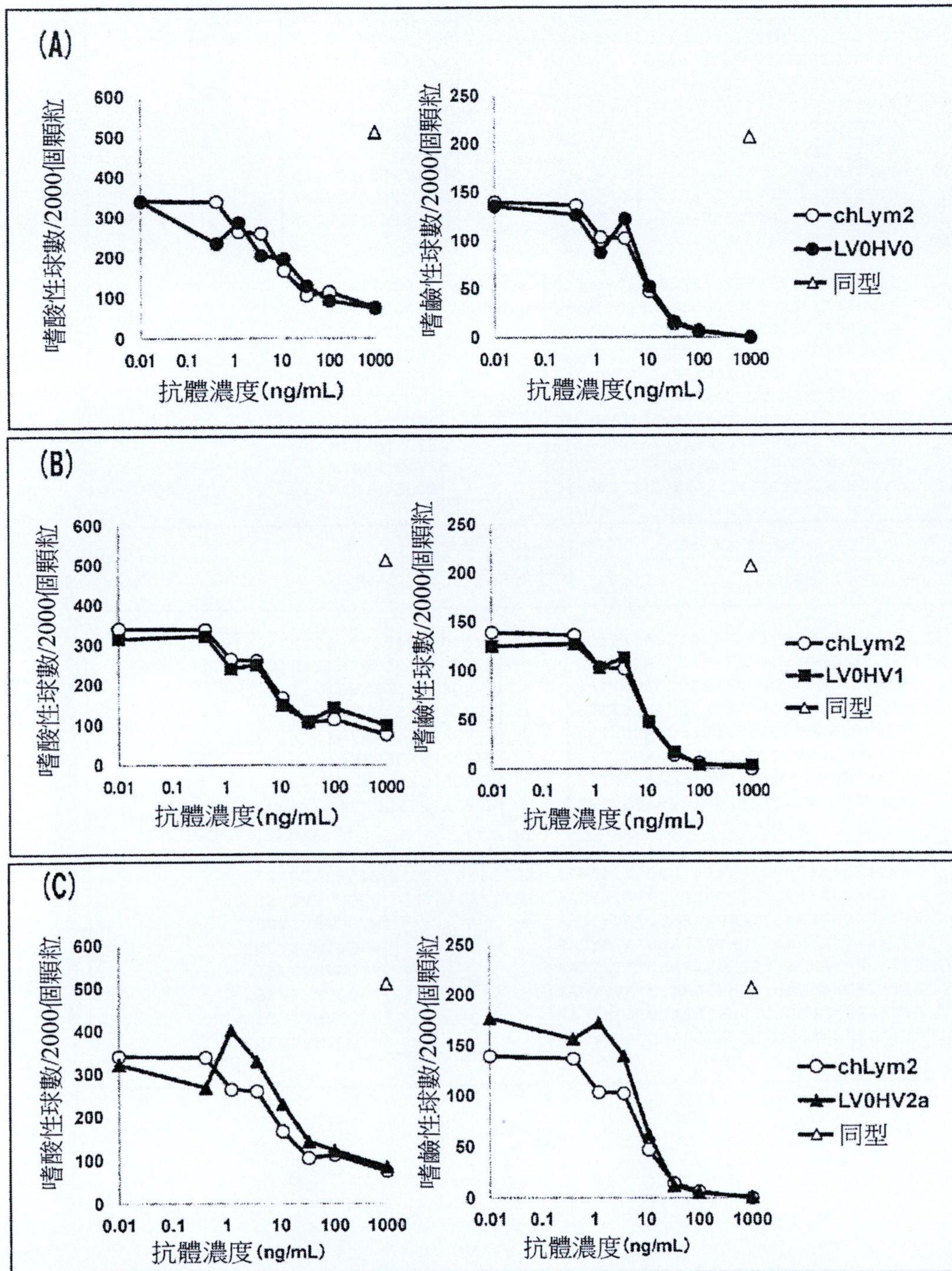


圖3

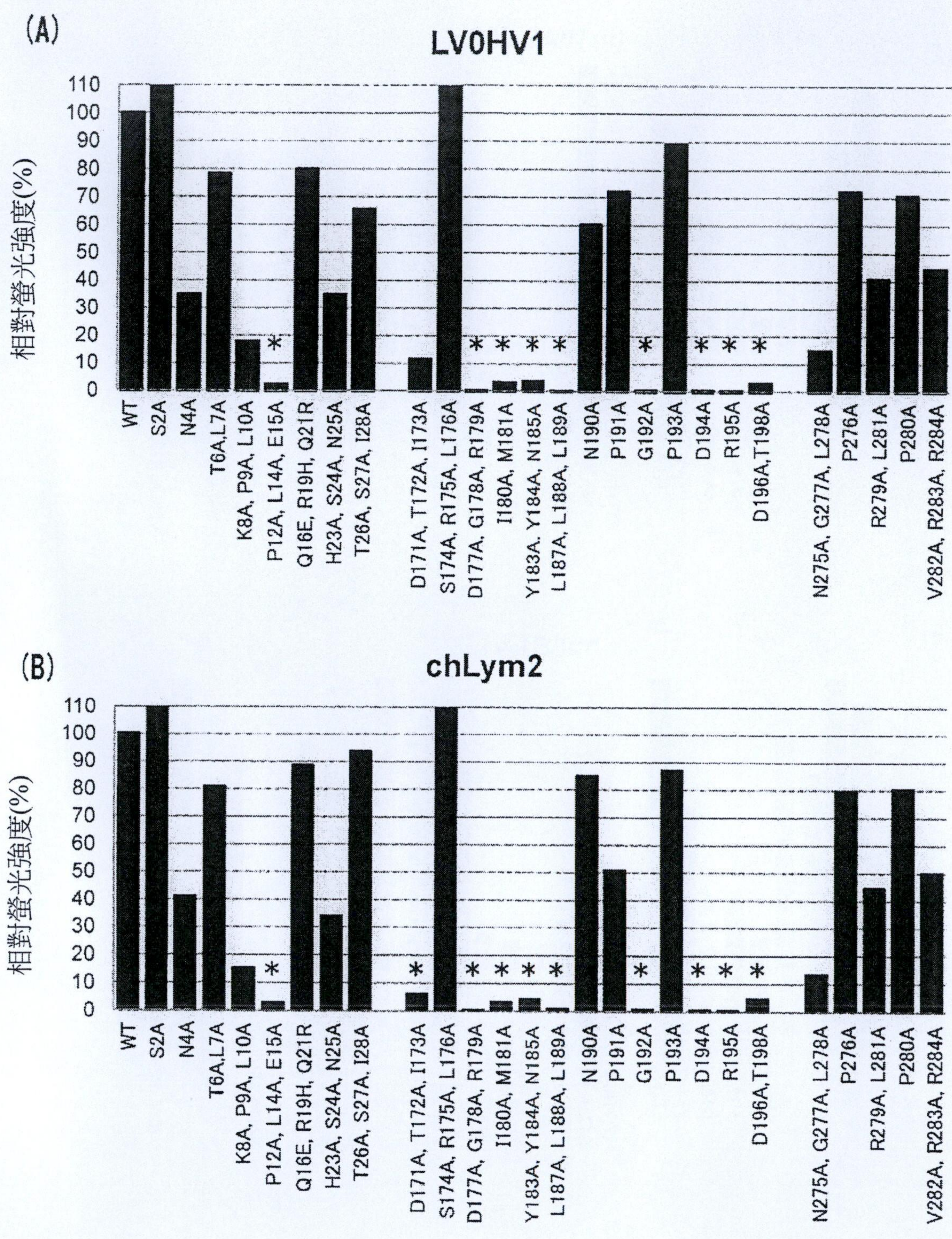


圖4

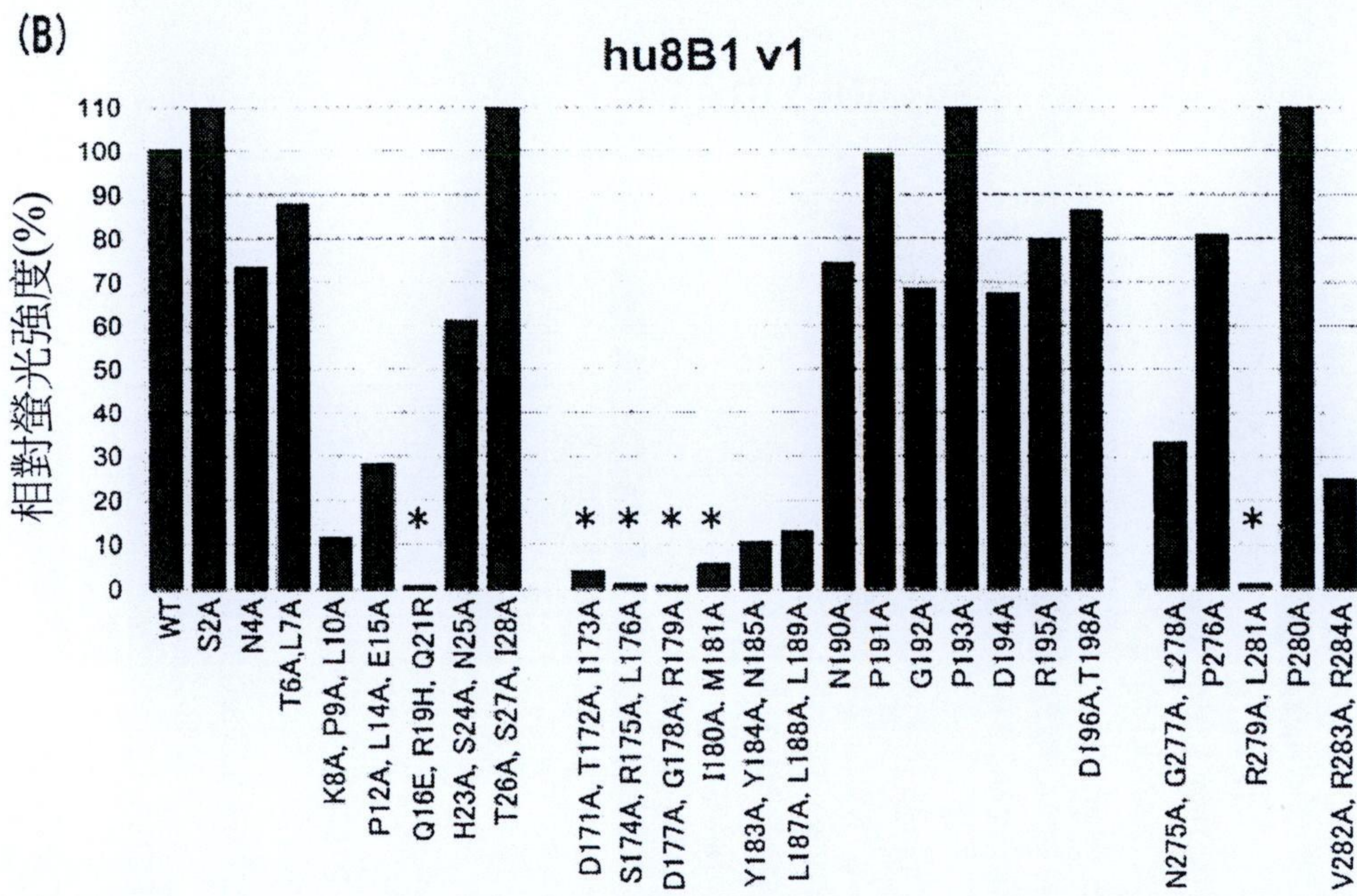
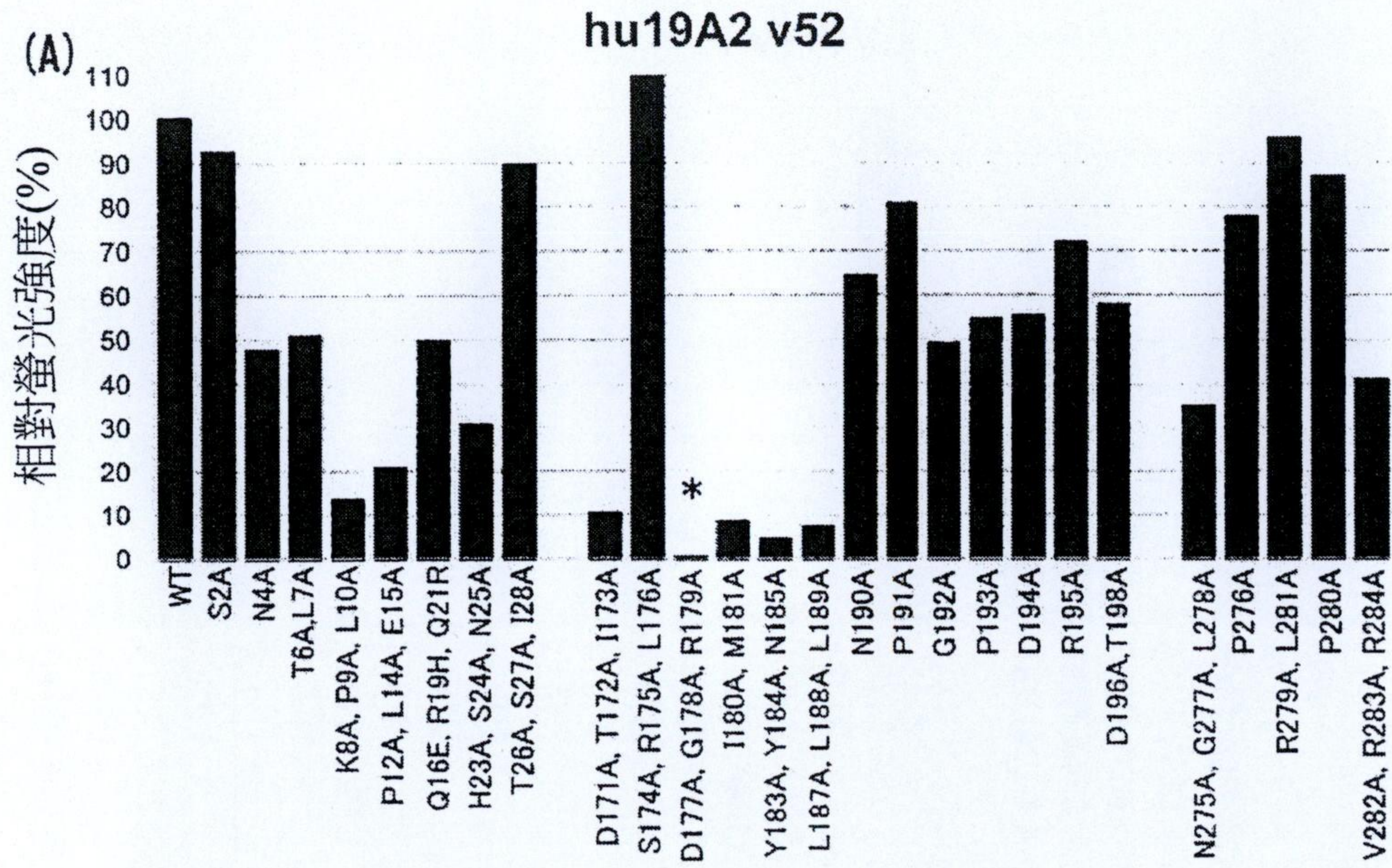


圖5

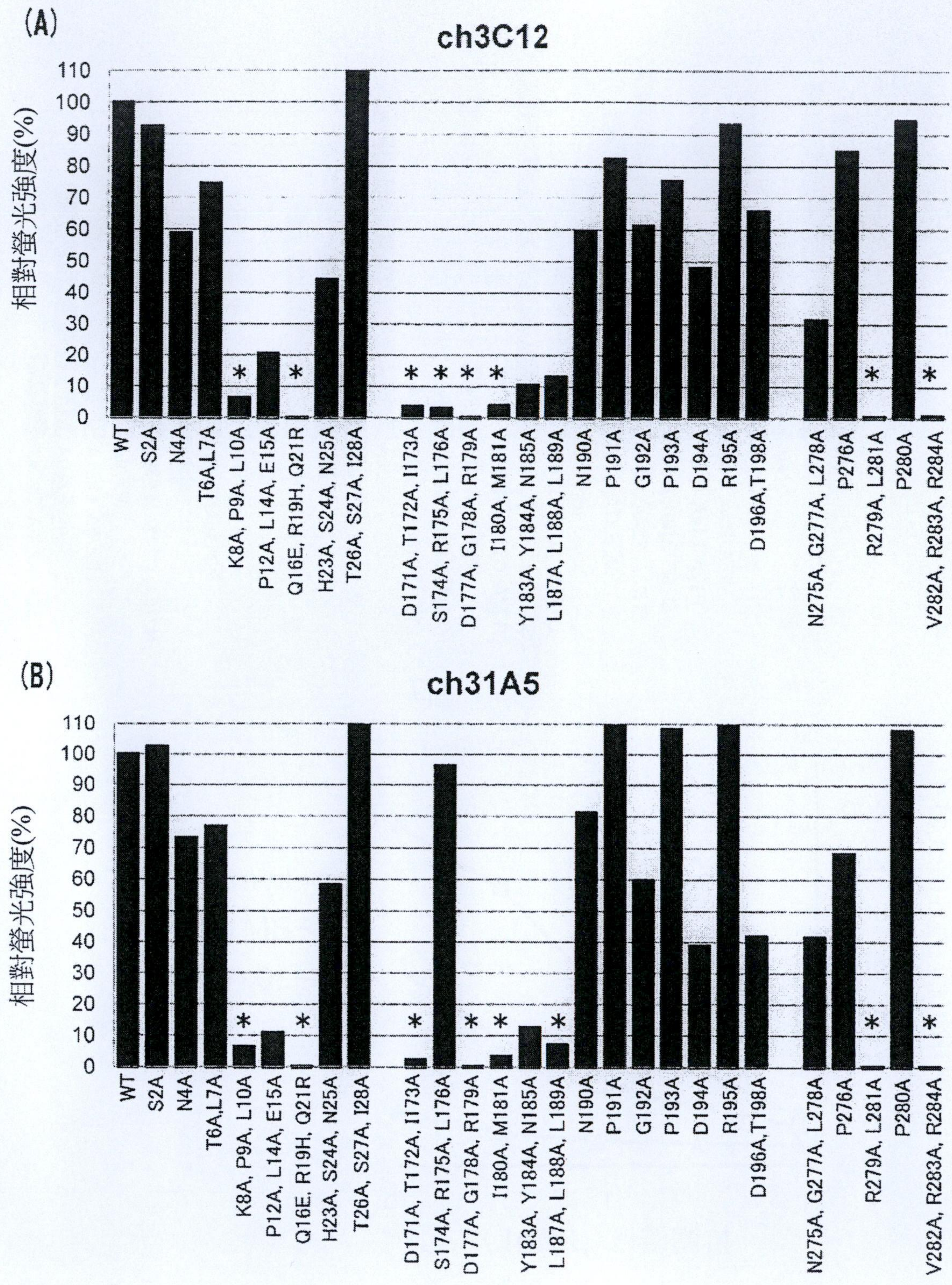


圖6

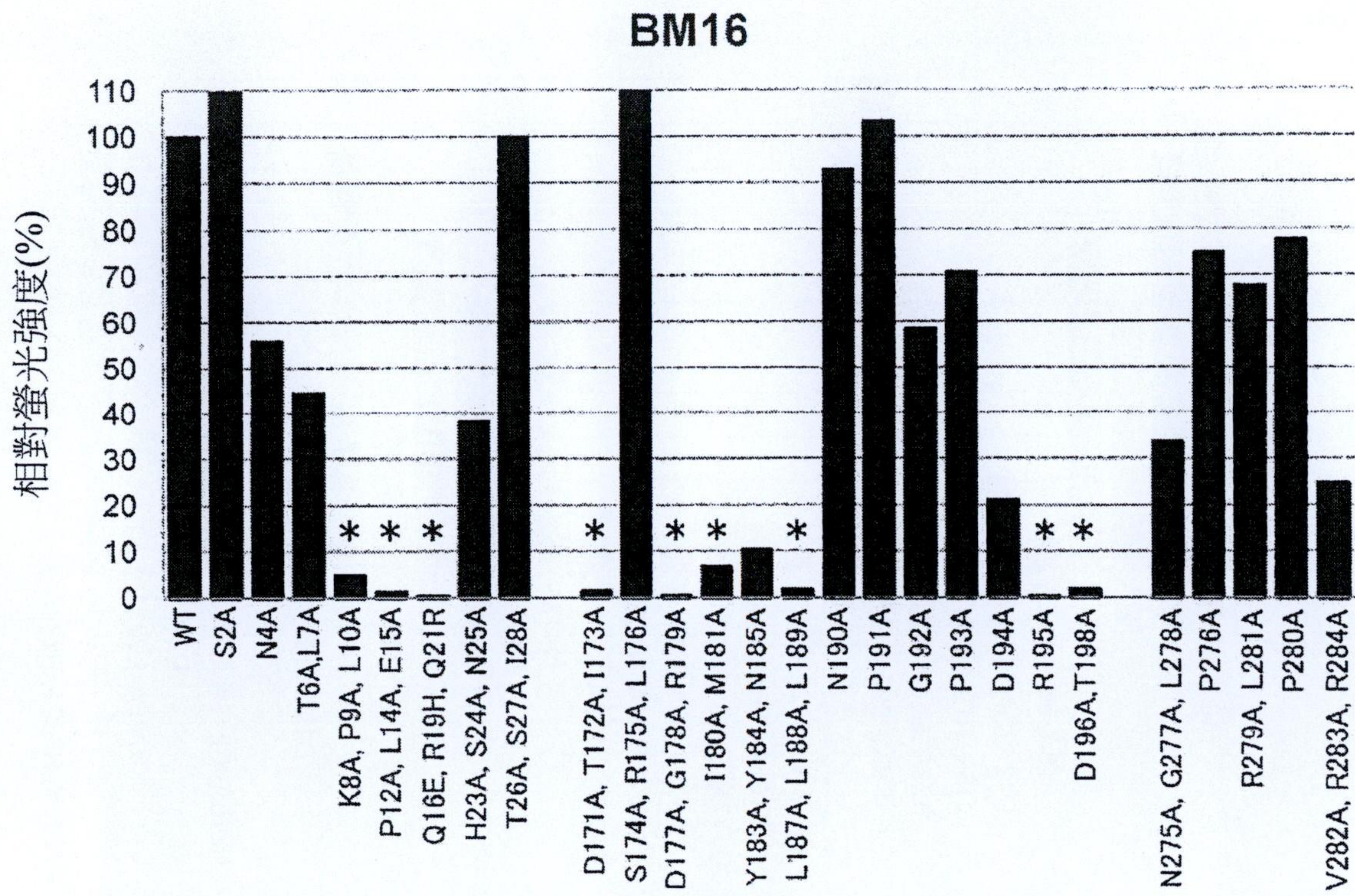


圖7

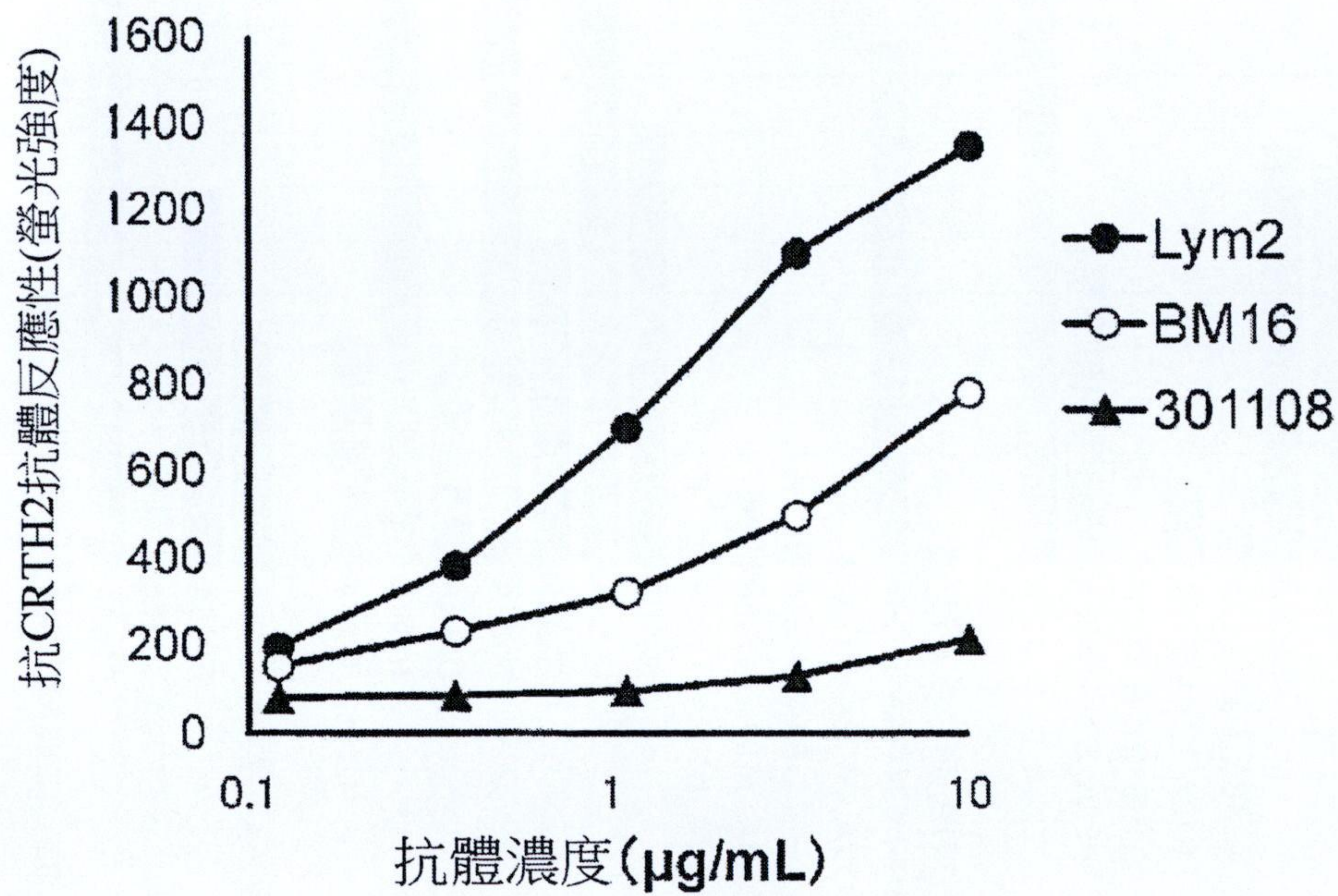


圖8

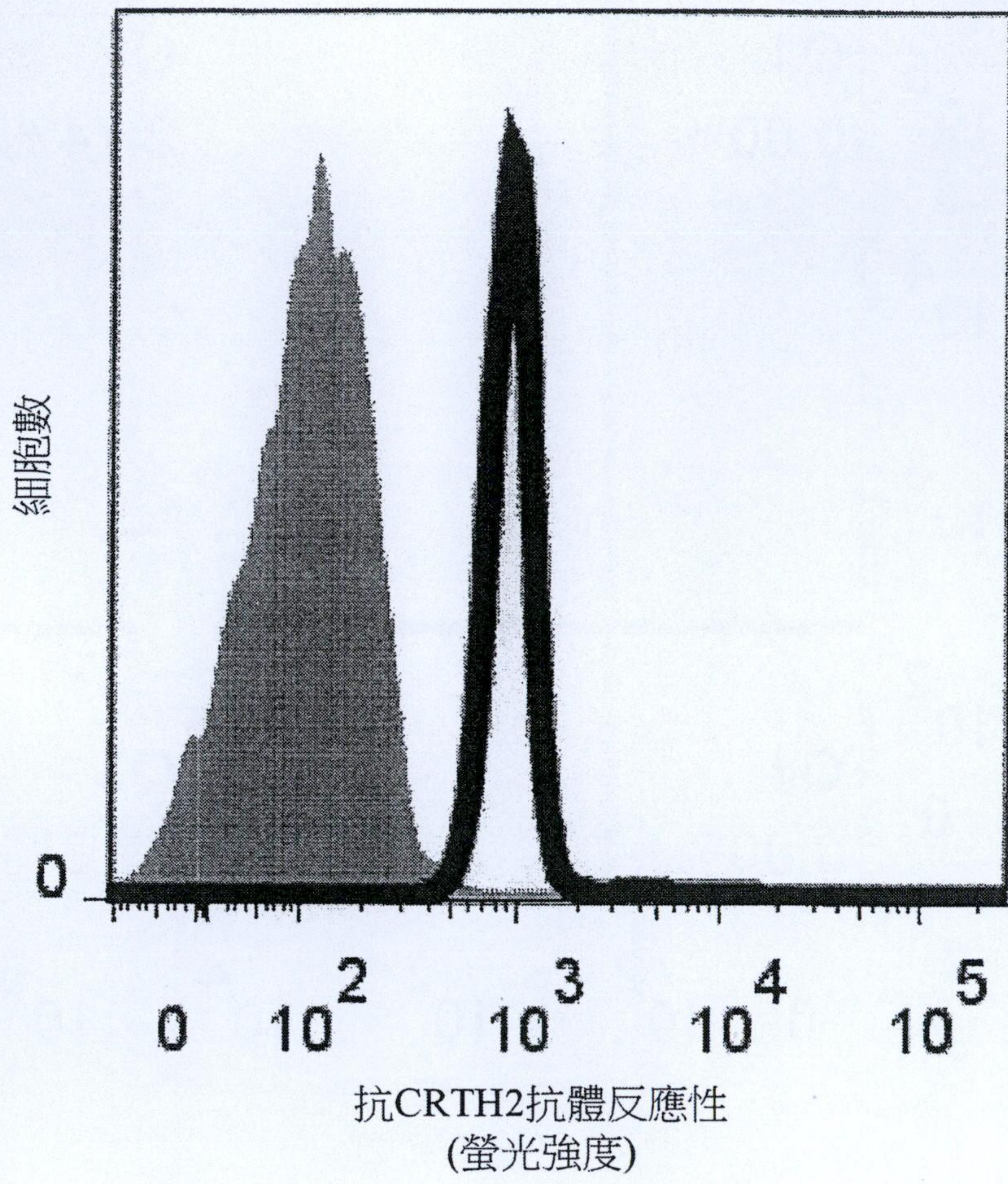


圖9

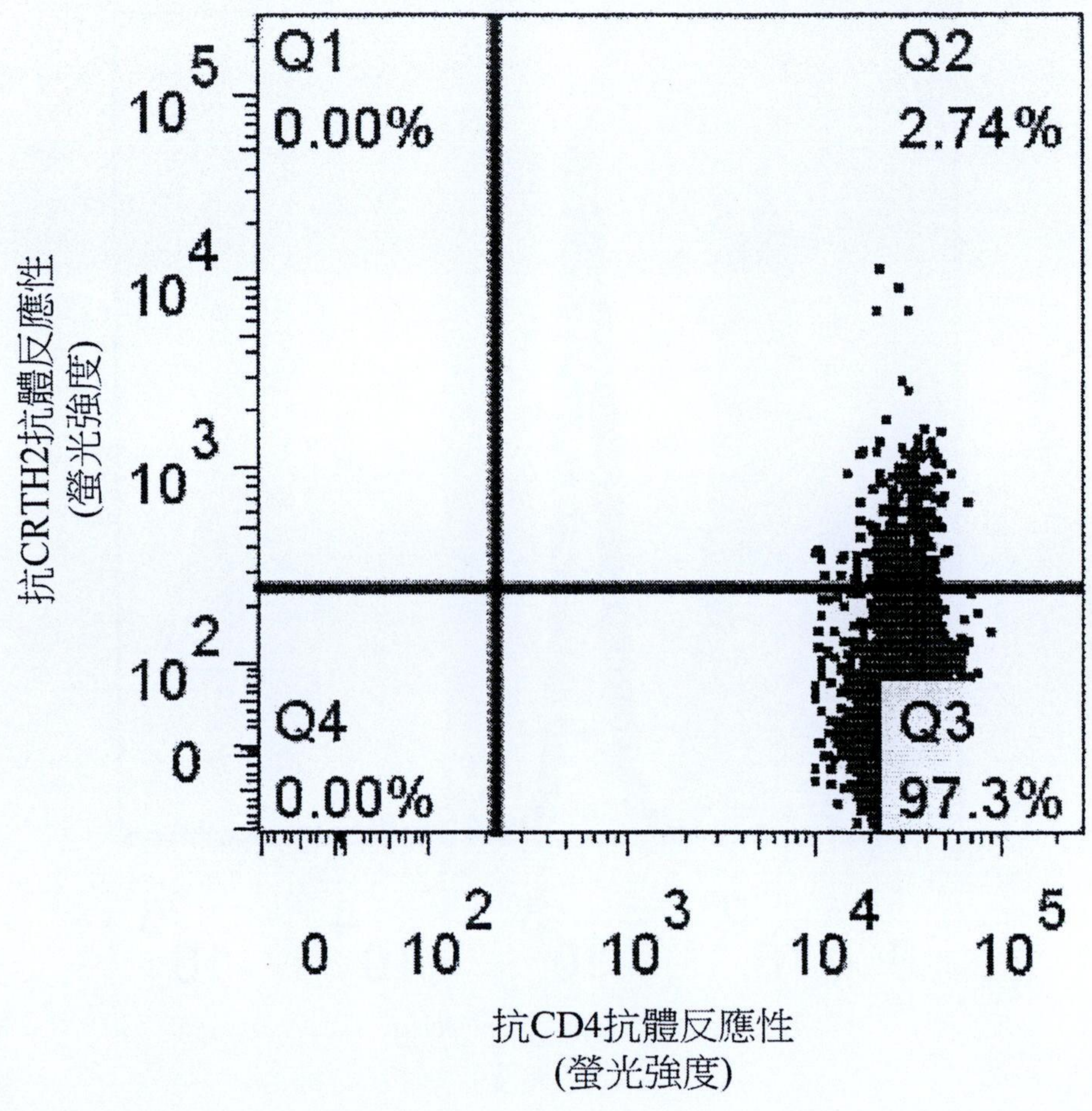


圖10

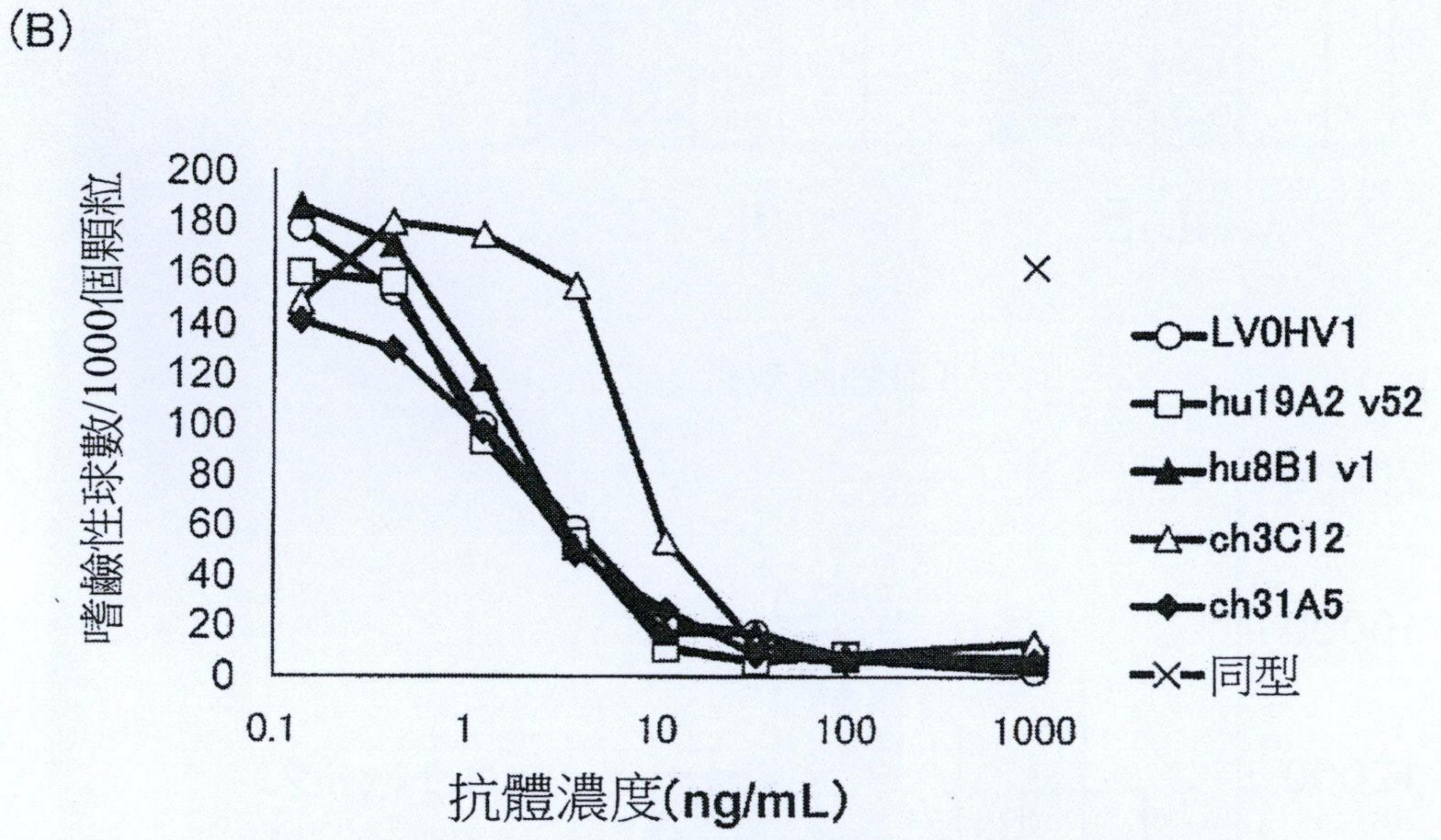
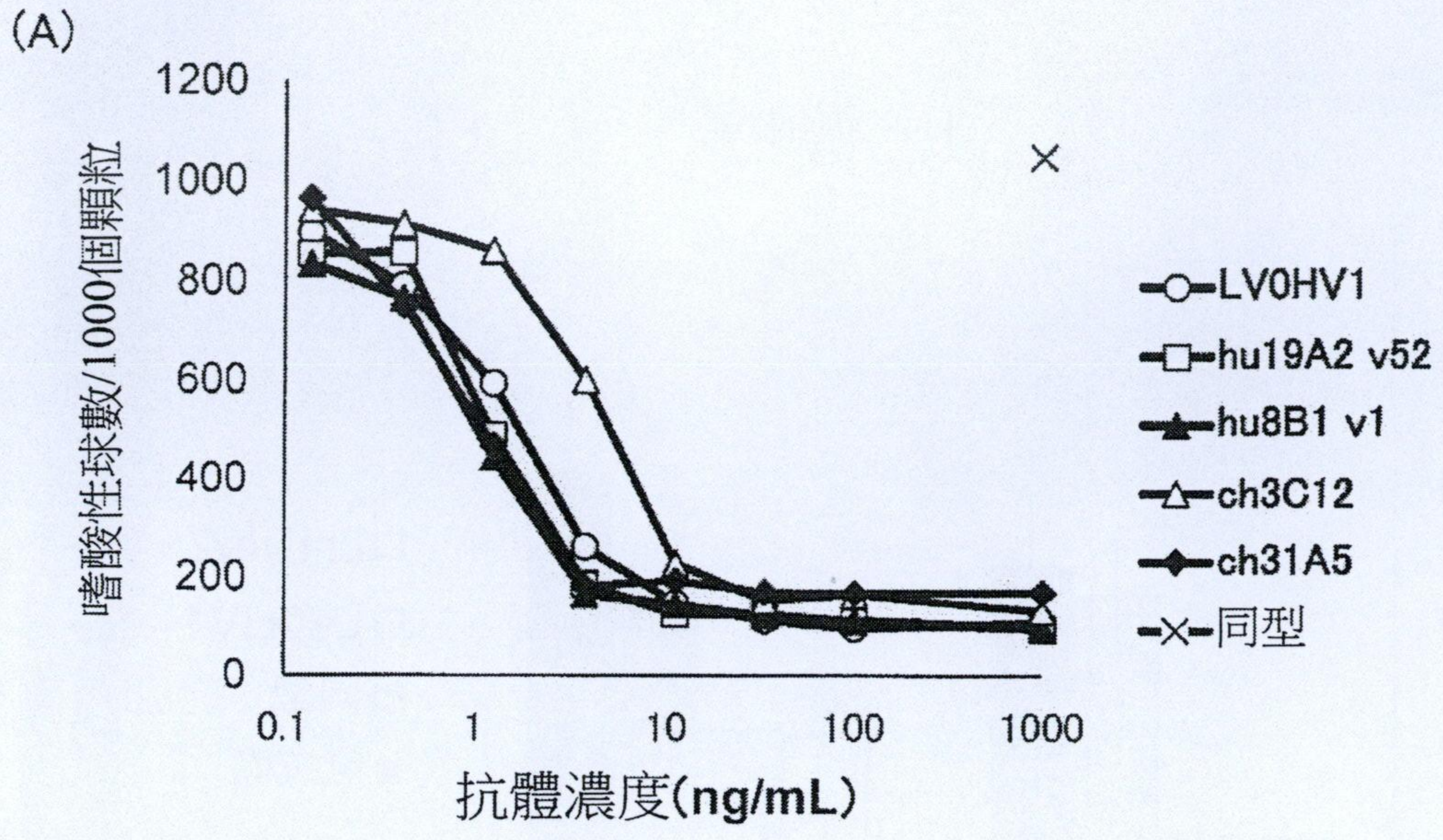


圖11

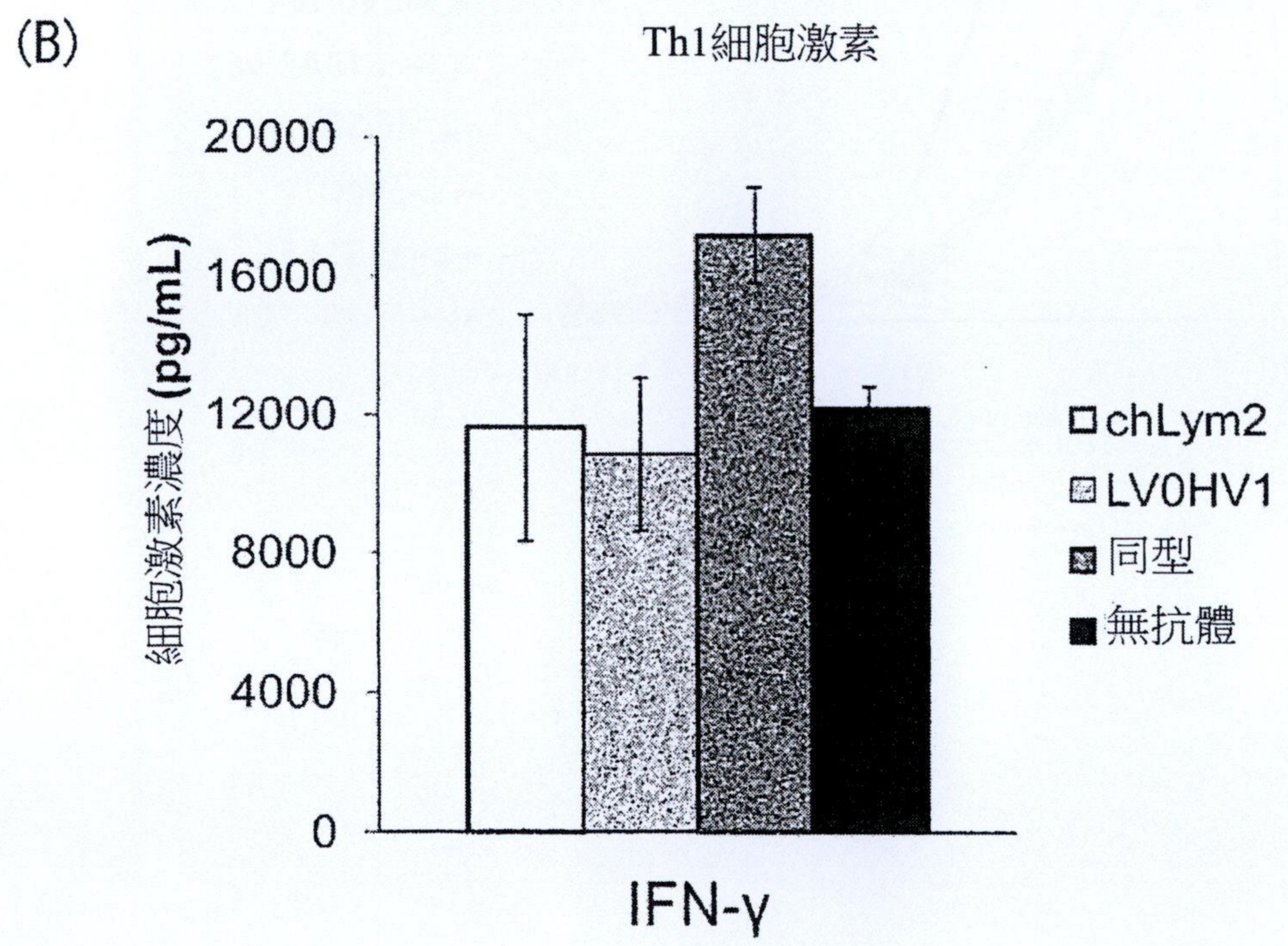
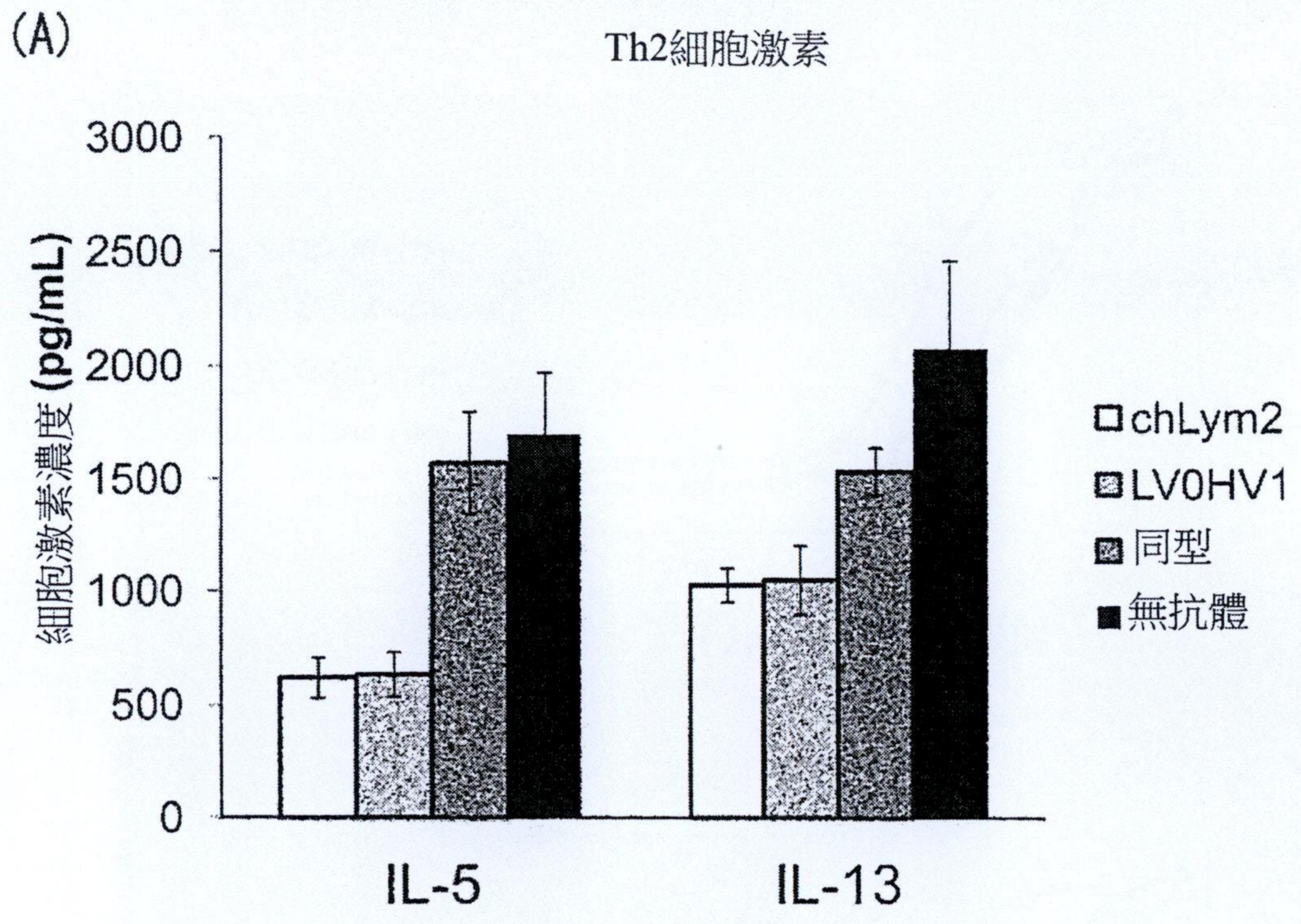


圖 12

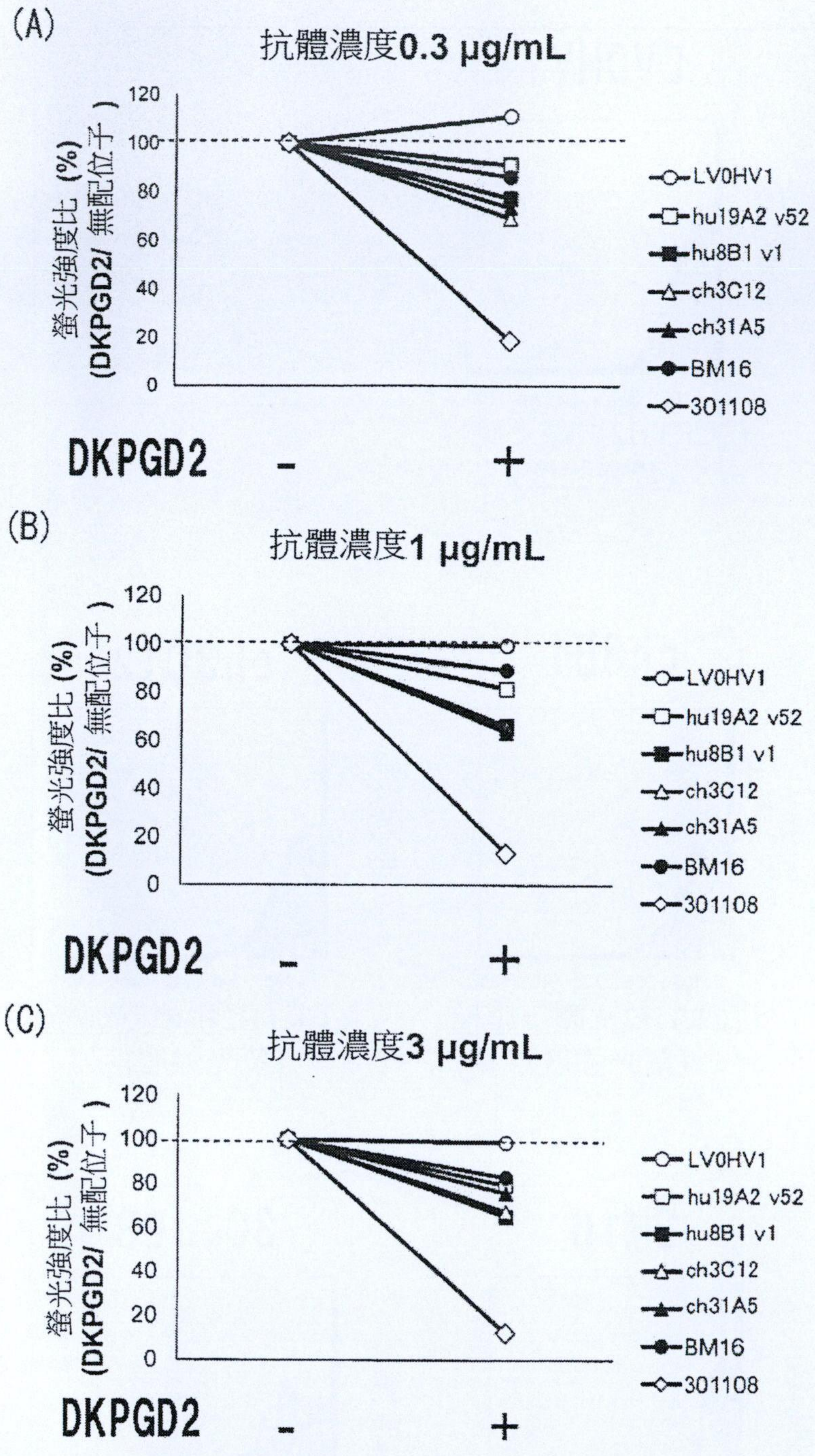


圖13

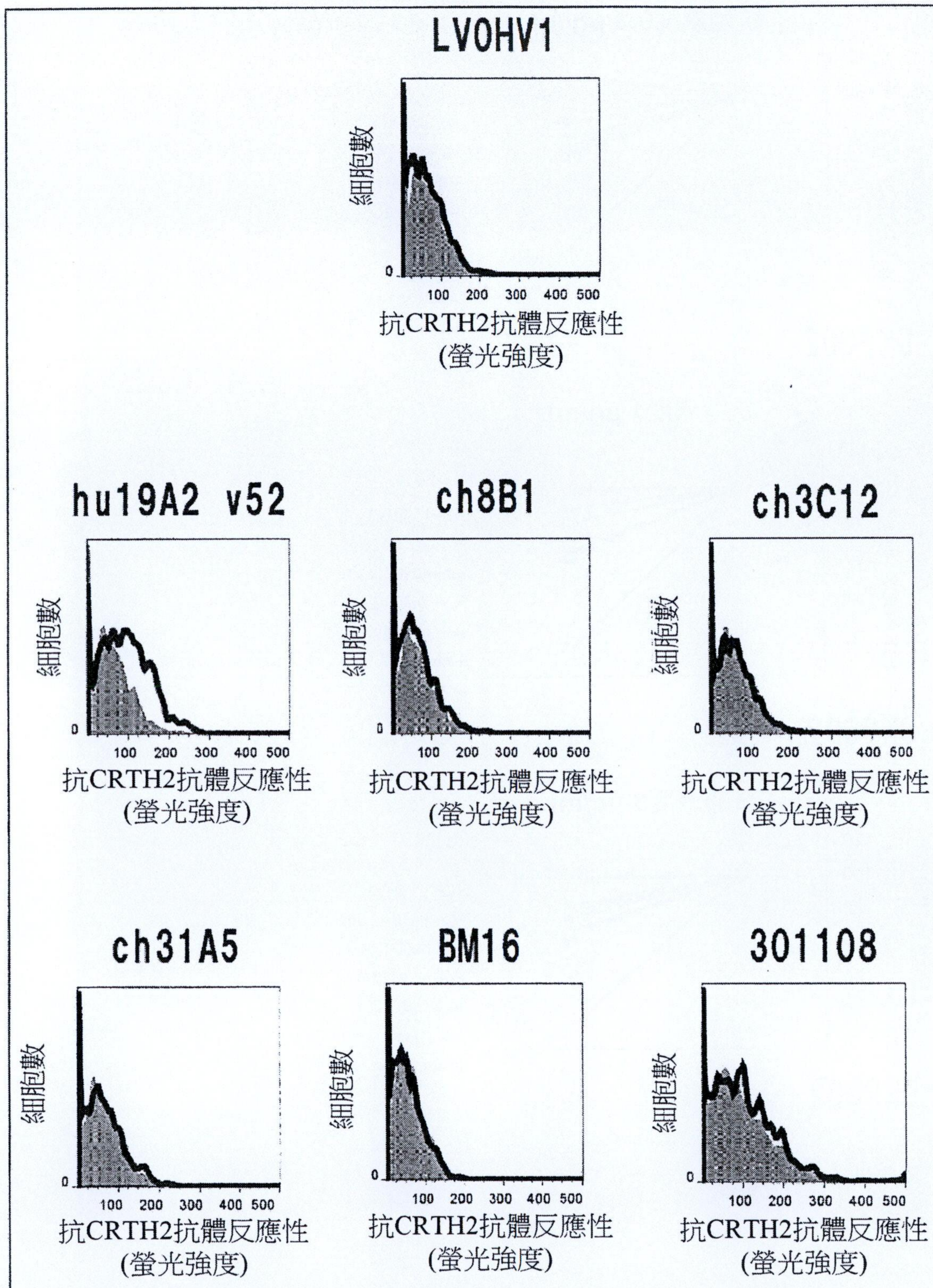


圖14

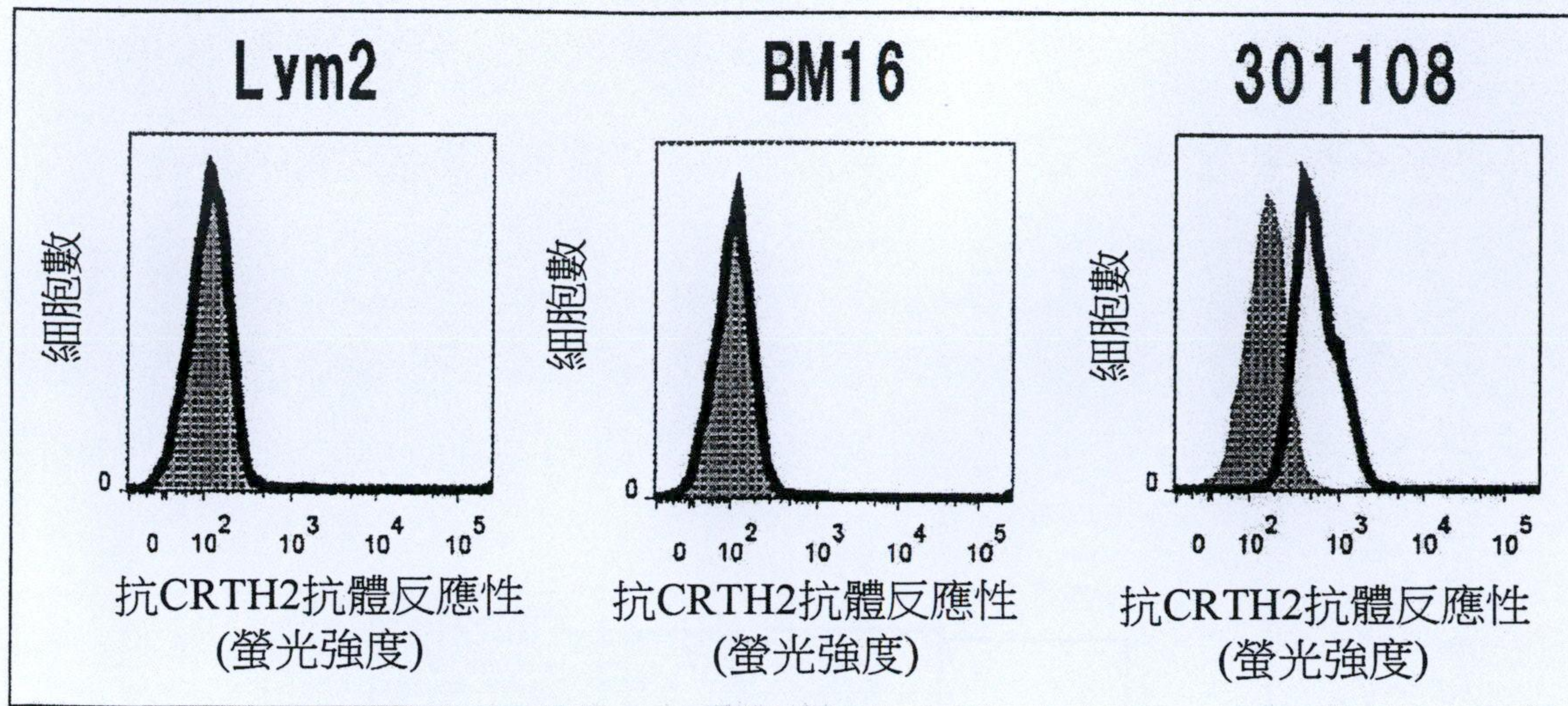


圖15

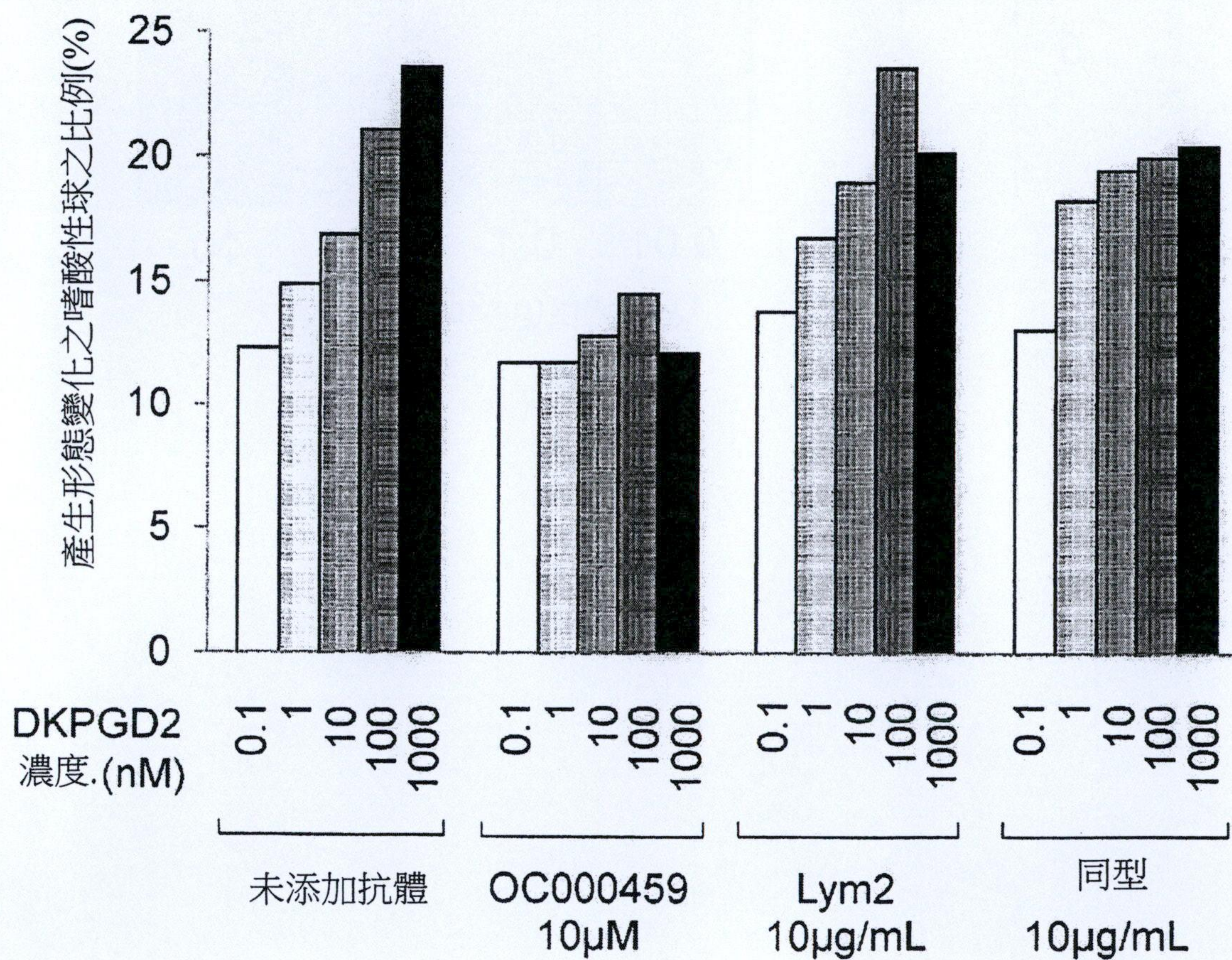


圖16

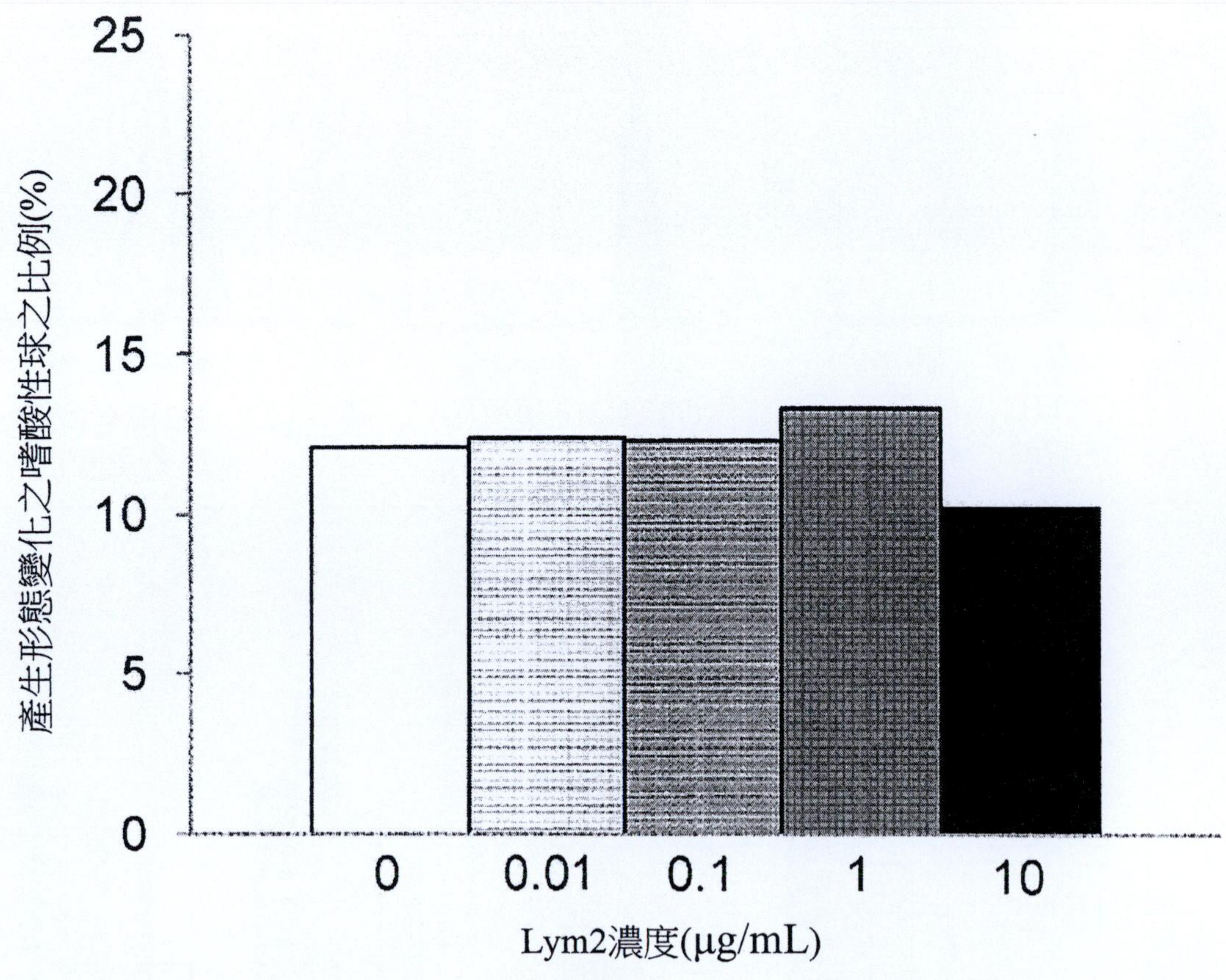


圖17

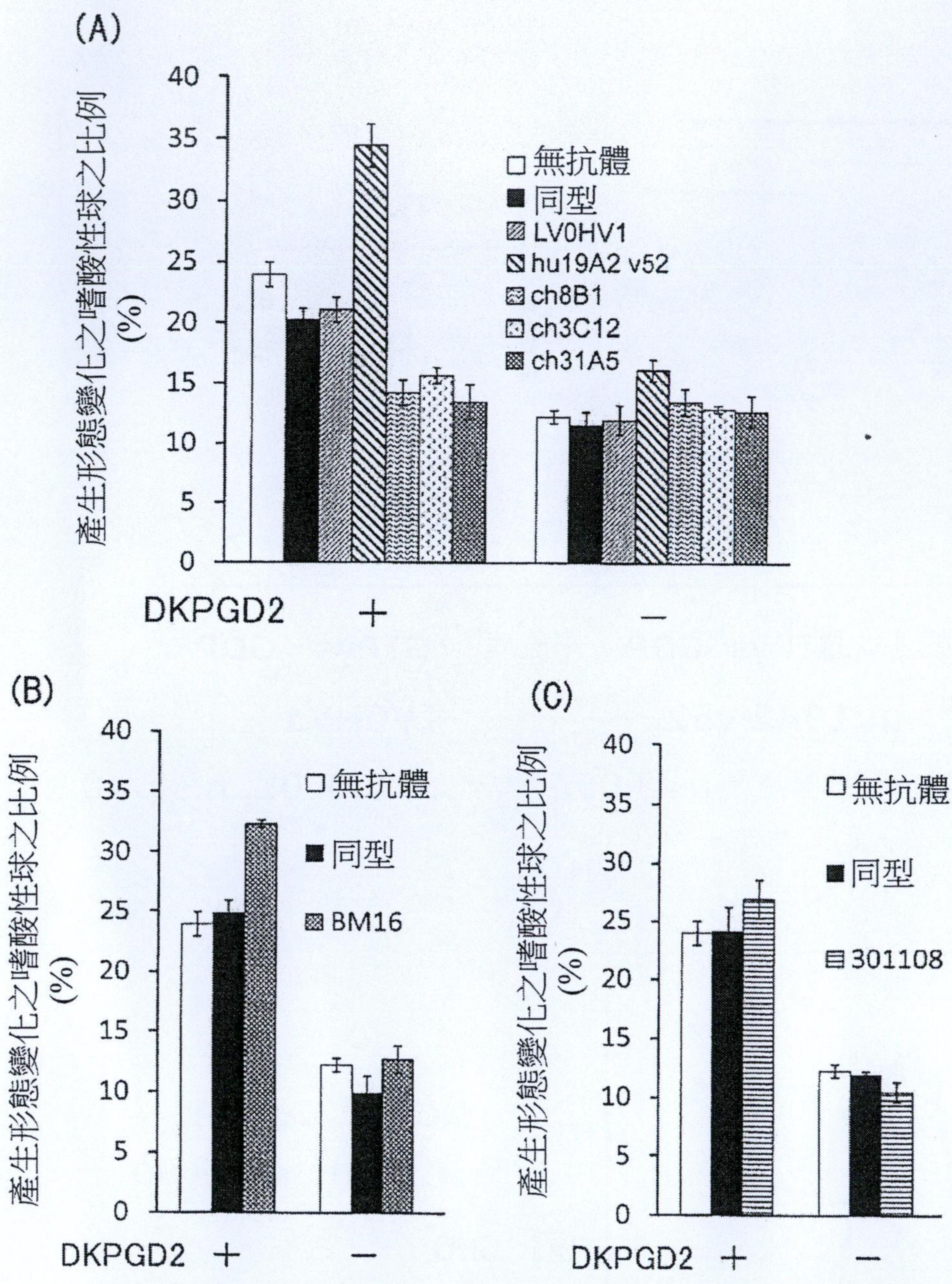


圖18

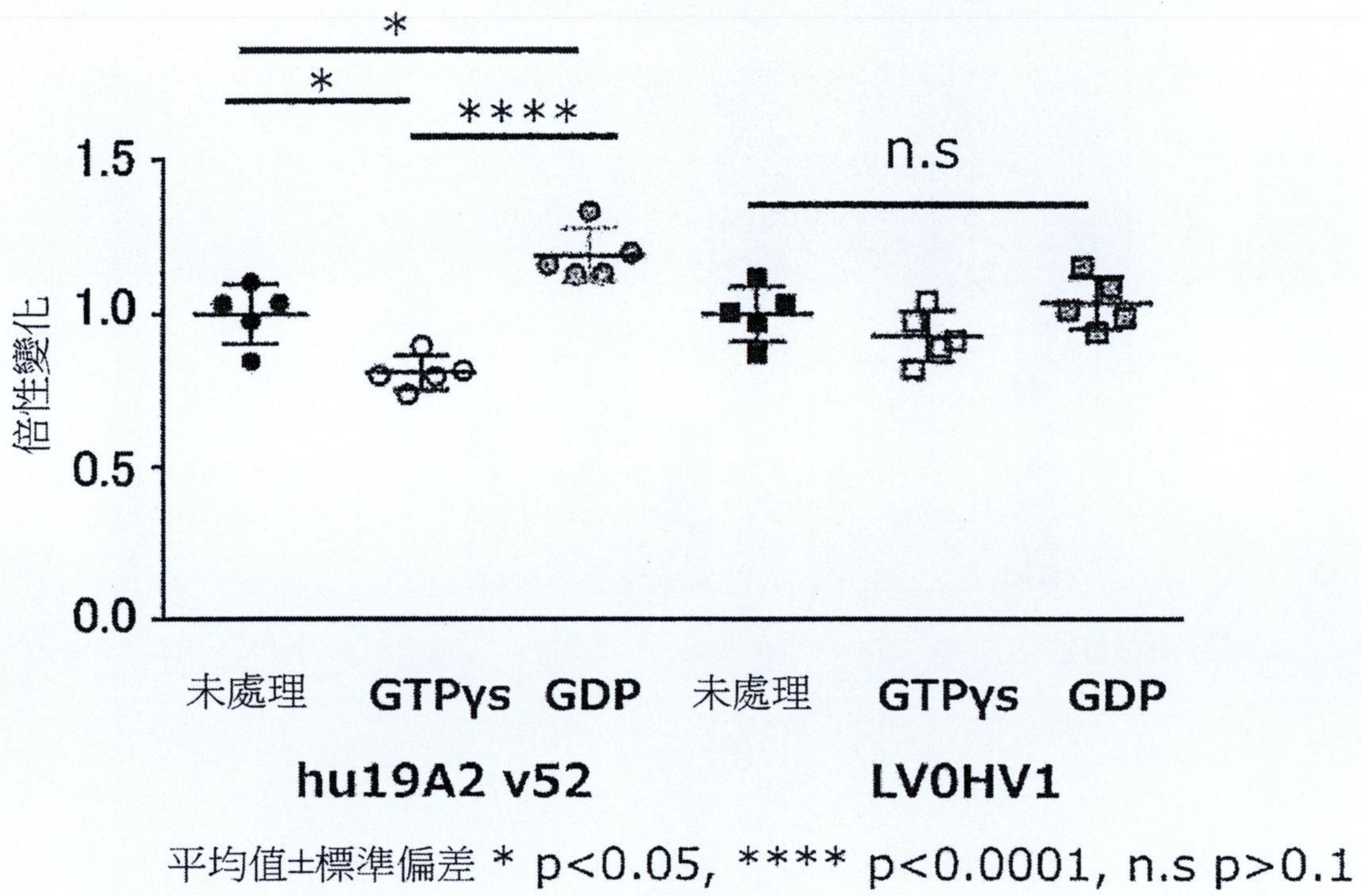


圖19

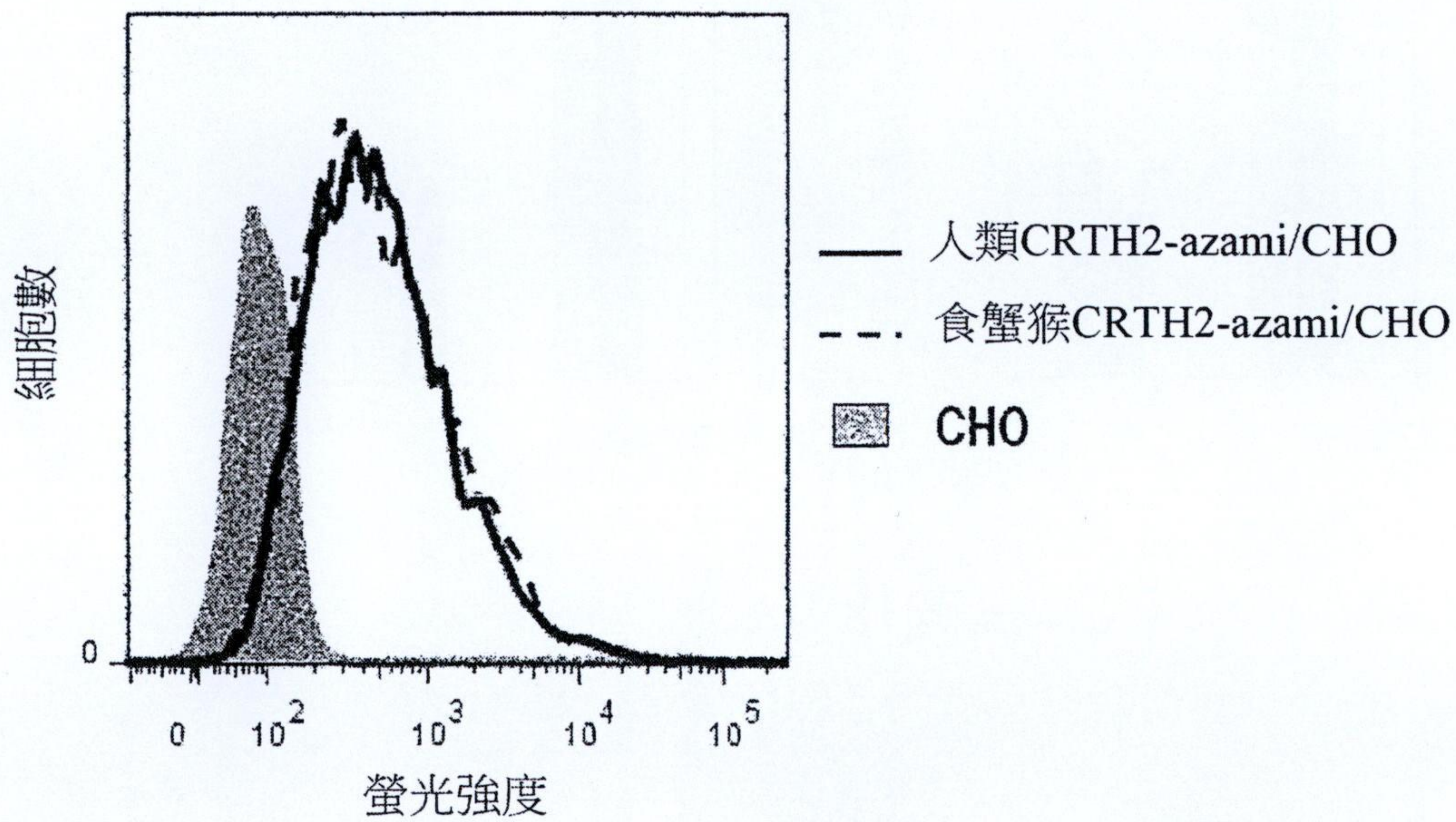


圖20

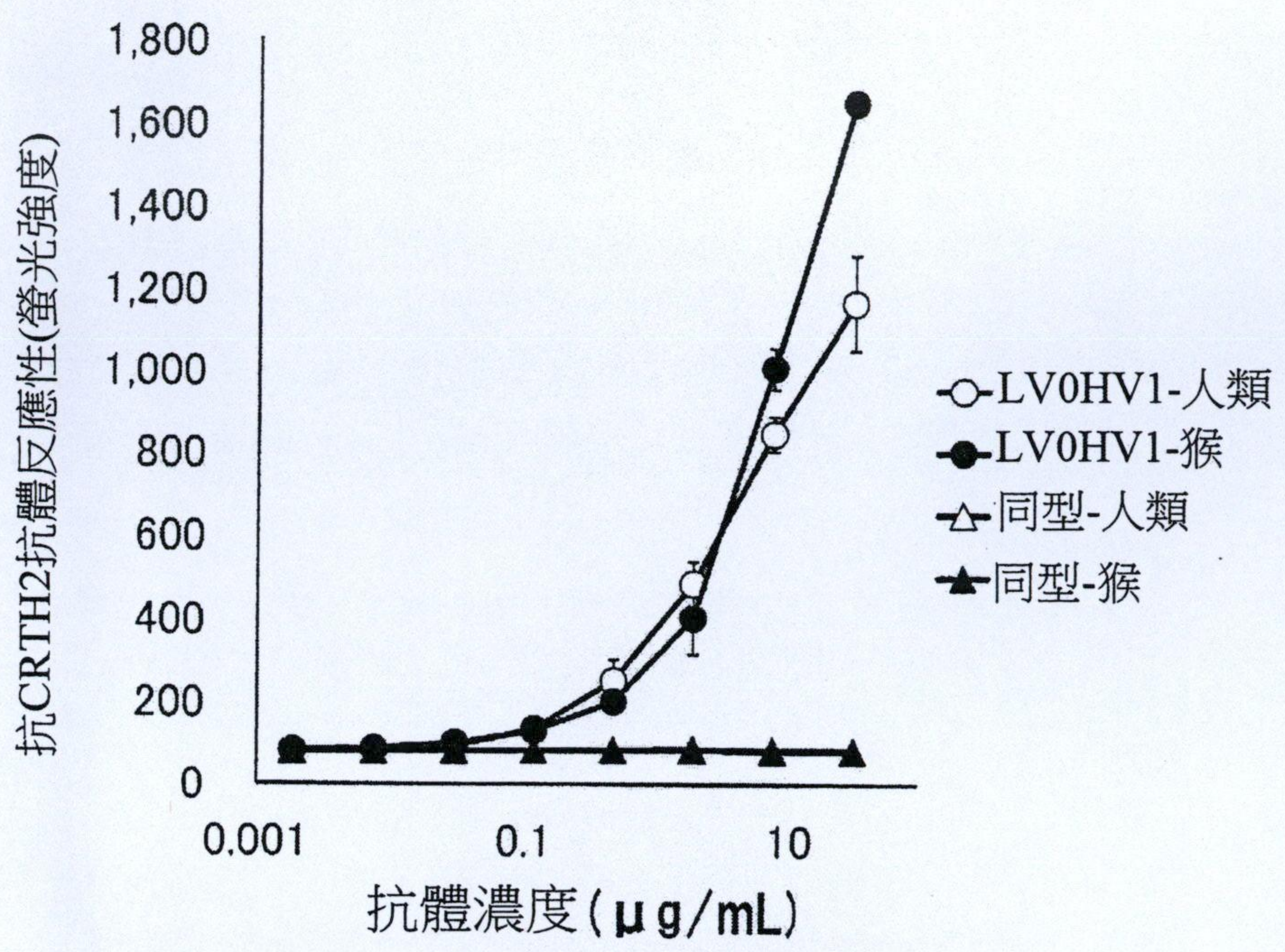


圖21