



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0030030
(43) 공개일자 2018년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인 교와 핫꼬 기린 가부시키가이샤 일본 도쿄도 씨요다구 오페마찌 1조메 6-1
<i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C12N 15/02</i> (2006.01)	
<i>C12N 5/10</i> (2006.01) <i>G01N 33/88</i> (2006.01)	
<i>G01N 33/92</i> (2006.01)	
(52) CPC특허분류	(72) 발명자 가메야마, 나오야 일본 1008185 도쿄도 씨요다구 오페마찌 1조메 6 반 1 고 교와 핫꼬 기린 가부시키가이샤 헤드 오피스 내
<i>C07K 16/2896</i> (2013.01)	안도, 무네토시 일본 1008185 도쿄도 씨요다구 오페마찌 1조메 6 반 1 고 교와 핫꼬 기린 가부시키가이샤 헤드 오피스 내
<i>C12N 15/02</i> (2013.01)	(뒷면에 계속)
(21) 출원번호 10-2018-7000812	(74) 대리인 장수길, 이석재
(22) 출원일자(국제) 2016년07월15일	
심사청구일자 없음	
(85) 번역문제출일자 2018년01월10일	
(86) 국제출원번호 PCT/JP2016/071027	
(87) 국제공개번호 WO 2017/010567	
국제공개일자 2017년01월19일	
(30) 우선권주장	
JP-P-2015-141633 2015년07월15일 일본(JP)	

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체

(57) 요 약

본 발명은, 인간 CRTH2를 특이적으로 인식하고, 결합하는 항체, 해당 항체 단편, 해당 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA, 해당 DNA를 포함하는 벡터, 해당 항체를 생산하는 하이브리도마 및 항체 생산 세포, 해당 항체의 제조 방법, 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물, 해당 항체 또는 항체 단편을 사용하는 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다나 기능 항진을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다나 기능 항진을 수반하는 질환 등의 치료 방법 및 진단 방법, 그리고 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 의약 및 진단약에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 5/10 (2013.01)
G01N 33/88 (2013.01)
G01N 33/92 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)

(72) 발명자

오가와, 신야

일본 1008185 도쿄도 씨요다구 오떼마찌 1 쪽메 6
반 1 고 교와 핫코 기린 가부시키가이샤 헤드 오피
스 내

오카다, 가즈키

일본 1008185 도쿄도 씨요다구 오떼마찌 1 쪽메 6
반 1 고 교와 핫코 기린 가부시키가이샤 헤드 오피
스 내

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 한쪽을 인식하고, 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 13번째의 이소류신, 14번째의 류신, 15번째의 글루탐산, 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신, 179번째의 아르기닌, 180번째의 이소류신, 181번째의 메티오닌, 182번째의 시스테인, 183번째의 티로신, 184번째의 티로신, 185번째의 아스파라긴, 186번째의 발린, 187번째의 류신, 188번째의 류신, 189번째의 류신, 195번째의 아르기닌, 196번째의 아스파라긴산, 197번째의 알라닌 및 198번째의 트레오닌으로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 인식하고, 결합하는 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가, 이하의 (a) 내지 (g)로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 인식하는 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

- (a) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신 및 15번째의 글루탐산,
- (b) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신 및 179번째의 아르기닌,
- (c) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 180번째의 이소류신 및 181번째의 메티오닌,
- (d) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 183번째의 티로신, 184번째의 티로신 및 185번째의 아스파라긴,
- (e) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 187번째의 류신, 188번째의 류신 및 189번째의 류신,
- (f) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 195번째의 아르기닌, 및
- (g) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가, 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

- (a) 항체 중쇄 가변 영역(이하, VH라 약기함)의 상보성 결정 영역(이하, CDR이라 약기함) 1 내지 3이, 각각 서열 번호 20 내지 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 항체 경쇄 가변 영역(이하, VL이라 약기함)의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 23 내지 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- (b) 서열 번호 49로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 49로 표시되는 아미노산 서열 중 18번째의 류신을 메티오닌으로, 77번째의 아스파라긴을 세린으로, 93번째의 발린을 트레오닌으로, 및 117번째의 트레오닌을 발린으로 치환하는 개변으로부터 선택되는 적어도 하나의 개변이 도입된 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 33으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 33으로 표시되는 아미노산 서열 중 2번째의 이소류신을 발린으로, 4번째의 메티오닌을 류신으로, 15번째의 프롤린을 류신으로, 및 85번째의 알라닌을 프롤린으로 치환하는 개변으로부터 선택되는 적어도 하나의 개변이 도입된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- (c) 서열 번호 49, 51, 53, 55, 57 및 59로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VH, 및 서열 번호 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VL을 포함하는 항체, 및

(d) 서열 번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가, 하기 (a) 내지 (h)로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

- (a) 인간 CRTH2의 리간드 존재 하에서 인간 CRTH2에 대한 반응성이 저하되지 않음,
- (b) 중화 활성을 갖지 않음,
- (c) 항체 의존성 세포 상해(ADCC) 활성을 가짐,
- (d) 비만 세포 및 Th1 세포 중 적어도 한쪽에 반응하지 않음,
- (e) 호산구, 호염기구, Th2 세포 및 2형 자연 림프구(ILC2)로부터 선택되는 적어도 하나의 세포에 반응함,
- (f) 아고니스트 활성을 갖지 않음,
- (g) 인간 CRTH2의 리간드에 의한 시그널을 증강시키지 않음, 및
- (h) 활성화 상태 또는 불활성화 상태의 인간 CRTH2에 대한 반응성이 변화되지 않음.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 Fc 영역을 포함하는 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 유전자 재조합 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 9

제8항에 있어서, 유전자 재조합 항체가, 인간형 키메라 항체, 인간형 CDR 이식 항체 및 인간 항체로부터 선택되는 어느 하나의 유전자 재조합 항체인, 유전자 재조합 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 원숭이 CRTH2에 결합하는 항체인, 항체 또는 해당 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 디아바디(diabody), dsFv 및 CDR을 포함하는 웹티드로부터 선택되는 어느 하나의 항체 단편인, 해당 항체 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 생산하는 하이브리도마.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 DNA.

청구항 14

제13항에 기재된 DNA를 함유하는 재조합체 벡터.

청구항 15

제14항에 기재된 재조합체 벡터를 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질전환주.

청구항 16

제12항에 기재된 하이브리도마 또는 제15항에 기재된 형질전환주를 배지에 배양하고, 배양물 중에 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 생산 축적시키고, 해당 배양물로부터 항체 또는 해당 항체 단편을 채취하는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법.

청구항 17

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료제.

청구항 18

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 진단제.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 2형 자연 림프구(ILC2)의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, 제제.

청구항 20

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료 방법.

청구항 21

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 진단 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 인간 CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 ILC2의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료 및 진단 중 적어도 한쪽에 사용하기 위한, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 24

제23항에 있어서, 인간 CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 ILC2의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 25

인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료 및 진단제 중 적어도 한쪽의 제조를 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 용도.

청구항 26

제25항에 있어서, 인간 CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진

중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 ILC2의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은, 인간 CRTH2를 특이적으로 인식하고, 결합하는 항 인간 CRTH2 항체, 해당 항체 단편, 해당 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA, 해당 DNA를 포함하는 벡터, 해당 항체를 생산하는 하이브리도마 및 항체 산생 세포, 해당 항체의 제조 방법, 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물, 해당 항체 또는 항체 단편을 사용하는 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다나 기능 항진을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다나 기능 항진을 수반하는 질환 등의 치료 방법 및 진단 방법, 그리고 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 의약 및 진단약에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인간 CRTH2(Chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells(Th2 세포 상 화학유인물질 수용체-상동 분자))는, GPR44, CD294, DP2 등의 별명으로도 알려져 있는 7회 막 관통형 G 단백질 공액형 수용체(G protein-coupled receptor, 이하, GPCR이라 기재함)이며, 프로스타글란딘 D2(이하, PGD2라 기재함)에 대한 수용체 중 하나인 것이 알려져 있다(비특허문헌 1). CRTH2는, 1996년에 인간 Th2 특이적 단백질로서 클로닝되어, B19라고 칭하여 개시되어 있다(특허문헌 1).

[0003]

CRTH2는, 리간드인 PGD2 및 13,14-디히드로-15-케토 프로스타글란딘 D2(13,14-dihydro-15-keto prostaglandin D2)(이하, DKPGD2라 기재함)로 대표되는 PGD2 대사물과 결합하여, 세포 내에 G_{αi} 단백질을 매개한 시그널을 전달하고, 그 결과, CRTH2 발현 세포의 유주(遊走) 및 활성화에 관여하는 것이 알려져 있다(비특허문헌 1).

[0004]

인간 CRTH2는 Th2 세포, 호산구, 호염기구 및 2형 자연 림프구(Type 2 innate lymphoid cells, 이하, ILC2라 기재함) 등에서 발현이 확인되고 있다(비특허문헌 1, 2). CRTH2는, Th2 사이토카인 산생 세포에 특이적으로 발현하는 표면 마커임이 보고되어 있다(비특허문헌 3).

[0005]

또한, ILC2는 2011년에 인간에 있어서 동정된 알레르기 응답에 관여하는 신규 세포 집단이며, 본 세포를 규정하는 특이적인 표면 마커로서 CRTH2가 예시되어 있다(비특허문헌 2). 또한, 비고전적 단핵구(non classical monocyte)나 Th2/Th17 세포에 CRTH2가 발현되어 있음이 보고되어 있다(비특허문헌 4, 5).

[0006]

천식을 비롯한 알레르기 질환에 있어서, CRTH2 발현 세포는 병태에 기여하는 것이 알려져 있다. 천식 환자에 있어서의 기관지 폐포 세정액 내의 세포에 있어서는, 건강인과 비교하여 고빈도로 CRTH2 양성 T세포가 확인됨이 보고되어 있고(비특허문헌 6), 아토피성 피부염에 있어서는, 중증도와 상관하여 CRTH2 양성 T세포가 증가함이 보고되어 있다(비특허문헌 7).

[0007]

호산구는 세포 상해성을 갖는 과립 단백질을 포함하고 있고, 해당 단백질의 침착이 만성 기관지 천식 환자의 기도 조직 또는 아토피성 피부염 환자의 병변 부위에서 확인되거나 하는 점에서, 호산구는 만성 기관지 천식 또는 아토피성 피부염 등의 알레르기성 질환의 병태 형성에 있어서 중요한 작용을 하고 있는 것으로 여겨지고 있다(비특허문헌 8, 9).

[0008]

호염기구는 세포 내에 히스타민이나 류코트리엔과 같은 염증성 분자를 저류하고, 세포 표면에 발현하는 Fc_ε 수용체나 Fc_γ 수용체의 가교에 의해, 해당 분자를 빙출함으로써, 알레르기 반응의 야기에 관련되어 있다(비특허문헌 10).

[0009]

ILC2는 기도 점막이나 피부와 같은 국소에 존재하는 세포이며, 조직 장애에 수반하여 산생되는 인터류킨(이하, IL이라 기재함)-25, IL-33과 같은 사이토카인에 응답하여, 대량의 Th2 사이토카인을 산생한다는 특성을 갖고, 알레르기 질환의 병태 형성에 관여한다고 여겨지고 있다(비특허문헌 11).

[0010]

CRTH2에 대한 모노클로날 항체로서, 301108(R&D사)이 시판되고 있다. 또한 BM16이 알려져 있다(특허문헌 2). 이들은 설치류 항체이며 의약품으로서는 개발되어 있지 않다.

[0011]

또한, 클론 19A2에 관한 유전자 재조합 키메라 항체 및 인간화 항체가, 이펙터 활성에 의해 CRTH2 발현 세포의 제거를 행하는 것, 클론 8B1에 관한 인간화 항체나 클론 3C12 및 31A5에 관한 마우스 항체가, CRTH2에 대한 안타고니스트 활성을 갖는 것이 개시되어 있다.

[0012] 또한 클론 19A2에 관한 항체는 인간 비만 세포에 대해서도 반응성을 갖는 것이 개시되어 있다(특허문현 3).

선행기술문현

특허문현

[0013] (특허문현 0001) 일본 특허 제3144805호 공보

(특허문현 0002) 국제 공개 제97/46677호

(특허문현 0003) 국제 공개 제2014/144865호

비특허문현

[0014] (비)특허문현 0001) The Journal of Experimental Medicine, 2001. 193(2): p.255-261.

(비)특허문현 0002) Nature Immunology, 2011. 12(11): p.1055-1062.

(비)특허문현 0003) European Journal of Immunology, 2000. 30(10): p.2972-2979.

(비)특허문현 0004) Blood, 2011. 118(5): e16-31.

(비)특허문현 0005) Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014. 134(5): p. 1175-1186. e7.

(비)특허문현 0006) Clinical & Experimental Immunology, 2010. 161(1): p. 34-40.

(비)특허문현 0007) Journal of Investigative Dermatology, 2002. 119(3): p. 609-616.

(비)특허문현 0008) Advances in Immunology, 1986. 39: p. 177-253.

(비)특허문현 0009) Immunology Today, 1992. 13(12): p. 501-507.

(비)특허문현 0010) Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. 132(4): p. 789-801.

(비)특허문현 0011) Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014. 134(3): p. 671-678.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 지금까지 복수의 인간 CRTH2 항체가 확립되어 있지만, 각종 인간 면역 세포에 대한 반응성이나, 인간 CRTH2에 대한 특이적 결합 활성, 또는 인간 CRTH2 리간드 의존적인 활성에 대한 영향 등, 원하는 활성을 갖는 항 인간 CRTH2 항체의 확립이 요망되고 있었다.

[0016] 본 발명의 목적은, 인간 CRTH2의 특징적인 애피토프를 인식하고, 결합함으로써 원하는 활성을 갖는 항 인간 CRTH2 항체, 해당 항체 단편, 해당 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA, 해당 DNA를 포함하는 벡터, 해당 항체를 생산하는 하이브리도마 및 항체 산생 세포, 해당 항체의 제조 방법, 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물, 해당 항체 또는 항체 단편을 사용하는 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다나 기능 항진을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다나 기능 항진을 수반하는 질환 등의 치료 방법 및 진단 방법, 그리고 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 의약 및 진단약을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은, 이하의 (1) 내지 (26)에 관한 것이다.

[0018] (1) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 한쪽을 인식하고, 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편.

[0019] (2) 항체가, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 13번째의 이소류신, 14번째의 류신, 15번째의 글루탐산, 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신, 179번째의 아르기닌, 180번째의 이

소류신, 181번째의 메티오닌, 182번째의 시스테인, 183번째의 티로신, 184번째의 티로신, 185번째의 아스파라긴, 186번째의 발린, 187번째의 류신, 188번째의 류신, 189번째의 류신, 195번째의 아르기닌, 196번째의 아스파라긴산, 197번째의 알라닌 및 198번째의 트레오닌으로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 인식하고, 결합하는 항체인, (1)에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.

- [0020] (3) 항체가, 이하의 (a) 내지 (g)로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 인식하는 항체인, (1) 또는 (2)에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0021] (a) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신 및 15번째의 글루탐산,
- [0022] (b) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신 및 179번째의 아르기닌,
- [0023] (c) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 180번째의 이소류신 및 181번째의 메티오닌,
- [0024] (d) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 183번째의 티로신, 184번째의 티로신 및 185번째의 아스파라긴,
- [0025] (e) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 187번째의 류신, 188번째의 류신 및 189번째의 류신,
- [0026] (f) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 195번째의 아르기닌, 및
- [0027] (g) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌.
- [0028] (4) 항체가, 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 항체인, (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0029] (a) 항체 중쇄 가변 영역(이하, VH라 약기함)의 상보성 결정 영역(이하, CDR이라 약기함) 1 내지 3이, 각각 서열 번호 20 내지 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 항체 경쇄 가변 영역(이하, VL이라 약기함)의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 23 내지 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0030] (b) 서열 번호 49로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 49로 표시되는 아미노산 서열 중 18번째의 류신을 메티오닌으로, 77번째의 아스파라긴을 세린으로, 93번째의 발린을 트레오닌으로, 및 117번째의 트레오닌을 발린으로 치환하는 개변으로부터 선택되는 적어도 하나의 개변이 도입된 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 33으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 33으로 표시되는 아미노산 서열 중 2번째의 이소류신을 발린으로, 4번째의 메티오닌을 류신으로, 15번째의 프롤린을 류신으로, 및 85번째의 알라닌을 프롤린으로 치환하는 개변으로부터 선택되는 적어도 하나의 개변이 도입된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0031] (c) 서열 번호 49, 51, 53, 55, 57 및 59로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VH, 및 서열 번호 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VL을 포함하는 항체, 및
- [0032] (d) 서열 번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체.
- [0033] (5) 항체가, 하기 (a) 내지 (h)로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는 항체인, (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0034] (a) 인간 CRTH2의 리간드 존재 하에서 인간 CRTH2에 대한 반응성이 저하되지 않음,
- [0035] (b) 중화 활성을 갖지 않음,
- [0036] (c) 항체 의존성 세포 상해(ADCC) 활성을 가짐,
- [0037] (d) 비만 세포 및 Th1 세포 중 적어도 한쪽에 반응하지 않음,
- [0038] (e) 호산구, 호염기구, Th2 세포 및 2형 자연 림프구(ILC2)로부터 선택되는 적어도 하나의 세포에 반응함,
- [0039] (f) 아고니스트 활성을 갖지 않음,
- [0040] (g) 인간 CRTH2의 리간드에 의한 시그널을 증강시키지 않음, 및

- [0041] (h) 활성화 상태 또는 불활성화 상태의 인간 CRTH2에 대한 반응성이 변화되지 않음.
- [0042] (6) 항체가, 인간 Fc 영역을 포함하는 항체인, (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0043] (7) 항체가, 모노클로날 항체인 (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0044] (8) 항체가, 유전자 재조합 항체인 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0045] (9) 유전자 재조합 항체가, 인간형 키메라 항체, 인간형 CDR 이식 항체 및 인간 항체로부터 선택되는 어느 하나의 유전자 재조합 항체인, (8)에 기재된 유전자 재조합 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0046] (10) 항체가, 원숭이 CRTH2에 결합하는 항체인, (1) 내지 (9) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 단편.
- [0047] (11) Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 디아바디(diabody), dsFv 및 CDR을 포함하는 펩티드로부터 선택되는 어느 하나의 항체 단편인, (1) 내지 (10) 중 어느 하나에 기재된 해당 항체 단편.
- [0048] (12) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 생산하는 하이브리도마.
- [0049] (13) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 DNA.
- [0050] (14) (13)에 기재된 DNA를 함유하는 재조합체 벡터.
- [0051] (15) (14)에 기재된 재조합체 벡터를 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질전환주.
- [0052] (16) (12)에 기재된 하이브리도마 또는 (15)에 기재된 형질전환주를 배지에 배양하고, 배양물 중에 (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 생산 축적시키고, 해당 배양물로부터 항체 또는 해당 항체 단편을 채취하는 것을 특징으로 하는 (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법.
- [0053] (17) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료제.
- [0054] (18) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 진단제.
- [0055] (19) CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 2형 자연 림프구(ILC2)의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, (17) 또는 (18)에 기재된 제제.
- [0056] (20) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료 방법.
- [0057] (21) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 진단 방법.
- [0058] (22) 인간 CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 ILC2의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, (20) 또는 (21)에 기재된 방법.
- [0059] (23) 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료 및 진단 중 적어도 한쪽에 사용하기 위한, (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0060] (24) 인간 CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 ILC2의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, (23)에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0061] (25) 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료 및 진단제 중 적어도 한쪽의 제조를 위한, (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 용도.
- [0062] (26) 인간 CRTH2가 관계하는 질환이 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 또는 ILC2의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환인, (25)에 기재된 용도.

발명의 효과

- [0063] 본 발명에 의해 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 한쪽을 인식하고, 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편 등이 제공된다.
- [0064] 본 발명의 항체는, 호산구, 호염기구, Th2 세포, ILC2 등의 CRTH2를 발현하는 세포에 특이적으로 반응하고, 고농도의 리간드 존재 하에서도 CRTH2 발현 세포에 높은 반응성을 나타냄과 함께, 아고니스트 활성, 중화 활성, 및 인간 CRTH2의 리간드에 의한 시그널의 증강 활성을 갖지 않는다. 따라서 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편은, CRTH2가 발현하는 호산구, 호염기구, Th2 세포, ILC2 등의 CRTH2를 발현하는 세포를 표적으로 하는 치료효과를 발휘할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- 도 1은, 시그널 서열을 포함하지 않은 Lym2 항체 경쇄 가변 영역 및 각 인간화 Lym2 항체 경쇄 가변 영역(LV0, LV1, LV2a, LV2b, LV2c, LV3a, LV3b 및 LV4)의 아미노산 서열을 나타낸다. 각 서열 중의 프레임으로 둘러싸인 영역은, CDR 서열을 나타낸다.
- 도 2는, 시그널 서열을 포함하지 않은 Lym2 항체 중쇄 가변 영역 및 각 인간화 Lym2 항체 중쇄 가변 영역(HV0, HV1, HV2a, HV2b, HV3 및 HV4)의 아미노산 서열을 나타낸다. 각 서열 중의 프레임으로 둘러싸인 영역은, CDR 서열을 나타낸다.
- 도 3의 (A) 내지 (C)는, 래트/인간 키메라형 Lym2 항체(이하, chLym2라 기재하는 경우도 있음) 및 인간화 Lym2 항체의 인간 호산구 및 인간 호염기구에 대한 세포 상해 활성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 도 3의 (A) 내지 (C)에 있어서, 각각, 좌측의 도면은 인간 호산구에 대한 세포 상해 활성을, 우측의 도면은 인간 호염기구에 대한 세포 상해 활성을 나타낸다. 각각의 도면에 있어서 종축은 컨트롤 비즈 2000개당 각 세포의 개수를, 횡축은 항체 농도를 나타낸다. 도 3의 (A) 중 ○은 chLym2, ●은 인간화 Lym2 항체 LVOHV0, △은 아이소타입 컨트롤 항체를 나타낸다. 도 3의 (B) 중 ○은 chLym2, ■은 인간화 Lym2 항체 LVOHV1, △은 아이소타입 컨트롤 항체를 나타낸다. 도 3의 (C) 중 ○은 chLym2, ▲은 인간화 Lym2 항체 LVOHV2a, △은 아이소타입 컨트롤 항체를 나타낸다.

도 4의 (A)는 인간화 Lym2 항체 LVOHV1, 도 4의 (B)는 chLym2의 각 인간 CRTH2 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성을 각각 나타낸 것이다. 각각의 도면에 있어서, 종축은 아자미 그린 태그의 형광 강도이며, 각 항인간 CRTH2 모노클로날 항체의 형광 강도를 보정한 상대적 형광 강도에 관해서, 야생형 인간 CRTH2 발현 세포에 대한 반응성의 값을 100%라 했을 때의, 각 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성의 값(%)을 나타낸다. 횡축에 있어서 WT는 야생형 인간 CRTH2를 나타내고, 그 이외에는, 아미노산 치환체의 종류를 나타낸다. *은 야생형 CRTH2의 상대적 형광 강도로부터 90% 이상의 상대적 형광 강도의 저하가 확인된 것을 의미한다. 이하, 도 5 내지 도 7도 동일하다.

도 5의 (A)는 hu19A2 v52, 도 5의 (B)는 hu8B1 v1의 각 CRTH2 아미노산 치환체에 대한 반응성을 각각 나타낸 것이다.

도 6의 (A)는 ch3C12, 도 6의 (B)는 ch31A5의 각 CRTH2 아미노산 치환체에 대한 반응성을 각각 나타낸 것이다.

도 7은, BM16의 각 CRTH2 아미노산 치환체에 대한 반응성을 나타낸 것이다.

도 8은, 인간 호산구에 대한 항인간 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. ●은 Lym2 항체, ○은 BM16, ▲은 301108을 나타내고, 종축은 형광 강도를, 횡축은 각 항인간 CRTH2 모노클로날 항체의 항체 농도를 나타낸다.

도 9는, 인간 호염기구에 대한 chLym2의 반응성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 전부 칠한 부분이 아이소타입 컨트롤 항체의 반응성, 실선으로 둘러싸인 부분이 chLym2의 반응성을, 각각 나타내고, 종축은 세포수를, 횡축은 형광 강도를 나타낸다.

도 10은, 인간 CD4 양성 T세포에 대한 인간화 Lym2 항체 LVOHV1의 반응성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 전방 산란(Forward scatter; 이하, FSC라 기재함)-측방 산란(Side scatter; 이하, SSC라 기재함) 전개에 의해 림프구를 분획하고, 추가로 CD3 양성 또한 CD4 양성 세포로 분획한 세포군에 대한, 인간화 Lym2 항체 LVOHV1에 의한 형광 염색의 형광 강도 및 CD4 항체에 의한 형광 염색의 형광 강도를 각각 종축 및 횡

축에 나타낸다.

도 11의 (A) 및 도 11의 (B)는, 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 인간 호산구 및 인간 호염기구에 대한 세포 상해 활성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 상단은 인간 호산구, 하단은 인간 호염기구에 대한 세포 상해 활성을 나타낸다. 각각의 도면에 있어서, 종축에 컨트롤 비즈 1000개당 각 세포의 개수를, 횡축에 항체 농도를 나타낸다. ○은 인간화 Lym2 항체 LVOHV1, □은 hu19A2 v52, ▲은 hu8B1 v1, △은 ch3C12, ◆는 ch31A5, ×는 아이소타입 컨트롤 항체를 나타낸다.

도 12의 (A) 및 도 12의 (B)는, 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 인간 Th2 및 Th1 사이토카인 감소 활성을 해석한 결과를 나타낸다. 도 12의 (A)는 각 항체를 첨가했을 때의 Th2 사이토카인인 IL-5 또는 IL-13의 농도를 종축에 나타낸다. 또한 도 12의 (B)는 각 항체를 첨가했을 때의, Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 농도를 종축에 나타낸다.

도 13의 (A) 내지 도 13의 (C)는, CRTH2 리간드인 DKPGD2 존재 하에 있어서의 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성 변화를, 인간 CRTH2 발현 293EBNA 세포를 사용하여, 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 범례에 나타내는 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 농도가 0.3 μ g/mL, 1 μ g/mL 및 3 μ g/mL에 있어서의 결과를 각각 도 13의 (A), 도 13의 (B) 및 도 13의 (C)에 나타낸다. 각각의 도면에 있어서, 종축은 DKPGD2 비존재 하에서의 형광 강도를 100%로 했을 때의 형광 강도의 비율을 나타낸다.

도 14는, IgE 및 가교 항체 처리에 의해 자극한 인간 분화 유도 비만 세포에 대한 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 각각의 도면은, 도면 상에 나타내는 항체의 반응성을 나타내고 있으며, 종축에 세포수를, 횡축에 형광 강도를 나타낸다. 전부 칠한 부분이 아이소타입 컨트롤 항체의 반응성을, 실선으로 둘러싸인 부분이 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성을, 각각 나타낸다.

도 15는, 인간 분화 유도 Th1 세포에 대한 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 각각의 도면은, 도면 상에 나타내는 항체의 반응성을 나타내고 있고, 종축에 세포수를, 횡축에 형광 강도를 나타낸다. 전부 칠한 부분이 아이소타입 컨트롤 항체의 반응성을, 실선으로 둘러싸인 부분이 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성을, 각각 나타낸다.

도 16은, 인간 호산구의 형태 변화를 지표로 한 Lym2 항체의 안타고니스트 활성 평가의 결과를 나타낸다. 그래프 아래에 나타내는 각 항체의 존재 하 또는 비존재 하에서, 범례에 나타내는 농도의 DKPGD2를 처리했을 때, 플로우 사이토미터 해석에 있어서의 고FSC 영역에서 검출되는 호산구의 비율(%)을 종축에 나타낸다.

도 17은, 인간 호산구의 형태 변화를 지표로 한 Lym2 항체의 아고니스트 활성 평가의 결과를 나타낸다. 범례에 나타내는 농도의 Lym2 항체를 처리했을 때, 고FSC 영역에서 검출되는 호산구의 비율(%)을 종축에 나타낸다.

도 18의 (A) 내지 도 18의 (C)는 모두, 인간 호산구의 형태 변화를 지표로 한 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 아고니스트 활성, 안타고니스트 활성 및 리간드에 의한 활성화의 증강 활성의 평가 결과를 나타낸다. 도 18의 (A)는 인간화 항체 또는 키메라 항체, 도 18의 (B)는 래트 항체, 도 18의 (C)는 마우스 항체에 관한 결과를 각각 나타낸다. 각 도면에 있어서, 종축은, DKPGD2의 존재 또는 비존재 하에서, 범례에 나타내는 각 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체 또는 아이소타입 항체를 처리했을 때, 플로우 사이토미터 해석에 있어서의 고FSC 영역에서 검출되는 호산구의 비율(%)을 나타낸다.

도 19는, CRTH2 발현 세포의 막 확분에 대한 GTP γ S 또는 GDP 처리에 의한, CRTH2의 콘포메이션(conformation) 변화가 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성에 끼치는 영향을, ELISA법에 의해 해석한 결과를 나타낸다. 종축은 GTP γ S 및 GDP 미처리 시의 흡광도를 1이라 했을 때의 배수 변화(Fold change)를 나타낸다. 횡축은 GTP γ S 및 GDP 처리의 유무, 및 평가 항체(hu19A2 v52 및 인간화 Lym2 항체 LVOHV1)를 나타낸다.

도 20은, 아자미 그린 융합 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포 및 계잡이 원숭이 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포에 있어서의 아자미 그린의 발현을, 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다. 종축에 세포수를, 횡축에 아자미 그린의 형광 강도를 나타낸다. 전부 칠한 부분이 친세포인 CHO/DG44 세포에 있어서의 형광 강도를, 실선으로 둘러싸인 부분이 아자미 그린 융합 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포에 있어서의 형광 강도를, 점선으로 둘러싸인 부분이 아자미 그린 융합 계잡이 원숭이 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포에 있어서의 형광 강도를 각각 나타낸다.

도 21은, 아자미 그린 융합 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포 및 계잡이 원숭이 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포에 대한 인간화 Lym2 항체 LVOHV1 및 아이소타입 항체의 반응성을 플로우 사이토메트리로 해석한 결과를 나타낸다.

○은 아자미 그린 융합 인간 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포에 대한 LVOHV1의 반응성, ●은 아자미 그린 융합 게잡이 원숭이 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포에 대한 LVOHV1의 반응성, △은 아자미 그린 융합 인간 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포에 대한 아이소타입 항체의 반응성, ▲은 아자미 그린 융합 게잡이 원숭이 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포에 대한 아이소타입 항체의 반응성을 나타내고, 종축은 형광 강도를, 횡축은 각 항체의 농도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066]

본 발명에 있어서의 인간 CTRH2로서는, 서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 들 수 있다. 서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열이 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 CTRH2의 기능을 갖는 폴리펩티드, 및 서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열과 60% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 98% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 CTRH2의 기능을 갖는 폴리펩티드도, 본 발명에 있어서의 인간 CTRH2에 포함된다.

[0067]

서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 부위 특이적 변이 도입법[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)] 등을 사용하여, 예를 들어 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 부위 특이적 변이를 도입함으로써 얻을 수 있다. 결실, 치환 또는 부가되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1개 내지 수십개, 예를 들어 1 내지 20개, 보다 바람직하게는 1개 내지 수개, 예를 들어 1 내지 5개의 아미노산이다.

[0068]

인간 CTRH2를 코딩하는 유전자로서는, GenBank 액세션 번호 AB008535 또는 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열을 들 수 있다. GenBank 액세션 번호 AB008535 또는 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열에 있어서, 1 이상의 염기가 결실, 치환 또는 부가된 염기 서열을 포함하고, 또한 인간 CTRH2 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자, GenBank 액세션 번호 AB008535 또는 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열과 적어도 60% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열, 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열을 포함하며, 또한 인간 CTRH2 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자, 및 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열을 갖는 DNA와 엄격한 조건하에서 하이브리다이징하는 DNA를 포함하고, 또한 인간 CTRH2 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자도 본 발명의 CTRH2를 코딩하는 유전자에 포함된다.

[0069]

엄격한 조건하에서 하이브리다이징하는 DNA로서는, 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열을 갖는 DNA를 프로브에 사용한, 콜로니·하이브리다이제이션법, 플라크·하이브리다이제이션법, 서던 블롯·하이브리다이제이션법 또는 DNA 마이크로어레이법 등에 의해 얻어지는 하이브리다이징 가능한 DNA를 의미한다.

[0070]

구체적으로는, 하이브리다이징된 콜로니 또는 플라크 유래의 DNA, 또는 해당 서열을 갖는 PCR산물 또는 올리고 DNA를 고정화한 필터 또는 슬라이드 클래스를 사용하여, 0.7 내지 1.0mol/L의 염화나트륨 존재 하, 65°C에서 하이브리다이제이션[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)]을 행한 후, 0.1 내지 2배 농도의 SSC 용액(1배 농도의 SSC 용액의 조성은, 150mmol/L 염화나트륨, 15mmol/L 시트르산나트륨을 포함함)을 사용하여, 65°C 조건하에서 필터 또는 슬라이드 클래스를 세정함으로써 동정할 수 있는 DNA를 들 수 있다.

[0071]

하이브리다이징 가능한 DNA로서는, GenBank 액세션 번호 AB008535 또는 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열과 적어도 60% 이상의 상동성을 갖는 DNA, 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 DNA, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 DNA를 들 수 있다.

[0072]

진핵 생물의 단백질을 코딩하는 유전자의 염기 서열에는, 종종 유전자의 다형이 확인된다. 본 발명에 있어서 사용되는 유전자에, 이러한 다형에 의해 염기 서열에 소규모의 변이를 발생시킨 유전자도, 본 발명의 인간 CTRH2를 코딩하는 유전자에 포함된다.

[0073]

본 발명에 있어서의 상동성의 수치는, 특별히 명시한 경우를 제외하고, 당업자에게 공지된 상동성 검색 프로그

램을 사용하여 산출되는 수치이면 되지만, 염기 서열에 대해서는, BLAST[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]에 있어서 디폴트 파라미터를 사용하여 산출되는 수치 등, 아미노산 서열에 대해서는, BLAST2[Nucleic Acids Res., 25, 3389(1997), Genome Res., 7, 649(1997), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]에 있어서 디폴트 파라미터를 사용하여 산출되는 수치 등을 들 수 있다.

[0074] 디폴트 파라미터로서는, G(Cost to open gap)가 염기 서열의 경우에는 5, 아미노산 서열의 경우에는 11, -E(Cost to extend gap)가 염기 서열의 경우에는 2, 아미노산 서열의 경우에는 1, -q(Penalty for nucleotide mismatch)가 -3, -r(reward for nucleotide match)이 1, -e(expect value)가 10, -W(word size)가 염기 서열의 경우에는 11 잔기, 아미노산 서열의 경우에는 3 잔기, -y[Drop off(X) for blast extensions in bits]가 blastn인 경우에는 20, blastn 이외의 프로그램에서는 7, -X(X dropoff value for gapped alignment in bits)가 15 및 -Z(final X dropoff value for gapped alignment in bits)가 blastn인 경우에는 50, blastn 이외의 프로그램에서는 25이다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>).

[0075] 서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열의 부분 서열을 포함하는 폴리펩티드는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 제작할 수 있다. 예를 들어, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 DNA의 일부를 결실시키고, 이것을 포함하는 발현 벡터를 도입한 형질전환체를 배양함으로써 제작할 수 있다. 또한, 상기 방법으로 제작되는 폴리펩티드 또는 DNA에 기초하여, 상기와 동일한 방법에 의해, 서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열의 부분 서열에 있어서 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 또한, 서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열의 부분 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 서열 번호 2 또는 GenBank 액세션 번호 BAA74518로 표시되는 아미노산 서열의 부분 서열에 있어서 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc)법, t-부틸옥시카르보닐(tBoc)법 등의 화학 합성법에 의해 제조할 수도 있다.

[0076] 인간 CRTH2로서의 기능으로서는, 그의 리간드, 예를 들어 PGD2와의 결합에 의해, 인간 CRTH2 의존적인 세포 내 시그널이 전달되어, 인간 CRTH2를 발현하는 세포의 유주, 해당 세포로부터의 사이토카인 산생 항진, 또는 세포 직경, 세포 표면적 등의 변화를 수반하는 세포 형태 변화가 유도되는 것 등을 들 수 있다.

[0077] 인간 CRTH2의 세포 외 영역으로서는, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 1 내지 33번째의 아미노산 잔기를 포함하는 N 말단 영역, 95 내지 111번째의 아미노산 잔기를 포함하는 루프 1 영역, 169 내지 206번째의 아미노산 잔기를 포함하는 루프 2 영역 및 264 내지 285번째의 아미노산 잔기를 포함하는 루프 3 영역을 들 수 있다[J Immunol, 1999. 162(3): p.1278-86.]. N 말단 영역, 루프 1 영역, 루프 2 영역 및 루프 3 영역으로서, 구체적으로는, 각각, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열에 있어서의 1 내지 33번째, 95 내지 111번째, 169 내지 206번째 및 264 내지 285번째의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩티드 부분을 들 수 있다.

[0078] 본 발명에 있어서의 항체로서는, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 등 어느 항체여도 되지만, 바람직하게는 모노클로날 항체를 들 수 있다. 본 발명의 항체로서 구체적으로는, 하이브리도마에 의해 산생되는 항체, 또는 유전자 재조합 기술에 의해 산생되는 유전자 재조합 항체를 들 수 있다. 또한 유전자 재조합 항체로서는, 예를 들어 유전자 재조합 기술에 의해 제작되는 마우스 항체, 래트 항체, 인간형 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체 등을 들 수 있다.

[0079] 모노클로날 항체란, 단일 클론의 항체 산생 세포가 분비하는 항체이며, 단 하나의 에피토프(항원 결정기라고도 함)를 인식하고, 모노클로날 항체를 구성하는 아미노산 서열(1차 구조)이 균일하다.

[0080] 본 발명에 있어서 모노클로날 항체로서는, 하이브리도마에 의해 생산되는 항체, 또는 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환시킨 형질전환체에 의해 생산되는 항체 등, 유전자 재조합 기술에 의해 제작되는 유전자 재조합 항체를 들 수 있다.

[0081] 폴리클로날 항체란, 2개 이상의 모노클로날 항체가 포함되는 항체군이며, 그 항체군을 구성하는 복수의 항체에 의해 복수의 에피토프를 인식할 수 있다.

[0082] 본 발명에 있어서 에피토프로서는, 모노클로날 항체가 인식하고, 결합하는 단일 아미노산 서열 및 아미노산 서열을 포함하는 입체 구조 서열, 그리고 번역 후 수식에 의해 수식된 아미노산 서열 및 해당 아미노산 서열을 포함하는 입체 구조 등을 들 수 있다.

[0083] 번역 후 수식에 의해 수식된 아미노산 서열로서는, 당쇄가 OH 치환기를 갖는 트레오닌 및 세린에 결합한 O 결합

형 당쇄, NH_2 치환기를 갖는 글루타민 및 아스파라гин에 결합한 N 결합형 당쇄, 및 황산 분자가 OH 치환기를 갖는 트레오닌에 결합한 황산기 등이 결합된 아미노산 서열을 들 수 있다.

- [0084] 본 발명의 항체가 인식하는 인간 CRTH2의 에피토프는, 인간 CRTH2의 일부 도메인을 결실시킨 결손체, 인간 CRTH2의 일부의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환시킨 변이체, 다른 단백질 유래의 도메인과 치환시킨 변이체 및 인간 CRTH2의 부분 웨티드 단편 등을 사용한 항체의 결합 실험을 행함으로써 결정할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체가 결합하는 인간 CRTH2의 에피토프는, 단백질 분해효소에 의해 소화된 인간 CRTH2에 본 발명의 항체를 첨가하고, 기지의 질량 분석법을 사용한 에피토프 맵핑을 행함으로써 결정할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 항체가 인식하는 인간 CRTH2의 에피토프에 포함되는 아미노산 잔기로서는, 예를 들어 해당 아미노산 잔기의 치환에 의해, 본 발명의 항체 반응성이 소실되는 아미노산 잔기를 들 수 있다.
- [0086] 본 발명에 있어서의 항체의 반응성은, 예를 들어 야생형 인간 CRTH2 수용체 또는 아미노산 치환체를 발현하는 세포에 대한 항체의 결합량(야생형 및 치환체의 발현량에 따라서 보정됨)을 플로우 사이토메트리 등을 사용하여 측정함으로써 구할 수 있다. 또한, 항체의 결합량은, 고상 샌드위치법 등을 사용한 망사선 면역 측정, 또는 효소 면역 측정법(ELISA) 등을 사용한 인간 CRTH2에 대한 공지된 면역학적 검출법, 또는 Biacore 시스템(지이 헬스케어사) 등을 사용한 표면 플라스몬 공명 등의 방법으로 확인할 수 있다.
- [0087] 또한, 공지된 면역학적 검출법[Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽(1987)] 등을 조합하여 확인할 수도 있다.
- [0088] 본 발명에 있어서의 항체의 반응성의 소실이란, 야생형 인간 CRTH2를 발현하는 세포에 대한 항체의 반응성과 비교하여, 아미노산 치환체를 발현하는 세포에 대한 항체의 반응성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 저하되는 것을 나타낸다.
- [0089] 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프로서는, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 하나의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프를 들 수 있다.
- [0090] 또한, 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프로서, 구체적으로는, 하기 (a) 내지 (c)의 에피토프를 들 수 있다.
- [0091] (a) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신을 포함하는 에피토프,
- [0092] (b) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 194번째의 아스파라긴산을 포함하는 에피토프,
- [0093] (c) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산을 포함하는 에피토프.
- [0094] 또한, 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프로서는, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192 번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 하나의 아미노산 잔기를 포함하고, 또한 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신, 15번째의 글루탐산, 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신, 179번째의 아르기닌, 180번째의 이소류신, 181번째의 메티오닌, 183번째의 티로신, 184번째의 티로신, 185번째의 아스파라긴, 187번째의 류신, 188번째의 류신, 189번째의 류신, 195번째의 아르기닌, 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌으로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함하는 에피토프를 들 수 있다.
- [0095] 또한, 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프로서는 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 하나의 아미노산 잔기를 포함하고, 또한 하기 (a) 내지 (g) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 에피토프를 들 수 있다.
- [0096] (a) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신 및 15번째의 글루탐산,
- [0097] (b) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신 및 179 번째의 아르기닌,
- [0098] (c) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 180번째의 이소류신 및 181번째의 메티오닌,
- [0099] (d) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 183번째의 티로신, 184번째의 티로신 및 185번째의 아스파라긴,

- [0100] (e) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 187번째의 류신, 188번째의 류신 및 189번째의 류신,
- [0101] (f) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 195번째의 아르기닌, 및
- [0102] (g) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌.
- [0103] 또한, 본 발명의 항체가 결합하는 애피토프에 포함되는 다른 아미노산 잔기로서는, 본 발명의 항체가 CRTH2에 결합할 때, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열에 존재하고, 또한 실질적으로 인식되어 결합되어 있는 아미노산 잔기이면 어느 아미노산 잔기여도 되고, 구체적으로는 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신, 15번째의 글루탐산, 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신, 179번째의 아르기닌, 180번째의 이소류신, 181번째의 메티오닌, 183번째의 티로신, 184번째의 티로신, 185번째의 아스파라긴, 187번째의 류신, 188번째의 류신, 189번째의 류신, 192번째의 글리신, 194번째의 아스파라긴산, 195번째의 아르기닌, 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌으로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 잔기와 입체 구조상 근접하여 존재하고 있는 아미노산 잔기, 그리고 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신, 15번째의 글루탐산, 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신, 179번째의 아르기닌, 180번째의 이소류신, 181번째의 메티오닌, 183번째의 티로신, 184번째의 티로신, 185번째의 아스파라긴, 187번째의 류신, 188번째의 류신, 189번째의 류신, 192번째의 글리신, 194번째의 아스파라긴산, 195번째의 아르기닌, 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌으로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산으로부터 선택되는 아미노산 잔기와 1차 서열상 근접하고 있는 아미노산 잔기 등을 들 수 있다.
- [0104] 항체 분자는 면역글로불린(이하, Ig라 표기함)이라고도 칭해지고, 인간 항체는, 분자 구조의 차이에 따라서, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgM의 아이소타입으로 분류된다. 아미노산 서열의 상동성이 비교적 높은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 총칭하여 IgG라고도 한다.
- [0105] 항체 분자는 중쇄(Heavy chain, 이하 H쇄라 기재함) 및 경쇄(Light chain, 이하 L쇄라 기재함)라고 불리는 폴리펩티드로 구성된다. 또한, H쇄는 N 말단측으로부터 H쇄 가변 영역(VH라고도 표기됨), H쇄 정상 영역(CH라고도 표기됨), L쇄는 N 말단측으로부터 L쇄 가변 영역(VL이라고도 표기됨), L쇄 정상 영역(CL이라고도 표기됨)의 각 영역에 의해, 각각 구성된다.
- [0106] CH는 각 서브클래스별로, α , δ , ϵ , γ 및 μ 쇄가 각각 알려져 있다. CH는 또한, N 말단측으로부터 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인의 각 도메인에 의해 구성된다. 도메인이라면, 항체 분자의 각 폴리펩티드를 구성하는 기능적인 구조 단위를 한다. 또한, CH2 도메인과 CH3 도메인을 아울러 Fc 영역 또는 간단히 Fc라고 한다. CL은, C λ 쇄 및 C κ 쇄가 알려져 있다.
- [0107] 본 발명의 항체에 있어서의 CH로서는, Ig에 속하면 어떠한 것이어도 되지만, IgG 클래스의 것이 적합하고, 또한 IgG 클래스에 속하는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4와 같은 서브클래스 중 어느 것도 사용할 수 있다.
- [0108] 본 발명의 항체에 있어서의 CL의 아미노산 서열로서는, 인간 항체의 아미노산 서열 또는 비인간 동물 항체의 아미노산 서열 중 어느 것이어도 되지만, 인간 항체의 아미노산 서열의 C κ 또는 C λ 가 바람직하다.
- [0109] 본 발명의 항체는 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 한쪽의 아미노산 잔기를 인식하고, 결합하는 항체이다.
- [0110] 본 발명의 항체로서 구체적으로는, 하기 (a) 내지 (c)로부터 선택되는 항체를 들 수 있다.
- [0111] (a) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신을 인식하고 결합하는 항체,
- [0112] (b) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 194번째의 아스파라긴산을 인식하고 결합하는 항체,
- [0113] (c) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산의 양 쪽을 인식하고, 결합하는 항체.
- [0114] 또한, 본 발명의 항체로서는, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 하나의 아미노산 잔기를 인식하고, 또한 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신, 15번째의 글루탐산, 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신, 179번째의 아르기닌, 180번째의 이소류신, 181번째의 메티오닌, 183번째의 티로신, 184번째의 티로신, 185번째의 아스파라긴, 187번째의 류신, 188번째의 류신, 189번째의 류신, 192번째의 아르기닌, 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌으로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 인식하고,

결합하는 항체를 들 수 있다.

[0115] 또한, 본 발명의 항체로서는 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 하나의 아미노산 잔기를 인식하고, 또한 하기 (a) 내지 (g) 중 적어도 어느 하나를 인식하고 결합하는 항체를 들 수 있다.

[0116] (a) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 12번째의 프롤린, 14번째의 류신 및 15번째의 글루탐산,

[0117] (b) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 177번째의 아스파라긴산, 178번째의 글리신 및 179번째의 아르기닌,

[0118] (c) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 180번째의 이소류신 및 181번째의 메티오닌,

[0119] (d) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 183번째의 티로신, 184번째의 티로신 및 185번째의 아스파라긴,

[0120] (e) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 187번째의 류신, 188번째의 류신 및 189번째의 류신,

[0121] (f) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 195번째의 아르기닌 및

[0122] (g) 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 196번째의 아스파라긴산 및 198번째의 트레오닌.

[0123] 또한 본 발명의 항체로서, 구체적으로는, 하기 (a) 내지 (d)로부터 선택되는 항체를 들 수 있다.

[0124] (a) VH의 상보성 결정 영역(complementary determining region; CDR, 이하 CDR이라 약기함) 1 내지 3의 아미노산 서열이, 각각 서열 번호 20, 21 및 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 VL의 CDR 1 내지 3의 아미노산 서열이, 각각 서열 번호 23, 24 및 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,

[0125] (b) 상기 (a)에 기재된 항체와 경합하여 인간 CRTH2에 결합하는 항체,

[0126] (c) 상기 (a)에 기재된 항체가 결합하는 에피토프를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체, 및

[0127] (d) 상기 (a)에 기재된 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하는 항체.

[0128] 본 발명의 상기 (b)의 항체란, 상기 (a)의 항체와 인간 CRTH2와의 결합을 저해하는 항 인간 CRTH2 항체를 나타낸다. 또한, 본 발명의 상기 (c)의 항체란, 상기 (a)에 기재된 항체를 제1 항체, 그리고 제1 항체가 결합하는 에피토프를 제1 에피토프로 한 경우, 당해 제1 에피토프를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체를 나타낸다.

[0129] 또한 본 발명의 항체로서, 구체적으로는, 하기 (a) 내지 (c)로부터 선택되는 항체를 들 수 있다.

[0130] (a) 서열 번호 49로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 49로 표시되는 아미노산 서열 중 18번째의 류신을 메티오닌으로, 77번째의 아스파라긴을 세린으로, 93번째의 발린을 트레오닌으로, 및 117번째의 트레오닌을 발린으로 치환하는 개변으로부터 선택되는 적어도 하나의 개변이 도입된 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 33으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 33으로 표시되는 아미노산 서열 중 2번째의 이소류신을 발린으로, 4번째의 메티오닌을 류신으로, 15번째의 프롤린을 류신으로, 및 85번째의 알라닌을 프롤린으로 치환하는 개변으로부터 선택되는 적어도 하나의 개변이 도입된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

[0131] (b) 서열 번호 49, 51, 53, 55, 57 및 59로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VH, 및 서열 번호 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VL을 포함하는 항체, 및

[0132] (c) 서열 번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체.

[0133] 상기 (b)의 항체로서, 바람직하게는 이하의 (1) 내지 (3)으로부터 선택되는 항체를 들 수 있다.

[0134] (1) 서열 번호 49로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VL을 포함하는 항체,

[0135] (2) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH, 및 서열 번호 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VL을 포함하는 항체, 및

[0136] (3) 서열 번호 51, 53, 55 및 57로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 VH, 및 서열 번호 33으로

표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체.

- [0137] 상기 (b)의 항체로서, 특히 바람직하게는, 서열 번호 51로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체를 들 수 있다.
- [0138] 본 발명의 항체로서는, 인간 CRTH2의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 한쪽을 알라닌으로 치환한 아미노산 치환체에 대하여 반응성이 소실되는 항체를 들 수 있다.
- [0139] 또한, 본 발명의 항체에는, 인간 CRTH2의 리간드 존재 하에서, 인간 CRTH2에 대한 반응성이 저하되지 않는 항체가 포함된다. 인간 CRTH2의 리간드 존재 하에서 인간 CRTH2에 대한 반응성이 저하되지 않는 항체는, 인간 CRTH2에 대한 반응성이 저하되는 항체에 비해, 염증 국소와 같이 인간 CRTH2의 리간드가 고농도로 존재하는 조건하에서도, 높은 반응성을 나타낼 수 있다. 따라서, 인간 CRTH2 리간드 비의존적으로 인간 CRTH2에 특이적으로 결합할 수 있어, 약효를 발휘할 수 있다.
- [0140] 본 발명에 있어서, 인간 CRTH2의 리간드 존재 하에서 항체의 반응성이 저하된다는 것은, 인간 CRTH2의 리간드 비존재 하에서의 인간 CRTH2 발현 세포에 대한 항체의 반응성과 비교하여, 인간 CRTH2의 리간드 존재 하에서의 해당 반응성이 적어도 5% 이상 저하되는 것을 나타낸다. 보다 엄밀하게는 10% 이상 저하되는 것을 나타낸다.
- [0141] 인간 CRTH2의 리간드로서는, 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 것이면 모두 포함되지만, 바람직하게는 PGD2 또는 DKPGD2를 들 수 있다. 보다 바람직하게는 DKPGD2를 들 수 있다.
- [0142] 본 발명에 있어서, 활성화 상태 또는 불활성화 상태의 인간 CRTH2에 대한 반응성이 변화되지 않는다는 것은, 구아노신이인산(GDP) 또는 GDP 유사체 또는 구아노신삼인산(GTP) 또는 GTP 유사체 존재 하와 비존재 하에서, 항체의, 인간 CRTH2에 대한 반응성이 변화되지 않는 것을 말한다.
- [0143] GDP 유사체로서는, 예를 들어 구아노신 5'-0-(β -티오)이인산(GDP β S)을 들 수 있다. GTP 유사체로서는, 예를 들어 구아노신 5'-0-(γ -티오)삼인산(GTP γ S)을 들 수 있다.
- [0144] 본 발명의 항체에는, 중화 활성을 갖지 않는 항체, 아고니스트 활성을 갖지 않는 항체, 인간 CRTH2의 리간드에 의한 시그널을 증강시키지 않는 항체, 또는 활성화 상태 또는 불활성화 상태의 인간 CRTH2에 대한 반응성이 변화되지 않는 항체가 포함된다.
- [0145] 본 발명에 있어서, 항체의 중화 활성이란, 항체가 갖는 인간 CRTH2의 생물 활성을 저해하는 활성을 말한다. 예를 들어, 인간 CRTH2와 그의 리간드와의 결합을 저해하는 활성이나, 인간 CRTH2에 의한 시그널 전달을 저해하는 활성 등의 안타고니스트 활성을 말한다.
- [0146] 본 발명에 있어서, 아고니스트 활성이란, 인간 CRTH2의 리간드의 생물학적 활성을 모방하는 활성을 말하고, CRTH2의 활성화, 및 활성화에 수반하는 각종 반응을 유도하는 활성을 말한다. 본 발명에 있어서의 아고니스트 활성으로서, 구체적으로는 세포 유주 활성, 세포의 형태 변화 유도 활성 등을 들 수 있다.
- [0147] 본 발명에 있어서, 인간 CRTH2의 리간드에 의한 시그널이란, 인간 CRTH2의 리간드가 인간 CRTH2에 결합하여, 인간 CRTH2를 활성화시키는 것에 따른 시그널을 말한다.
- [0148] 인간 CRTH2의 리간드에 의한 시그널 및 아고니스트 활성은, 인간 CRTH2의 활성화에 수반하는 각종 반응을 해석함으로써 평가할 수 있다. 예를 들어, 인간 CRTH2 발현 세포의 형태 변화를 해석함으로써 평가할 수 있다.
- [0149] 인간 CRTH2 발현 세포로서는, 인간 CRTH2를 발현하고 있으면 어떤 세포여도 되지만, 예를 들어 호산구, 호염기구, Th2 세포, 2형 자연 램프구(ILC2), 비고전적 단핵구, Th2/Th17 세포 등을 들 수 있다.
- [0150] 본 발명에 있어서, 항체가 인간 CRTH2의 리간드에 의한 시그널을 증강시키지 않는다는 것은, 인간 CRTH2에 대하여, 인간 CRTH2의 리간드를 단독으로 작용시켰을 때와 비교하여, 인간 CRTH2의 리간드와 항체를 모두 작용시켰을 때, 인간 CRTH2의 활성화, 및 해당 활성화에 수반하는 각종 반응을 증강시키지 않는 것을 가리킨다.
- [0151] 본 발명의 항체에는, 인간 CRTH2 발현 세포에 대하여 세포 상해 활성을 나타내는 항체가 포함된다. 본 발명에 있어서의 세포 상해 활성으로서는, 보체 의존성 세포 상해 활성(이하, CDC 활성이라 표기함) 또는 항체 의존성 세포 상해 활성(이하, ADCC 활성이라 표기함) 등을 들 수 있다.
- [0152] 본 발명에 있어서의 CDC 활성으로서는, 세포 표면 상의 인간 CRTH2에 결합한 항체 분자가, Fc 부분을 통해 보체계의 Clq에 결합하고, 그 결과, C1로부터 C9의 각 보체 성분이 활성화되고, 최종적으로는 C5로부터 C9가 막 침습 복합체라 불리는 구멍 형성 중합체를 세포막 상에 형성하여 세포 용해를 야기하는 반응을 들 수 있다

[Immunol Today. 1999 Dec; 20(12): 576-82.]

- [0153] 본 발명에 있어서의 ADCC 활성으로서는, 세포 표면 상의 인간 CRTH2에 결합한 항체 분자가, Fc 부분을 통해, Fc 수용체를 발현한, 예를 들어 자연살해 세포(이하, NK 세포라 표기함) 등을 활성화하는 것에 의한, 폐포린이나 그랜자임 등의 세포 상해성 분자의 방출이나 탐식 작용의 항진 등에 의해 발생하는 세포 상해 반응을 들 수 있다[Chemical Immunology, 65, 88(1997); Immunol Today, 20, 576(1999)].
- [0154] 본 발명의 항체에는 비만 세포에 대한 세포 상해성을 갖지 않는 항체가 포함된다. 이러한 항체는, 비만 세포의 상해에 기인하는 염증성 매개체의 유리에 의한 부작용의 우려가 없다는 이점을 갖는다.
- [0155] 본 발명의 항체에는 항체의 Fc 영역에 N-글리코시드 결합 당쇄가 결합하고, 해당 N-글리코시드 결합 당쇄의 환원 말단의 N-아세틸글루코사민에 푸코오스가 결합되지 않은 항체가 포함된다. 항체의 Fc 영역에 N-글리코시드 결합 당쇄가 결합하고, 해당 N-글리코시드 결합 당쇄의 환원 말단의 N-아세틸글루코사민에 푸코오스가 결합되지 않은 항체로서는, 예를 들어 α1,6-푸코오스 전이효소 유전자가 결손된 CHO 세포(국제 공개 제2005/035586호, 국제 공개 제02/31140호)를 사용하여 제작되는 항체를 들 수 있다. 항체의 Fc 영역에 N-글리코시드 결합 당쇄가 결합하고, 해당 N-글리코시드 결합 당쇄의 환원 말단의 N-아세틸글루코사민에 푸코오스가 결합되지 않은 본 발명의 항체는, 높은 ADCC 활성을 갖는다.
- [0156] 본 발명의 항체에는 항체의 Fc 영역의 아미노산 잔기를, Fc 수용체와의 결합 활성이 높아지도록 개변한 항체가 포함된다. 항체의 Fc 영역의 아미노산 잔기를, Fc 수용체와의 결합 활성이 높아지도록 개변한 항체로서는, 예를 들어 미국 특허 제7317091호 명세서에 기재된 방법으로 제작된 항체 분자를 들 수 있다.
- [0157] 본 발명의 항체에는, 항체의 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드의 표면 전하나 조기 엔도솜 내에서의 pH에 있어서의 항원 결합 활성을 개변하여 혈중 반감기가 연장된 항체가 포함된다.
- [0158] 항체 분자의 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드의 표면 전하나 조기 엔도솜 내에서의 pH에 있어서의 항원 결합 활성을 개변하여 혈중 반감기가 연장된 항체로서는, 예를 들어 일본 특허 공개 제2013-165716호 공보, 일본 특허 공개 제2012-021004호 공보에 기재된 방법으로 제작된 항체를 들 수 있다.
- [0159] 본 발명의 항체에는, 인간형 키메라 항체(이하, 간단히 키메라 항체라고도 표기함), 인간형 CDR 이식 항체(이하 인간화 항체라고도 표기함) 및 인간 항체 등의 유전자 재조합 항체가 포함된다.
- [0160] 키메라 항체는, 인간 이외의 동물(비인간 동물)의 항체의 VH 및 VL과 인간 항체의 CH 및 CL을 포함하는 항체를 말한다. 비인간 동물로서는, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 등, 하이브리도마를 제작하는 것이 가능하면, 어떠한 것도 사용할 수 있다.
- [0161] 본 발명의 키메라 항체는, 인간 CRTH2에 특이적으로 반응하는 인간 이외의 동물의 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA를 취득하고, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 유전자를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 각각 삽입하여 키메라 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0162] 인간화 항체는, 인간 이외의 동물의 항체의 VH 및 VL의 CDR을 인간 항체의 VH 및 VL의 적절한 위치에 이식한 항체를 의미한다.
- [0163] 본 발명의 인간화 항체는, 인간 CRTH2에 특이적으로 반응하는 인간 이외의 동물의 항체의 VH 및 VL의 CDR을 임의의 인간 항체의 VH 및 VL의 프레임워크(이하, FR이라 표기함)에 이식한 가변 영역(이하 V 영역이라고도 표기함)을 코딩하는 cDNA를 구축하고, CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 각각 삽입하여 인간화 항체 발현 벡터를 구축하고, 해당 발현 벡터를 동물 세포에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0164] 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 서열로서는, 인간 항체 유래의 아미노산 서열이면, 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, Protein Data Bank 등의 데이터베이스에 등록되어 있는 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 서열, 또는 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 각 서브그룹의 공통 아미노산 서열(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) 등을 들 수 있다.
- [0165] 이들 아미노산 서열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 부가, 치환 또는 삽입되고, 또한 인간 CRTH2와 특이적으로 결합하고, 또한 예를 들어 세포 상해 활성 등의 생물 활성에 있어서 동등한 기능을 갖는 항체 또는 해당 항체 단편도 본 발명의 항체에 포함된다.
- [0166] 본 발명의 항체에는 원숭이 CRTH2에 결합하는 항체가 포함된다. 원숭이 CRTH2로서는, 예를 들어 마모셋 CRTH2, 게잡이 원숭이 CRTH2 및 붉은털 원숭이 CRTH2를 들 수 있다. 바람직하게는 게잡이 원숭이 CRTH2를 들 수 있다.

- [0167] 본 발명의 항체로서는, Fc와 항체 단편이 결합한 Fc 융합 단백질, Fc와 천연에 존재하는 리간드 또는 수용체가 결합한 Fc 융합 단백질(이뮤노어드헤신이라고도 함), 복수의 Fc 영역을 융합시킨 Fc 융합 단백질 등도 본 발명에 포함된다. 또한, 항체를 안정화시키기 위해 또는 혈중 반감기를 제어하기 위해 아미노산 잔기 치환을 행한 아미노산 잔기 개변을 포함하는 개변 Fc 영역 등도 본 발명의 항체에 사용할 수 있다.
- [0168] 본 발명에 있어서, 항체 단편이란, 서열 번호 2로 표시되는 인간 CRTH2의 아미노산 서열의 192번째의 글리신 및 194번째의 아스파라긴산 중 적어도 한쪽을 인식하고, 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하고, 또한 항원 결합 활성을 갖는 단편이다. 본 발명의 항체 단편으로서는, Fab, Fab', F(ab')₂, 단일 쇄(single chain) Fv(이하, scFv라 기재함), 디아바디, dsFv 및 복수의 CDR을 포함하는 펩티드 등을 들 수 있다.
- [0169] Fab는, IgG를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 얻어지는 단편 중(H쇄의 224번째의 아미노산 잔기에서 절단됨), H쇄의 N 말단측 약 절반과 L쇄 전체가 디술피드 결합으로 결합한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0170] 본 발명의 Fab는, 본 발명의 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체를 단백질 분해효소 파파인으로 처리하여 얻을 수 있다. 또는, 해당 항체의 Fab를 코딩하는 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하고, 해당 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0171] F(ab')₂는, IgG를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 얻어지는 단편 중(H쇄의 234번째의 아미노산 잔기에서 절단됨), Fab가 헌지 영역의 디술피드 결합을 통해 결합된 것보다 약간 큰, 분자량 약 10만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0172] 본 발명의 F(ab')₂는, 본 발명의 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체를 단백질 분해효소 펩신으로 처리하여 얻을 수 있다. 또는, 하기의 Fab'를 티오에테르 결합 또는 디술피드 결합시켜 제작할 수 있다.
- [0173] Fab'은, 상기 F(ab')₂의 헌지 영역의 디술피드 결합을 절단한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0174] 본 발명의 Fab'는, 본 발명의 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 F(ab')₂ 조성물을 환원제 디티오트레이톨 처리하여 얻을 수 있다. 또는, 해당 항체의 Fab' 단편을 코딩하는 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하고, 해당 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0175] scFv는, 1개의 VH와 1개의 VL을 4개의 Gly 및 1개의 Ser 잔기를 포함하는 링커(G4S)를 임의의 개수 연결시킨 링커 펩티드 등의 적당한 펩티드 링커(P)를 사용하여 연결한, VH-P-VL 내지는 VL-P-VH 폴리펩티드이며, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0176] 본 발명의 scFv는, 본 발명의 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA를 취득하고, scFv를 코딩하는 DNA를 구축하고, 해당 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하여, 해당 발현 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0177] 디아바디는, scFv가 이량체화한 항체 단편이며, 2가의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 2가의 항원 결합 활성은, 동일할 수도 있고, 한쪽을 다른 항원 결합 활성으로 할 수도 있다.
- [0178] 본 발명의 디아바디는, 본 발명의 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA를 취득하고, scFv를 코딩하는 DNA를 P의 아미노산 서열의 길이가 8 잔기 이하가 되도록 구축하고, 해당 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하여, 해당 발현 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0179] dsFv는, VH 및 VL 중 각각 1 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 폴리펩티드를 해당 시스테인 잔기 간의 디술피드 결합을 통해 결합시킨 것을 말한다. 시스테인 잔기로 치환하는 아미노산 잔기는 라이터(Reiter) 등에 의해 개시된 방법(Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)에 따라서, 항체의 입체 구조 예측에 기초하여 선택할 수 있다.
- [0180] 본 발명의 dsFv는, 본 발명의 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA를 취득하고, dsFv를 코딩하는 DNA를 구축하고, 해당 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하여, 해당 발현 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.

- [0181] CDR을 포함하는 펩티드는, VH 또는 VL의 CDR의 적어도 1 영역 이상을 포함하여 구성된다. 복수의 CDR을 포함하는 펩티드는, 직접 또는 적당한 펩티드 링커를 통해 결합시킬 수 있다.
- [0182] 본 발명의 CDR을 포함하는 펩티드는, 본 발명의 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체의 VH 및 VL의 CDR을 코딩하는 DNA를 구축하고, 해당 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하여, 해당 발현 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0183] 또한, CDR을 포함하는 펩티드는, Fmoc법(플루오레닐메틸옥시카르보닐법), tBoc법(t-부틸옥시카르보닐법) 등의 화학 합성법에 의해 제조할 수도 있다.
- [0184] 상술한 항체 또는 해당 항체 단편을 구성하는 아미노산 서열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가되고, 또한 상술한 항체 또는 해당 항체 단편과 동일한 활성을 갖는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편도, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편에 포함된다. 결실, 치환, 삽입 또는 부가되는 아미노산의 수는 1 개 이상이며 그 수는 특별히 한정되지 않지만, 몰레큘러·클로닝 제2판, 커런트·프로토콜즈·인·몰레큘러·바이올로지, 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) 등에 기재된 부위 특이적 변이 도입법 등의 주지된 기술에 의해, 결실, 치환 또는 부가할 수 있는 정도의 수이며, 예를 들어 1 내지 수십개, 바람직하게는 1 내지 20개, 보다 바람직하게는 1 내지 10개, 더욱 바람직하게는 1 내지 5개이다.
- [0185] 본 발명의 인간 CRTH2 또는 항체의 아미노산 서열에 있어서 1 이상의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 삽입 또는 부가되었다는 것은, 동일 서열 중의 임의의 또한 1 또는 복수의 아미노산 서열 중에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산 잔기의 결실, 치환, 삽입 또는 부가가 있음을 의미하고, 결실, 치환, 삽입 또는 부가가 동시에 발생해도 되고, 치환, 삽입 또는 부가되는 아미노산 잔기는 천연형과 비천연형을 가리지 않는다.
- [0186] 천연형 아미노산 잔기로서는, 예를 들어 L-알라닌, L-아스파라긴, L-아스파라진산, L-글루타민, L-글루탐산, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, L-발린, L-시스테인 등을 들 수 있다.
- [0187] 이하에, 서로 치환 가능한 아미노산 잔기의 바람직한 예를 나타낸다. 동일한 군에 포함되는 아미노산 잔기는 서로 치환 가능하다.
- [0188] A군: 류신, 이소류신, 노르류신, 발린, 노르발린, 알라닌, 2-아미노부탄산, 메티오닌, 0-메틸세린, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 시클로헥실알라닌
- [0189] B군: 아스파라긴산, 글루탐산, 이소아스파라긴산, 이소글루탐산, 2-아미노아디프산, 2-아미노수베르산
- [0190] C군: 아스파라긴, 글루타민
- [0191] D군: 리신, 아르기닌, 오르니틴, 2,4-디아미노부탄산, 2,3-디아미노프로피온산
- [0192] E군: 프롤린, 3-히드록시프롤린, 4-히드록시프롤린
- [0193] F군: 세린, 트레오닌, 호모세린
- [0194] G군: 페닐알라닌, 티로신
- [0195] 본 발명의 형질전환체로서는, 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 코딩하는 DNA를 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질전환체이며, 본 발명의 항체를 생산하는 형질전환체라면 어떠한 형질전환체라도 포함된다. 구체적인 예로서는, 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 코딩하는 DNA를 이하의 (a) 내지 (i) 등의 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질전환체를 좋은 예로서 들 수 있다.
- [0196] (a) 차이니즈 햄스터 난소 조직 유래 CHO 세포;
- [0197] (b) 래트 미엘로마 세포주 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 세포;
- [0198] (c) 마우스 미엘로마 세포주 NS0 세포;
- [0199] (d) 마우스 미엘로마 세포주 SP2/0-Ag14 세포;
- [0200] (e) 시리안 햄스터 신장 조직 유래 BHK 세포;

- [0201] (f) 항체를 생산하는 하이브리도마 세포;
- [0202] (g) 인간 백혈병 세포주 나말와(Namalwa) 세포;
- [0203] (h) 배성 줄기 세포;
- [0204] (i) 수정란 세포.
- [0205] 또한, 항체의 Fc 영역에 N-글리코시드 결합 당쇄가 결합하고, 해당 N-글리코시드 결합 당쇄의 환원 말단의 N-아세틸글루코사민에 푸코오스가 결합되지 않은 항체를 생산하는 본 발명의 형질전환체로서는, 인간 CRTH2에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 코딩하는 DNA를 국제 공개 제2005/035586호, 국제 공개 제02/31140호에 기재된 방법으로 제작된 당전이효소가 저하 또는 결손된 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질전환체를 좋은 예로서 들 수 있다.
- [0206] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편의 제조법으로서는, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 생산하는 형질전환체를 배양하는 제조 방법이면, 어떠한 항체 제조 방법이어도 포함되지만, 좋은 예로서, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 생산하는 형질전환체를 배양하고, 배양물 중에 항체 또는 해당 항체 단편을 생성 축적시키고, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 채취하고, 정제하는 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법을 들 수 있다.
- [0207] 상기 제조법에 의해 제조되는 항체 또는 해당 항체 단편도, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편으로서 들 수 있다.
- [0208] 본 발명의 조성물로서는, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 조성물이면 어느 조성물이어도 되고, 항체에 결합하는 당쇄가 단일 항체 분자를 포함하는 조성물, 또는 복수의 당쇄 구조를 갖는 항체 분자를 포함하는 조성물이어도 된다. 또한, 적당한 첨가제, 버퍼 등을 포함하는 조성물이어도 된다. 본 발명의 조성물로서는, 바람직하게는 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는 의약, 진단약 등을 들 수 있다.
- [0209] 본 발명의 의약 또는 진단약으로서는, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는 의약 또는 진단약이면 어떠한 의약 또는 진단약도 함유된다. 좋은 예로서, 인간 CRTH2 발현 세포에 관련된 질환의 의약 또는 진단약을 들 수 있다.
- [0210] 본 발명의 치료 방법으로서는, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 유효량 투여하는 치료 방법이면 어떠한 치료 방법도 포함되지만, 바람직하게는 인간 CRTH2 발현 세포에 관련된 질환의 치료 방법을 들 수 있다.
- [0211] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편의 용도로서는, 인간 CRTH2 발현 세포에 관련된 질환의 치료약을 제조하기 위한 본 발명 항체 또는 해당 항체 단편의 용도이면, 어떠한 항체 또는 해당 항체 단편의 용도도 포함된다. 또한, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편은 인간 CRTH2 발현 세포가 관계하는 장애 또는 질환의 치료 및 예방 중 적어도 한쪽에 사용할 수 있다.
- [0212] 인간 CRTH2 발현 세포가 관계하는 장애 또는 질환으로서는, 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환, 및 ILC2의 증다 및 기능 항진 중 적어도 한쪽을 수반하는 질환 등을 들 수 있다.
- [0213] 보다 구체적으로는, 예를 들어 알레르기성 또는 비알레르기성 비염 또는 부비동염, 만성 부비동염 또는 비염, 코 폴립, 코 폴립을 수반하는 만성 부비동염, 호산구성 부비동염, 급성 부비동염, 천식, 소아 천식, 알레르기성 기관지염, 폐포염, 농부의 질환(Farmer's disease), 과민성 기도, 감염, 예를 들어 세균 또는 바이러스 또는 연총 또는 진균 또는 원생 동물, 그 밖의 병원에 기인하는 알레르기성 결막염, 기관지염 또는 폐장염, 기관지 확장증, 성인 호흡 측박 증후군, 기관지 및 폐부종, 각종 기원, 예를 들어 독가스, 증기의 흡인, 흡입에 기인하는 기관지염 또는 폐장염 또는 간질성 폐장염, 심부전, X선, 방사선, 화학 요법에 기인하는 기관지염 또는 폐장염 또는 간질성 폐장염, 교원병, 예를 들어 에리테마토데스, 전신성 강피증에 관련되는 기관지염 또는 폐장염 또는 간질성 폐장염, 폐섬유증, 특발성 폐섬유증(IPF), 각종 기원의 간질성 폐질환 또는 간질성 폐장염, 예를 들어 석면 폐증, 규폐증, m. Boeck 또는 사르코이드증, 육아종증, 낭포성 섬유증 또는 뮤코비시도시스, 또는 a 1-항 트립신 결핍증, 호산구성 셀룰라이트(예를 들어, 웰(Well) 증후군), 호산구성 폐렴(예를 들어, 뢰플러(Loeffler) 증후군, 만성 호산구성 폐렴), 호산구성 근막염(예를 들어, 숀만(Shulman) 증후군), 호산구성 식도염, 호산구 증가 증후군, 지연형 과민, 비알레르기성 천식, 운동 유발성 기관지 수축; 만성 폐색성 폐질환

(COPD), 급성 기관지염, 만성 기관지염, 폐기종; 전신성 아나필락시 또는 과민성 반응, 약물 알레르기(예를 들어, 페니실린, 세팔로스포린에 대하여), 오염 트립토판의 섭취에 의한 호산구 증다 근육통 증후군, 곤충 자상 알레르기; 자기 면역 질환, 예를 들어 관절 류머티즘, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 전신성 에리테마토데스, 중증 근무력증, 면역성 혈소판 감소증(성인 ITP, 신생아 혈소판 감소증, 소아 ITP), 면역성 용혈성 빈혈(자기 면역 및 약물 유발), 에반스(Evans) 증후군(혈소판 및 적혈구 면역성 혈구 감소증), 신생아의 Rh 질환, 굿파스 튜어(Goodpasture) 증후군(항 GBM 질환), 셀리악병(Celiac), 자기 면역성 심근증, 청년 발병 당뇨병; 사구체 신염, 자기 면역성 갑상선염, 베체트병; 이식편 거부(예를 들어, 이식에 있어서), 예를 들어 동종 이식편 거부 또는 이식편대숙주병; 염증성 장질환, 예를 들어 크론병 및 궤양성 대장염; 척추 관절증; 강피증; 건선(T세포 매개 건선을 포함함) 및 염증성 피부병, 예를 들어 피부염, 습진, 아토피성 피부염, 알레르기성 접촉 피부염, 담마진(예를 들어, 만성 돌발성, 만성 자발성, 물리적 담마진), 수포성류천포창; 혈관염(예를 들어, 괴사성, 피부성, 육아종성 및 과민성 혈관염, 호산구성 다발 혈관염성 육아종증); 결절성 홍반; 호산구성 근염, 호산구성 근막염, 피부 또는 기관의 백혈구 침윤을 수반하는 암을 포함한 염증성 또는 알레르기성 질환 및 상태를 들 수 있다.

- [0214] 인간 CRTH2 발현 세포가 관계하는 장애 또는 질환으로서, 바람직하게는 천식, 소아 천식, 만성 폐색성 폐질환, 아토피성 피부염, 알레르기성 비염 및 급성 또는 만성 부비동염을 들 수 있다.
- [0215] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편, 또는 이들의 유도체를 함유하는 의약은, 유효 성분으로서의 해당 항체 또는 해당 항체 단편, 또는 이들의 유도체만을 포함하는 것이어도 되지만, 통상은 약리학적으로 허용되는 1 이상의 단체와 함께 혼합하고, 제제학의 기술 분야에 있어서 공지된 방법에 의해 제조한 의약 제제로서 제공된다.
- [0216] 투여 경로로서는, 예를 들어 경구 투여, 또는 구강 내, 기도 내, 직장 내, 피하, 근육 내, 정맥 내 또는 복강 내 등의 비경구 투여를 들 수 있다. 투여 형태로서는, 예를 들어 분무제, 캡슐제, 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 유제, 좌제, 주사제, 연고 또는 테이프제 등을 들 수 있다.
- [0217] 경구 투여에 적당한 제제로서는, 예를 들어 유제, 시럽제, 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등을 들 수 있다.
- [0218] 본 발명의 항체에는, 본 발명의 항체 또는 그의 항체 단편에 방사성 동위 원소, 저분자의 약제, 고분자의 약제, 단백질, 핵산 등을 화학적 또는 유전자 공학적으로 결합시킨 항체의 유도체를 포함한다.
- [0219] 항체의 유도체를 치료 방법, 예방 방법, 치료약 또는 치료약으로서 사용하는 경우에는, 본 발명의 항체 또는 그의 항체 단편에 결합하는 약제로서, 화학 요법제, 항체 의약, 면역 부활제, 고분자의 약제 등을 들 수 있다. 단백질로서는, 사이토카인, 중식 인자, 독소 단백질 등을 들 수 있다. 핵산으로서는, 디코이, 안티센스, siRNA, miRNA 등을 들 수 있다.
- [0220] 항체의 유도체를 검출 방법, 정량 방법, 검출용 시약 또는 정량용 시약으로서 사용하는 경우에는, 본 발명의 항체 또는 그의 항체 단편에 결합하는 약제로서, 통상의 면역학적 검출 또는 측정법에서 사용되는 표지체를 들 수 있다.
- [0221] 본 발명에 있어서의, 항체의 유도체는, 본 발명의 항체 또는 그의 항체 단편의 H쇄 또는 L쇄의 N 말단측 또는 C 말단측, 항체 또는 그의 항체 단편 중의 적당한 치환기 또는 측쇄, 나아가 항체 또는 해당 항체 단편 중의 당쇄 등에, 방사성 동위 원소, 저분자의 약제, 고분자의 약제, 단백질 등을 화학적 방법[항체 공학 입문, 치진 쇼칸(1994)에 기재된 방법 등]에 의해 결합시킴으로써 제조할 수 있다.
- [0222] 또한, 본 발명에 있어서의, 항체의 유도체는, 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 DNA와, 결합시키고자 하는 단백질을 코딩하는 DNA를 연결시켜 발현 벡터에 삽입하고, 해당 발현 벡터를 적당한 숙주 세포에 도입하여, 발현시키는 유전자 공학적 방법으로부터 제조할 수 있다.
- [0223] 방사성 동위 원소로서는, 예를 들어 ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu 또는 ^{211}At 등을 들 수 있다. 방사성 동위 원소는, 클로라민 T법 등에 의해 항체에 직접 결합시킬 수 있다. 또한, 방사성 동위 원소를 퀄레이트하는 물질을 항체에 결합시켜도 된다. 퀄레이트제로서는, 예를 들어 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(MX-DTPA) 등을 들 수 있다.
- [0224] 저분자의 약제로서는, 예를 들어 아크리디늄에스테르 또는 로핀 등의 발광 물질, 또는 플루오레세인-이소티오시아네이트(FITC) 또는 테트라메틸로다민이소티오시아네이트(RITC) 등의 형광 물질 등을 들 수 있다.
- [0225] 저분자의 약제와 항체를 결합시키는 방법으로서는, 예를 들어, 글루타르알데히드를 통해 약제와 항체의 아미노

기 간을 결합시키는 방법, 또는 수용성 카르보디이미드를 통해 약제의 아미노기와 항체의 카르복실기를 결합시키는 방법 등을 들 수 있다.

[0226] 고분자의 약제로서는, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(이하, PEG라 표기함), 알부민, 텍스트란, 폴리옥시에틸렌, 스티렌말레산 공중합체, 폴리비닐파롤리돈, 피란 공중합체, 또는 히드록시프로필메타크릴아미드 등을 들 수 있다.

[0227] 면역학적 검출 또는 측정 방법이란, 표지를 실시한 항원 또는 항체를 사용하여, 항체량 또는 항원량을 검출 또는 측정하는 방법이다. 면역학적 검출 또는 측정 방법으로서는, 방사성 물질 표지 면역 항체법(RIA), 효소 면역 측정법(EIA 또는 ELISA), 형광 면역 측정법(FIA), 발광 면역 측정법(luminescent immunoassay), 웨스턴 블로트법 또는 물리 화학적 방법 등을 들 수 있다.

[0228] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여, 상기 방법에 따라서 인간 CRTH2가 발현한 세포를 검출 또는 측정함으로써, 인간 CRTH2가 관련된 질환을 진단할 수 있다.

[0229] 본 발명에 있어서 인간 CRTH2를 검출 또는 측정하는 대상이 되는 생체 시료로서는, 조직 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 췌액, 오줌, 분변, 조직액, 폐포 세정액 또는 배양액 등, 세포 밖에 분비된 인간 CRTH2 또는 그의 일부를 포함하는 웨티드 단편, 또는 인간 CRTH2를 발현하고 있는 세포를 포함할 가능성이 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다.

[0230] 본 발명의 항체 또는 그의 항체 단편 또는 이들의 유도체를 함유하는 진단약은, 목적으로 하는 진단법에 따라서, 항원 항체 반응을 행하기 위한 시약, 해당 반응의 검출용 시약을 포함해도 된다. 항원 항체 반응을 행하기 위한 시약으로서는, 완충제, 염 등을 들 수 있다. 검출용 시약으로서는, 해당 항체 또는 그의 항체 단편 또는 이들의 유도체를 인식하는 표지된 2차 항체, 또는 표지에 대응한 기질 등의 통상의 면역학적 검출 또는 측정법에 사용되는 시약을 들 수 있다.

[0231] 이하에, 본 발명의 항체의 제조 방법, 질환의 치료 방법 및 질환의 진단 방법에 대해서, 구체적으로 설명한다.

1. 항체의 제조 방법

(1) 항원의 조제

[0234] 항원이 되는 인간 CRTH2 또는 인간 CRTH2를 발현시킨 세포는, 인간 CRTH2 전체 길이 또는 그의 부분 길이를 코딩하는 cDNA를 포함하는 발현 벡터를, 대장균, 효모, 곤충 세포 또는 동물 세포 등에 도입함으로써 얻을 수 있다.

[0235] 또한, 인간 CRTH2를 다량으로 발현하고 있는 각종 인간 배양 세포, 인간 조직 등으로부터 인간 CRTH2를 정제함으로써도 얻을 수 있다. 또한, 해당 배양 세포 또는 해당 조직 등을 그대로 항원으로서 사용할 수도 있다. 또한, Fmoc법 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해 인간 CRTH2의 부분 서열을 갖는 합성 웨티드를 조제하여, 항원에 사용할 수도 있다.

[0236] 인간 CRTH2 또는 인간 CRTH2의 부분 서열을 갖는 합성 웨티드에는, C 말단 또는 N 말단에 FLAG 또는 His 등의 공지된 태그가 부가되어 있어도 된다.

[0237] 본 발명에서 사용되는 인간 CRTH2는, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989) 또는 Current Protocols in molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997) 등에 기재된 방법 등을 사용하고, 예를 들어 이하의 방법에 의해, 해당 인간 CRTH2를 코딩하는 DNA를 숙주 세포 중에서 발현시켜 제조할 수 있다.

[0238] 먼저, 인간 CRTH2를 코딩하는 부분을 포함하는 완전 길이 cDNA를 적당한 발현 벡터의 프로모터 하류에 삽입함으로써, 재조합 벡터를 제작한다. 상기 완전 길이 cDNA 대신에, 완전 길이 cDNA를 바탕으로 하여 조제된, 폴리웨티드를 코딩하는 부분을 포함하는 적당한 길이의 DNA 단편을 사용해도 된다. 이어서, 얻어지는 해당 재조합 벡터를, 해당 발현 벡터에 적합한 숙주 세포에 도입함으로써, 폴리웨티드를 생산하는 형질전환체를 얻을 수 있다.

[0239] 발현 벡터로서는, 사용하는 숙주 세포에 있어서의 자율 복제 또는 염색체 중으로의 도입이 가능하고, 폴리웨티드를 코딩하는 DNA를 전사할 수 있는 위치에, 적당한 프로모터를 함유하고 있는 것이면 모두 사용할 수 있다.

[0240] 숙주 세포로서는, 대장균 등의 에스케리키아속 등에 속하는 미생물, 효모, 곤충 세포 또는 동물 세포 등, 목적으로 하는 유전자를 발현할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있다.

- [0241] 대장균 등의 원핵 생물을 숙주 세포로서 사용하는 경우, 재조합 벡터는, 원핵 생물 중에서 자율 복제가 가능함과 동시에, 프로모터, 리보솜 결합 서열, 인간 CRTH2를 코딩하는 부분을 포함하는 DNA, 및 전사 종결 서열을 포함하는 벡터인 것이 바람직하다.
- [0242] 또한, 해당 재조합 벡터에는, 전사 종결 서열은 반드시 필요하지는 않지만, 구조 유전자 바로 아래에 전사 종결 서열을 배치하는 것이 바람직하다. 또한, 해당 재조합 벡터에는, 프로모터를 제어하는 유전자를 포함하고 있어도 된다.
- [0243] 해당 재조합 벡터로서는, 리보솜 결합 서열인 샤인·달가노 서열(SD 서열이라고도 함)과 개시 코돈과의 사이를 적당한 거리(예를 들어 6 내지 18 염기)로 조절한 플라스미드를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0244] 또한, 해당 인간 CRTH2를 코딩하는 DNA의 염기 서열로서는, 숙주 내에서의 발현에 최적인 코돈이 되도록 염기를 치환할 수 있고, 이에 의해 목적으로 하는 인간 CRTH2의 생산율을 향상시킬 수 있다
- [0245] 발현 벡터로서는, 사용하는 숙주 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있는데, 예를 들어, pBTrp2, pBTac1, pBTac2(이상, 로슈·다이에그노스틱스사), pKK233-2(파마시아사), pSE280(인비트로젠사), pGEMEX-1(프로메가사), pQE-8(퀴아젠사), pKYP10(일본 특허 공개 소58-110600호 공보), 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(-)(스트라타진사), pTrs30[대장균 JM109/pTrs30(FERM BP-5407)으로부터 조제], pTrs32[대장균 JM109/pTrs32(FERM BP-5408)로부터 조제], pGHA2[대장균 IGHA2(FERM BP-400)로부터 조제, 일본 특허 공개 소60-221091호 공보], pGKA2[대장균 IGKA2(FERM BP6798)으로부터 조제, 일본 특허 공개 소60-221091호 공보], pTerm2(미국 특허 제4686191호 명세서, 미국 특허 제4939094호 명세서, 미국 특허 제5160735호 명세서), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392(1990)], pGEX(파마시아사), pET 시스템(노바젠사), 또는 pME18SFL3 등을 들 수 있다.
- [0246] 프로모터로서는, 사용하는 숙주 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 어떠한 것이어도 된다. 예를 들어, trp 프로모터(Ptrp), lac 프로모터, PL 프로모터, PR 프로모터 또는 T7 프로모터 등의, 대장균 또는 파지 등에서 유래되는 프로모터를 들 수 있다. 또한, Ptrp를 2개 직렬시킨 텐덤 프로모터, tac 프로모터, lacT7 프로모터 또는 lacI 프로모터 등의 인위적으로 설계 개변된 프로모터 등도 사용할 수 있다.
- [0247] 숙주 세포로서는, 예를 들어 대장균 XL-1Blue, 대장균 XL2-Blue, 대장균 DH1, 대장균 MC1000, 대장균 KY3276, 대장균 W1485, 대장균 JM109, 대장균 HB101, 대장균 No.49, 대장균 W3110, 대장균 NY49 또는 대장균 DH5 α 등을 들 수 있다.
- [0248] 숙주 세포에 대한 재조합 벡터의 도입 방법으로서는, 사용하는 숙주 세포에 DNA를 도입하는 방법이면 모두 사용할 수 있고, 예를 들어, 칼슘 이온을 사용하는 방법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972); Gene, 17, 107(1982); Molecular & General Genetics, 168, 111(1979)]을 들 수 있다.
- [0249] 동물 세포를 숙주로서 사용하는 경우, 발현 벡터로서는, 동물 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있고, 예를 들어, pcDNA I, pcDM8(후나코시사), pAGE107[일본 특허 공개 평03-22979호 공보; Cytotechnology, 3, 133(1990)], pAS3-3(일본 특허 공개 평02-227075호 공보), pcDM8[Nature, 329, 840(1987)], pcDNA I/Amp(인비트로젠사), pcDNA3.1(인비트로젠사), pREP4(인비트로젠사), pAGE103[J. Biochemistry, 101, 1307(1987)], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호), N5KG1val(미국 특허 제6001358호 명세서), INPEP4(Biogen-IDEA사) 및 트랜스포존 벡터(국제 공개 제2010/143698호) 등을 들 수 있다.
- [0250] 프로모터로서는, 동물 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있고, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV)의 즉초기(immediate early; IE) 유전자의 프로모터, SV40의 초기 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 히트 쇼크 프로모터, SR α 프로모터, 또는 몰로니 마우스 백혈병 바이러스의 프로모터 또는 인핸서를 들 수 있다. 또한, 인간 CMV의 IE 유전자의 인핸서를 프로모터와 함께 사용해도 된다.
- [0251] 숙주 세포로서는, 예를 들어 인간 백혈병 세포 나말와(Namalwa) 세포, 원숭이 세포 COS 세포, 차이니즈 햅스터 난소 세포 CHO 세포[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 번호: CCL-61), DUkXB11(ATCC 번호: CCL-9096), Pro-5(ATCC 번호: CCL-1781), CHO-S(Life Technologies, Cat#11619), Pro-3, 래트 미엘로마 세포YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20(또는 YB2/0이라 고도 함), 마우스 미엘로마 세포 NS0, 마우스 미엘로마 세포 SP2/0-Ag14, 시리안 햄스터 세포 BHK 또는 HBT5637(일본 특허 공개 소63-000299호 공보) 등을 들 수 있다.

[0252] 숙주 세포에 대한 재조합 벡터의 도입 방법으로서는, 동물 세포에 DNA를 도입하는 방법이면 모두 사용할 수 있다. 예를 들어, 일렉트로포레이션법[Cytotechnology, 3, 133(1990)], 인산칼슘법(일본 특허 공개 평02-227075 호 공보), 또는 리포펙션법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 등을 들 수 있다.

[0253] 이상과 같이 하여 얻어지는 인간 CRTH2를 코딩하는 DNA를 도입한 재조합 벡터를 보유하는 미생물, 또는 동물 세포 등 유래의 형질전환체를 배지에 배양하고, 배양물 중에 해당 인간 CRTH2를 생성 축적시키고, 해당 배양물로부터 채취함으로써, 인간 CRTH2를 조제할 수 있다. 해당 형질전환체를 배지에 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법에 따라서 행할 수 있다.

[0254] 진핵 생물 유래의 세포에서 발현시킨 경우에는, 당 또는 당쇄가 부가된 인간 CRTH2를 얻을 수 있다.

[0255] 유도성 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질전환시킨 미생물을 배양할 때에는, 필요에 따라서 인듀서를 배지에 첨가해도 된다. 예를 들어, lac 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질전환시킨 미생물을 배양하는 경우에는 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드 등을, trp 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질전환한 미생물을 배양하는 경우에는 인돌아크릴산 등을 배지에 첨가해도 된다.

[0256] 동물 세포를 숙주로 하여 얻어지는 형질전환체를 배양하는 배지로서는, 예를 들어 일반적으로 사용되고 있는 RPMI1640 배지[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)], 이글(Eagle)의 MEM 배지[Science, 122, 501(1952)], 둘베코 개변 MEM 배지[Virology, 8, 396(1959)], 199 배지[Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1(1950)], 이스코브 개변 둘베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM) 배지, 또는 이들 배지에 소태아혈청(FBS) 등을 첨가한 배지 등을 들 수 있다. 배양은, 통상 pH 6 내지 8, 30 내지 40°C, 5% CO₂ 존재 하 등의 조건하에서 1 내지 7일간 행한다. 또한, 배양 중 필요에 따라서, 카나마이신 또는 페니실린 등의 항생 물질을 배지에 첨가해도 된다.

[0257] 인간 CRTH2를 코딩하는 유전자의 발현 방법으로서는, 직접 발현 이외에도, 분비 생산 또는 융합 단백질 발현 등의 방법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]을 사용할 수 있다.

[0258] 인간 CRTH2의 생산 방법으로서는, 숙주 세포 내에 생산시키는 방법, 숙주 세포 밖으로 분비시키는 방법, 또는 숙주 세포 외막 상에 생산시키는 방법이 있고, 사용하는 숙주 세포, 또는 생산시키는 인간 CRTH2의 구조를 바꿈으로써, 적절한 방법을 선택할 수 있다.

[0259] 인간 CRTH2가 숙주 세포 내 또는 숙주 세포 외막 상에서 생산되는 경우, 폴슨 등의 방법[J. Biol. Chem., 264, 17619(1989)], 로우 등의 방법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227(1989); Genes Develop., 4, 1288(1990)], 일본 특허 공개 평05-336963호 공보, 또는 국제 공개 제94/23021호 등에 기재된 방법을 사용함으로써, 인간 CRTH2를 숙주 세포 밖으로 적극적으로 분비시킬 수 있다.

[0260] 또한, 디히드로엽산 환원효소 유전자 등을 사용한 유전자 증폭계(일본 특허 공개 평02-227075호 공보)를 이용하여 인간 CRTH2의 생산량을 상승시킬 수도 있다.

[0261] 얻어지는 인간 CRTH2는, 예를 들어 이하와 같이 하여 단리, 정제할 수 있다. 인간 CRTH2가 세포 내에서 용해 상태로 발현한 경우에는, 배양 종료 후에 세포를 원심 분리에 의해 회수하고, 수계 완충액에 혼탁 후, 초음파 파쇄기, 프렌치 프레스, 맨톤-가울린(Manton-Gaulin) 호모게나이저, 또는 다이노 밀 등을 사용하여 세포를 파쇄하여, 무 세포 추출액을 얻는다.

[0262] 상기 무세포 추출액을 원심 분리함으로써 얻어지는 상청으로부터, 통상의 단백질 단리 정제법, 즉, 용매 추출법, 황산암모늄 등에 의한 염석법, 탈염법, 유기 용매에 의한 침전법, 디에틸아미노에틸(DEAE)-세파로스, DIAION HPA-75(미쓰비시 가가꾸사) 등의 레진을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피법, S-Sepharose FF(파마시아사) 등의 레진을 사용한 양이온 교환 크로마토그래피법, 부틸세파로스, 페닐세파로스 등의 레진을 사용한 소수성 크로마토그래피법, 분자체를 사용한 젤 여과법, 친화성 크로마토그래피법, 크로마토포카싱법, 또는 등전점 전기 영동 등의 전기 영동법 등의 방법을 단독 또는 조합 사용하여, 정제 표품을 얻을 수 있다.

- [0263] 인간 CRTH2가 세포 내에서 불용체를 형성하여 발현한 경우에는, 상기와 동일하게 세포를 회수 후 파쇄하고, 원심 분리를 행함으로써, 침전 획분으로서 해당 인간 CRTH2의 불용체를 회수한다. 회수한 해당 인간 CRTH2의 불용체를 단백질 변성제로 가용화한다. 해당 가용화액을 희석 또는 투석함으로써, 해당 인간 CRTH2를 정상적인 입체 구조로 되돌린 후, 상기와 동일한 단리 정제법에 의해 폴리펩티드의 정제 표품을 얻을 수 있다.
- [0264] 인간 CRTH2 또는 그의 당 수식체 등의 유도체가 세포 밖으로 분비된 경우에는, 배양 상청에 있어서 해당 인간 CRTH2 또는 그의 당 수식체 등의 유도체를 회수할 수 있다. 해당 배양물을 상기와 동일하게 원심 분리 등의 방법에 의해 처리함으로써 가용성 획분을 취득하고, 해당 가용성 획분으로부터, 상기와 동일한 단리 정제법을 사용함으로써, 정제 표품을 얻을 수 있다.
- [0265] 또한, 본 발명에 있어서 사용되는 인간 CRTH2는, Fmoc법, 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해서도 제조할 수 있다. 또한, 어드밴스트 켐텍사, 퍼킨 · 엘머사, 파마시아사, 프로테인테크놀로지 인스트루먼트사, 신서셀-베가 (Synthecell-Vega)사, 퍼셉티브사 또는 시마즈 세이사쿠쇼사 등의 펩티드 합성기를 이용하여 화학 합성할 수도 있다.
- [0266] (2) 동물의 면역과 융합용 항체 산생 세포의 조제
- [0267] 3 내지 20주령의 마우스, 래트 또는 햄스터 등의 동물에, (1)에서 얻어지는 항원을 면역시켜, 그 동물의 비장, 림프절, 말초혈 중의 항체 산생 세포를 채취한다. 또한, 면역원성이 낮고 상기 동물에서 충분한 항체값의 상승이 확인되지 않은 경우에는, 인간 CRTH2 녹아웃 마우스를 피면역 동물로서 사용할 수도 있다.
- [0268] 면역은, 동물의 피하, 미근부, 정맥 내 또는 복강 내에, 예를 들어 프로인트의 완전 아주반트, 또는 수산화알루미늄 젤과 백일해균 백신 등의 적당한 아주반트와 함께 항원을 투여함으로써 행한다. 항원이 부분 펩티드인 경우에는, BSA(소혈청 알부민), 또는 KLH(키홀 림펫 혜모시아닌(Keyhole Limpet Hemocyanin)) 등의 캐리어 단백질과 컨쥬게이트를 제작하고, 이것을 면역원으로서 사용한다.
- [0269] 항원의 투여는, 1회째의 투여 후, 1 내지 2주일 간격으로 1 내지 10회 행한다. 각 투여 후 3 내지 7일째에 안저 정맥총 또는 미정맥으로부터 채혈하고, 그 혈청의 항체값을 효소 면역 측정법[Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 등을 사용하여 측정한다. 면역에 사용한 항원에 대하여 그 혈청이 충분한 항체값을 나타낸 동물을 융합용 항체 산생 세포의 공급원으로 한다.
- [0270] 항원의 최종 투여 후 3 내지 7일째에, 면역시킨 동물로부터 비장 등의 항체 산생 세포를 포함하는 조직을 적출하고, 항체 산생 세포를 채취한다. 비장 세포를 사용하는 경우에는, 비장을 세단(細斷)하여 푼 후, 원심 분리하고, 또한 적혈구를 제거하여 융합용 항체 산생 세포를 취득한다.
- [0271] (3) 골수종 세포의 조제
- [0272] 골수종 세포로서는, 마우스로부터 얻어지는 주화 세포를 사용하여, 예를 들어 8-아자구아닌 내성 마우스(BALB/c 유래) 골수종 세포주 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)], 또는 P3-X63-Ag8(X63)[Nature, 256, 495(1975)] 등을 사용한다.
- [0273] 해당 골수종 세포는, 정상 배지[글루타민, 2-머캅토에탄올, 젠타마이신, FBS 및 8-아자구아닌을 첨가한 RPMI1640 배지]에서 계대하고, 세포 융합의 3 내지 4일 전에 정상 배지에서 계대하여, 융합 당일 2×10^7 개 이상의 세포수를 확보한다.
- [0274] (4) 세포 융합과 모노클로날 항체 산생 하이브리도마의 조제
- [0275] (2)에서 얻어지는 융합용 항체 산생 세포와 (3)에서 얻어지는 골수종 세포를 최소 필수 배지(Minimum Essential Medium; MEM) 배지 또는 PBS(인산이나트륨 1.83g, 인산일칼륨 0.21g, 식염 7.65g, 증류수 1리터, pH 7.2)로 잘 세정하고, 세포수가, 융합용 항체 산생 세포:골수종 세포=5 내지 10:1이 되도록 혼합하고, 원심 분리한 후, 상청을 제거한다.
- [0276] 침전된 세포군을 잘 푼 후, 폴리에틸렌글리콜-1000(PEG-1000), MEM 배지 및 디메틸су포시드의 혼합액을 37°C에서, 교반하면서 첨가한다. 또한 1 내지 2분간마다 MEM 배지 1 내지 2mL를 수회 첨가한 후, MEM 배지를 첨가하여 전량이 50mL가 되도록 한다. 원심 분리 후, 상청을 제거한다.

- [0277] 침전된 세포군을 완만하게 푼 후, 융합용 항체 산생 세포에 HAT 배지[히포크산틴, 티미딘 및 아미노프테린을 첨가한 정상 배지] 중에 완만하게 세포를 혼탁시킨다. 이 혼탁액을 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 중, 7 내지 14일간 배양한다.
- [0278] 배양 후, 배양 상청의 일부를 발취하고, 후술하는 인간 CRTH2 발현 세포에 대한 반응성 해석 등의 하이브리도마의 선택 방법에 의해, 인간 CRTH2를 포함하는 항원에 반응하고, 인간 CRTH2를 포함하지 않은 항원에 반응하지 않는 세포군을 선택한다. 이어서, 한계 희석법에 의해 클로닝을 2회 반복하고[1회째는 HT 배지(HAT 배지로부터 아미노프테린을 제거한 배지), 2회째는 정상 배지를 사용함], 안정하며 강한 항체값이 확인되는 것을 모노클로날 항체 산생 하이브리도마로서 선택한다.
- [0279] (5) 정제 모노클로날 항체의 조제
- [0280] 프리스탄 처리[2,6,10,14-테트라메틸펜타데칸(Pristane) 0.5mL를 복강 내 투여하여, 2주일 사육함]한 8 내지 10주령의 마우스 또는 누드 마우스에, (4)에서 얻어지는 모노클로날 항체 산생 하이브리도마를 복강 내에 주사한다. 10 내지 21일 동안 하이브리도마는 복수암화된다. 이 마우스로부터 복수를 채취하고, 원심 분리하여 고형분을 제거 후, 40 내지 50% 황산암모늄으로 염석시키고, 카프릴산 침전법, DEAE-세파로스 칼럼, 단백질 A-칼럼 또는 젤 여과 칼럼에 의한 정제를 행하여, IgG 또는 IgM 획분을 모아, 정제 모노클로날 항체로 한다.
- [0281] 또한, (4)에서 얻어지는 모노클로날 항체 산생 하이브리도마를, 10% FBS 첨가를 첨가한 RPMI1640 배지 등에서 배양한 후, 원심 분리에 의해 상청을 제거하고, 하이브리도마(Hybridoma)-SFM 배지에 혼탁시켜, 3 내지 7일간 배양한다. 얻어지는 세포 혼탁액을 원심 분리하고, 얻어지는 상청으로부터 단백질 A-칼럼 또는 단백질 G-칼럼에 의한 정제를 행하여, IgG 획분을 모아, 정제 모노클로날 항체를 얻을 수도 있다. 또한, 하이브리도마-SFM 배지에는 5% 다이고 GF21을 첨가할 수도 있다.
- [0282] 항체의 서브클래스의 결정은, 서브클래스 타이핑 키트를 사용하여 효소 면역 측정법에 의해 행한다. 단백량의 정량은, 로리법 또는 280nm에서의 흡광도로부터 산출한다.
- [0283] (6) 모노클로날 항체의 선택
- [0284] 모노클로날 항체의 선택은, 이하에 나타내는 대로, 인간 CRTH2를 발현하는 세포에 대한 반응성을 플로우 사이토메트리로 해석함으로써 행한다.
- [0285] 인간 CRTH2를 발현하는 세포로서는, 예를 들어 (1)에서 얻어지는 인간 CRTH2를 코딩하는 cDNA를 포함하는 발현벡터를 동물 세포 등에 도입하여 얻어지는 유전자 도입 세포나, 인간의 호산구, 호염기구, Th2, ILC2, 비고전적 단핵구 및 Th2/Th17 세포 등을 들 수 있다.
- [0286] 세포를 96웰 플레이트 등의 플레이트에 분주한 후, 제1 항체로서 혈청, 하이브리도마의 배양 상청 또는 정제 모노클로날 항체 등의 피검 물질을 분주하여, 반응시킨다. 반응 후의 세포를 1 내지 10% 소혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)을 포함하는 PBS(이하, BSA-PBS라 기재함) 등으로 잘 세정한 후, 제2 항체로서 형광 시약 등으로 표지한 항 면역글로불린 항체를 분주하여 반응시킨다. BSA-PBS 등으로 잘 세정한 후, 플로우 사이토미터를 사용하여 표지화 항체의 형광량을 측정함으로써, 발현 세포에 대하여 특이적으로 반응하는 모노클로날 항체를 선택한다.
- [0287] 또한, 본 발명의 모노클로날 항체와 결합하여 인간 CRTH2에 결합하는 모노클로날 항체는, 상술한 플로우 사이토메트리를 사용한 결합 반응 검출계에, 피검 항체를 첨가하여 반응시킴으로써 취득할 수 있다.
- [0288] 즉, 피검 항체를 첨가했을 때에 본 발명의 모노클로날 항체의 결합이 저해되는 항체를 스크리닝함으로써, 인간 CRTH2의 아미노산 서열, 또는 그의 입체 구조에 대한 결합에 대해서, 본 발명에서 취득한 모노클로날 항체와 결합하는 모노클로날 항체를 취득할 수 있다.
- [0289] 또한, 본 발명의 인간 CRTH2의 아미노산 서열, 또는 그의 입체 구조에 결합하는 모노클로날 항체가 인식하는 애피토프와 동일한 애피토프에 결합하는 항체는, 상술한 플로우 사이토메트리를 사용한 결합 반응 검출계로 취득된 항체의 애피토프를 동정하고, 동정한 애피토프의, 부분적인 합성 웨პ티드, 또는 애피토프의 입체 구조로 의해 시킨 합성 웨პ티드 등을 제작하고, 면역시킴으로써 취득할 수 있다.
- [0290] 2. 유전자 재조합 항체의 제작
- [0291] 유전자 재조합 항체의 제작예로서, 이하에 인간형 키메라 항체 및 인간화 항체의 제작 방법을 나타낸다.

[0292] (1) 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 구축

[0293] 유전자 재조합 항체 발현용 벡터는, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA가 편입된 동물 세포용 발현 벡터이며, 동물 세포용 발현 벡터에 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 각각 클로닝함으로써 구축할 수 있다.

[0294] 인간 항체의 C 영역은 임의의 인간 항체의 CH 및 CL을 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간 항체의 γ1 서브클래스의 CH 및 κ 클래스의 CL 등을 사용한다. 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA에는, cDNA를 사용하지만, 엑손과 인트론을 포함하는 염색체 DNA를 사용할 수도 있다.

[0295] 동물 세포용 발현 벡터에는, 인간 항체의 C 영역을 코딩하는 유전자를 도입하여 발현할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, 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)] 또는 pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol., 13, 79(1993)] 등을 사용한다.

[0296] 동물 세포용 발현 벡터 중 프로모터와 인핸서에는, SV40의 초기 프로모터[J. Biochem., 101, 1307(1987)], 몰로니 마우스 백혈병 바이러스 LTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960(1987)], 또는 면역글로불린 H체의 프로모터[Cell, 41, 479(1985)]와 인핸서[Cell, 33, 717(1983)] 등을 사용한다.

[0297] 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에는, 유전자 재조합 항체 발현 벡터의 구축 용이성, 동물 세포에 대한 도입의 용이성, 동물 세포 내에서의 항체 H체 및 L체의 발현량의 밸런스가 균형을 이루거나 하는 점에서, 항체 H체 및 L체가 동일한 벡터 상에 존재하는 타입(坦andum)의 유전자 재조합 항체 발현용 벡터[J. Immunol. Methods, 167, 271(1994)]를 사용하지만, 항체 H체 및 L체가 개개의 벡터 상에 존재하는 세페레이트 벡터를 사용할 수도 있다.坦andum형 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에는, pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호), pEE18[Hybridoma, 17, 559(1998)] 등을 사용한다.

[0298] (2) 인간 이외의 동물 유래의 항체의 V 영역을 코딩하는 cDNA의 취득 및 아미노산 서열의 해석

[0299] 비인간 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA의 취득 및 아미노산 서열의 해석은 이하와 같이 하여 행할 수 있다.

[0300] 비인간 항체를 산생하는 하이브리도마 세포로부터 mRNA를 추출하고, cDNA를 합성한다. 합성한 cDNA를 파지 또는 플라스미드 등의 벡터에 클로닝하여 cDNA 라이브러리를 제작한다.

[0301] 상기 라이브러리로부터, 마우스 항체의 C 영역 부분 또는 V 영역 부분을 코딩하는 DNA를 프로브로서 사용하고, VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 갖는 재조합 파지 또는 재조합 플라스미드를 각각 단리한다. 재조합 파지 또는 재조합 플라스미드 상의 목적으로 하는 마우스 항체의 VH 또는 VL의 전체 염기 서열을 각각 결정하고, 염기 서열로부터 VH 또는 VL의 전체 아미노산 서열을 각각 추정한다.

[0302] 비인간 항체를 산생하는 하이브리도마 세포를 제작하는 인간 이외의 동물에는, 마우스, 래트, 햄스터 또는 토끼 등을 사용하지만, 하이브리도마 세포를 제작하는 것이 가능하면, 어떠한 동물도 사용할 수 있다.

[0303] 하이브리도마 세포로부터의 전체 RNA의 조제에는, 티오시안산구아니딘-트리플루오로아세트산세습법[Methods in Enzymol., 154, 3(1987)], 또는 RNA 이지 키트(easy kit)(퀴아젠사) 등의 키트 등을 사용한다.

[0304] 전체 RNA로부터의 mRNA의 조제에는, 올리고(dT) 고정화 셀룰로오스 칼럼법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)], 또는 올리고-dT30<Super>mRNA 정제 키트(Oligo-dT30<Super>mRNA Purification Kit)(다카라 바이오사) 등의 키트 등을 사용한다. 또한, 패스트 트랙 mRNA 단리 키트(Fast Track mRNA Isolation Kit)(인비트로젠사), 또는 퀵프렙 mRNA 정제 키트(QuickPrep mRNA Purification Kit)(파마시아사) 등의 키트를 사용하여 하이브리도마 세포로부터 mRNA를 조제할 수도 있다.

[0305] cDNA의 합성 및 cDNA 라이브러리의 제작에는, 공지된 방법[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)], cDNA 합성 및 플라스미드 클로닝을 위한 수퍼스크립트 플라스미드 시스템(SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning)(인비트로젠사), 또는 ZAP-cDNA 합성 키트(Synthesis Kit)(스트라타진사) 등의 키트 등을 사용한다.

[0306] cDNA 라이브러리의 제작 시, 하이브리도마 세포로부터 추출한 mRNA를 주형으로 하여 합성한 cDNA를 편입하는 벡터에는, 해당 cDNA를 편입할 수 있는 벡터라면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다.

- [0307] 예를 들어, ZAP ExPress[Strategies, 5, 58(1992)], pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)], λZAPII(스트라타진사), λgt10, λgt11[DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49(1985)], Lambda BlueMid(클론테크사), λEx Cell, pT7T3-18U(파마시아사), pcd2[Mol. Cell. Biol., 3, 280(1983)], 또는 pUC18[Gene, 33, 103(1985)] 등을 사용한다.
- [0308] 과자 또는 플라스미드 벡터에 의해 구축되는 cDNA 라이브러리를 도입하는 대장균에는, 해당 cDNA 라이브러리를 도입, 발현 및 유지할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, 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)], 또는 JM105[Gene, 38, 275(1985)] 등을 사용한다.
- [0309] cDNA 라이브러리로부터의 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA 클론의 선택에는, 아이소토프 또는 형광 표지한 프로브를 사용한 콜로니·하이브리다이제이션법, 또는 플라크·하이브리다이제이션법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)] 등을 사용한다.
- [0310] 또한, 프라이머를 조제하고, mRNA로부터 합성한 cDNA 또는 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여, 폴리메라아제 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction)법[이하, PCR법]이라 기재함. 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)]을 행함으로써 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 조제할 수도 있다.
- [0311] 선택된 cDNA를, 적당한 제한효소 등으로 절단 후, pBluescript SK(-)(스트라타진사) 등의 플라스미드에 클로닝하고, 통상 사용되는 염기 서열 해석 방법 등에 의해 해당 cDNA의 염기 서열을 결정한다. 염기 서열 해석 방법에는, 예를 들어 디테옥시법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)] 등의 반응을 행한 후, ABI PRISM3700(PE 바이오시스템즈사) 또는 A. L. F. DNA 시퀀서(파마시아사) 등의 염기 서열 자동 분석 장치 등을 사용한다.
- [0312] 결정한 염기 서열로부터 VH 및 VL의 전체 아미노산 서열을 각각 추정하고, 기지 항체의 VH 및 VL의 전체 아미노산 서열[A. L. F. DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써, 취득한 cDNA가 분비 시그널 서열을 포함하는 항체의 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열을 코딩하고 있는지를 각각 확인한다.
- [0313] 분비 시그널 서열을 포함하는 항체의 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열에 대해서는, 기지 항체의 VH 및 VL의 전체 아미노산 서열[A. L. F. DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써, 분비 시그널 서열의 길이 및 N 말단 아미노산 서열을 추정할 수 있으며, 나아가 그들이 속하는 서브그룹을 알 수 있다. 또한, VH 및 VL의 각 CDR의 아미노산 서열에 대해서도, 기지 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열[A. L. F. DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써 알아낼 수 있다.
- [0314] 또한, 얻어지는 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열을 사용하여, 예를 들어 SWISS-PROT 또는 PIR-Protein 등의 임의의 데이터베이스에 대하여 BLAST법[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] 등의 상동성 검색을 행하여, VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열이 신규한 것인지를 확인할 수 있다.
- [0315] (3) 인간형 키메라 항체 발현 벡터의 구축
- [0316] (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에, 각각 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 각각 클로닝함으로써 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축할 수 있다.
- [0317] 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA의 3' 말단측과, 인간 항체의 CH 또는 CL의 5' 말단측을 연결하기 위해서, 연결 부분의 염기 서열이 적절한 아미노산을 코딩하고, 또한 적당한 제한효소 인식 서열이 되도록 설계한 VH 및 VL의 cDNA를 제작한다.
- [0318] 제작된 VH 및 VL의 cDNA를, (1)에서 얻어지는 인간화 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에 그들이 적절한 형태로 발현되도록 각각 클로닝하여, 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축한다.
- [0319] 또한, 비인간 항체 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, 적당한 제한효소의 인식 서열을 양단에 갖는 합성 DNA를 사용하여 PCR법에 의해 각각 증폭시키고, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에 클로닝할 수도 있

다.

[0320] (4) 인간화 항체의 V 영역을 코딩하는 cDNA의 구축

[0321] 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA는, 이하와 같이 하여 구축할 수 있다.

[0322] 비인간 항체의 VH 또는 VL의 CDR의 아미노산 서열을 이식하는 인간 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열을 각각 선택한다. 선택하는 FR의 아미노산 서열에는, 인간 항체 유래의 것으면, 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0323] 예를 들어, Protein Data Bank 등의 데이터베이스에 등록되어 있는 인간 항체의 FR의 아미노산 서열, 또는 인간 항체의 FR의 각 서브그룹의 공통 아미노산 서열[A. L. F. DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)] 등을 사용한다. 항체의 결합 활성의 저하를 억제하기 위해서, 원래의 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열과 가능한 한 높은 상동성(적어도 60% 이상)의 FR의 아미노산 서열을 선택한다.

[0324] 이어서, 선택한 인간 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열에, 원래 항체의 CDR의 아미노산 서열을 각각 이식하고, 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 각각 설계한다. 설계한 아미노산 서열을 항체의 유전자 염기 서열에서 보이는 코돈의 사용 빈도[A. L. F. DNA, US Dept. Health and Human Services(1991)]를 고려하여 DNA 서열로 변환하고, 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열을 각각 설계한다.

[0325] 설계한 DNA 서열에 기초하여, 100 염기 전후의 길이로 이루어지는 수개의 합성 DNA를 합성하고, 그들을 사용하여 PCR 반응을 행한다. 이 경우, PCR 반응에서의 반응 효율 및 합성 가능한 DNA의 길이로부터, 바람직하게는 H 쇄, L 쇄 각각에 대하여 각 6개의 합성 DNA를 설계한다. 또한, 양단에 위치하는 합성 DNA의 5' 말단에 적당한 제한효소의 인식 서열을 도입함으로써, 용이하게, 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, (1)에서 얻어지는 인간화 항체 발현용 백터에, 클로닝할 수 있다.

[0326] PCR 반응 후, 증폭 산물을 pBluescript SK(-)(스트라타진사) 등의 플라스미드에 각각 클로닝하고, (2)에 기재된 방법과 동일한 방법에 의해, 염기 서열을 결정하고, 원하는 인간화 항체의 H 쇄 전체 길이 또는 L 쇄 전체 길이의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열을 갖는 플라스미드를 취득한다.

[0327] 또는, 설계한 DNA 서열에 기초하여, VH 전체 길이 및 VL 전체 길이를 각각 하나의 장쇄 DNA로서 합성한 것을, 상기 PCR 증폭 산물 대신에 사용할 수도 있다. 또한, 합성 장쇄 DNA의 양단에 적당한 제한효소의 인식 서열을 도입함으로써, 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, (1)에서 얻어지는 인간화 항체 발현용 백터에 용이하게 클로닝할 수 있다.

[0328] (5) 인간화 항체의 V 영역의 아미노산 서열의 개변

[0329] 인간화 항체는, 비인간 항체의 VH 및 VL의 CDR만을 인간 항체의 VH 및 VL의 FR에 이식한 것만으로는, 그 항원 결합 활성은 원래의 비인간 항체에 비해 저하한다[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]. 인간화 항체에서는, 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 서열 중에서, 직접 항원과의 결합에 관여하고 있는 아미노산 잔기, CDR의 아미노산 잔기와 상호 작용하는 아미노산 잔기, 및 항체의 입체 구조를 유지하고, 간접적으로 항원과의 결합에 관여하고 있는 아미노산 잔기를 동정하고, 그들 아미노산 잔기를 원래의 비인간 항체의 아미노산 잔기로 치환함으로써, 저하된 항원 결합 활성을 상승시킬 수 있다.

[0330] 항원 결합 활성에 관계되는 FR의 아미노산 잔기를 동정하기 위해서, X선 결정 해석[J. Mol. Biol., 112, 535(1977)] 또는 컴퓨터 모델링[Protein Engineering, 7, 1501(1994)] 등을 사용함으로써, 항체의 입체 구조의 구축 및 해석을 행할 수 있다. 또한, 각각의 항체에 대하여 수종의 개변체를 제작하고, 각각의 항원 결합 활성과의 상관을 검토하는 것을 반복하여, 시행 착오함으로써 필요한 항원 결합 활성을 갖는 인간화 항체를 취득할 수 있다.

[0331] 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 잔기는, 개변용 합성 DNA를 사용하여 (4)에 기재된 PCR 반응을 행함으로써 치환할 수 있다. PCR 반응 후의 증폭 산물에 대해서 (2)에 기재된 방법에 의해, 염기 서열을 결정하고, 목적으로 하는 개변이 실시된 것을 확인한다.

[0332] (6) 인간화 항체 발현 백터의 구축

[0333] (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 백터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에, 구축한 유전자 재조합 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 각각 클로닝하여, 인간화 항체 발현 백터를 구축할 수 있다.

- [0334] 예를 들어, (4) 및 (5)에서 얻어지는 인간화 항체의 VH 또는 VL을 구축할 때에 사용하는 합성 DNA 중, 양단에 위치하는 합성 DNA의 5' 말단에 적당한 제한효소의 인식 서열을 도입함으로써, (1)에서 얻어지는 인간화 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에 그들이 적절한 형태로 발현되도록 각각 클로닝한다.
- [0335] (7) 유전자 재조합 항체의 일과성 발현
- [0336] (3) 및 (6)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현 벡터, 또는 그들을 개변시킨 발현 벡터를 사용하여 유전자 재조합 항체의 일과성 발현을 행하고, 제작한 다종류의 유전자 재조합 항체의 항원 결합 활성을 효율적으로 평가할 수 있다.
- [0337] 발현 벡터를 도입하는 숙주 세포에는, 유전자 재조합 항체를 발현할 수 있는 숙주 세포이면, 어떠한 세포라도 사용할 수 있지만, 예를 들어 COS-7 세포(ATCC 번호: CRL1651)을 사용한다[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283(1991)].
- [0338] COS-7 세포에 대한 발현 벡터의 도입에는, DEAE-덱스트란법[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press(1991)] 또는 리포액션법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 등을 사용한다.
- [0339] 발현 벡터의 도입 후, 배양 상청 중의 유전자 재조합 항체의 발현량 및 항원 결합 활성을 효소 면역 항체법 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽(1987)] 등을 사용하여 측정한다.
- [0340] (8) 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질전환주의 취득과 유전자 재조합 항체의 조제
- [0341] (3) 및 (6)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현 벡터를 적당한 숙주 세포에 도입함으로써 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질전환주를 얻을 수 있다.
- [0342] 숙주 세포로의 발현 벡터의 도입에는, 일렉트로포레이션법[일본 특허 공개 평02-257891호 공보; Cytotechnology, 3, 133(1990)] 등을 사용한다.
- [0343] 유전자 재조합 항체 발현 벡터를 도입하는 숙주 세포에는, 유전자 재조합 항체를 발현시킬 수 있는 숙주 세포이면, 어떠한 세포라도 사용할 수 있다. 예를 들어, CHO-K1(ATCC 번호: CCL-61), DUkXB11(ATCC 번호: CCL-9096), Pro-5(ATCC 번호: CCL-1781), CHO-S(Life Technologies, Cat#11619), 래트 미엘로마 세포YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20(또는 YB2/0이라고도 함), 마우스 미엘로마 세포 NS0, 마우스 미엘로마 세포 SP2/0-Ag14(ATCC 번호: CRL1581), 마우스 P3-X63-Ag8653 세포(ATCC 번호: CRL1580), 디히드로엽산 환원효소 유전자(Dihydroforate Reductase, 이하, DHFR이라 표기함)가 결손된 CHO 세포[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)], 렉틴 내성을 획득한 Lec13[Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 55(1986)], α 1,6-푸코오스 전이효소 유전자가 결손된 CHO 세포(국제 공개 제2005/035586호, 국제 공개 제02/31140호), 래트 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 세포(ATCC 번호: CRL1662) 등을 사용한다.
- [0344] 발현 벡터의 도입 후, 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질전환주는, G418 황산염 등의 약제를 포함하는 동물 세포 배양용 배지로 배양함으로써 선택한다(일본 특허 공개 평02-257891호 공보).
- [0345] 동물 세포 배양용 배지에는, RPMI1640 배지(인비트로젠사), GIT 배지(닛본 세이야꾸사), EX-CELL301 배지(제이 알에이치사), IMDM 배지(인비트로젠사), 하이브리도마-SFM 배지(인비트로젠사), 또는 이들 배지에 FBS 등의 각종 첨가물을 첨가한 배지 등을 사용한다.
- [0346] 얻어지는 형질전환주를 배지 중에서 배양함으로써 배양 상청 중에 유전자 재조합 항체를 발현 측정시킨다. 배양 상청 중의 유전자 재조합 항체의 발현량 및 항원 결합 활성을 ELISA법 등에 의해 측정할 수 있다. 또한, DHFR 중폭계(일본 특허 공개 평02-257891호 공보) 등을 이용하여, 형질전환주가 산생하는 유전자 재조합 항체의 발현량을 상승시킬 수 있다.
- [0347] 유전자 재조합 항체는, 형질전환주의 배양 상청으로부터 단백질 A-칼럼을 사용하여 정제한다[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]. 또한, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피 및 한외 여과 등의 단백질의 정제에서 사용되는 방법을 조합할 수도 있다.
- [0348] 정제한 유전자 재조합 항체의 H쇄, L쇄 또는 항체 분자 전체의 분자량은, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법

[Nature, 227, 680(1970)], 또는 웨스턴 블로팅법[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0349] 3. 정제 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편의 활성 평가

[0350] 정제한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편의 활성 평가는, 이하와 같이 행할 수 있다.

[0351] 인간 CRTH2 발현 세포주에 대한 결합 활성은, 예를 들어 전술한 1.(6)에 기재된 플로우 사이토메트리를 사용한 결합 반응 검출계 등의 형광 항체법[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)]을 사용하여 측정할 수 있다.

[0352] 인간 CRTH2 양성 배양 세포주에 대한 CDC 활성, 또는 ADCC 활성은 공지된 측정 방법[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)]에 의해 측정한다.

[0353] 4. 항체의 이펙터 활성을 제어하는 방법

[0354] 본 발명의 모노클로날 항체의 이펙터 활성을 제어하는 방법으로서는, 항체의 Fc 영역의 297번째의 아스파라긴(Asn)에 결합하는 N 결합 복합형 당쇄의 환원 말단에 존재하는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)에 α 1,6 결합하는 푸코오스(코어 푸코오스라고도 함)의 양을 제어하는 방법(국제 공개 제2005/035586호, 국제 공개 제2002/31140호, 국제 공개 제00/61739호), 또는 항체의 Fc 영역의 아미노산 잔기를 개변함으로써 제어하는 방법 등이 알려져 있다. 본 발명의 모노클로날 항체에는 어느 방법을 사용해도, 이펙터 활성을 제어할 수 있다.

[0355] 이펙터 활성이란, 항체의 Fc 영역을 통해 야기되는 항체 의존성의 활성을 말하고, ADCC 활성, CDC 활성, 또는 매크로파지 또는 수상 세포 등의 식세포에 의한 항체 의존성 식세포작용(Antibody-dependent phagocytosis, ADP 활성) 등이 알려져 있다.

[0356] 이펙터 활성의 측정법으로서, 예를 들어 표적으로서 염증성 세포, 이펙터로서 인간 말초혈 단핵구(PBMC), 그리고 염증성 세포 특이적인 항체를 혼합하고, 4시간 정도 인큐베이션한 후, 세포 장애의 지표로서 유리된 락트산 탈수소효소(LDH)를 측정할 수 있다. 또는, 인간 PBMC에, 예를 들어 CD20과 같은 혈액 세포 특이적인 항원을 인식하는 항체를 혼합하고, 인큐베이션한 후, 유리 LDH의 측정이나 플로우 사이토메트리에 의한 해당 세포수의 감소를 이펙터 활성으로서 측정할 수 있다.

[0357] 항체의 Fc의 N 결합 복합형 당쇄의 코어 푸코오스의 함량을 제어함으로써, 항체의 이펙터 활성을 증가 또는 저하시킬 수 있다. 항체의 Fc에 결합되어 있는 N 결합 복합형 당쇄에 결합하는 푸코오스의 함량을 저하시키는 방법으로서는, 예를 들어, α 1,6-푸코오스 전이효소 유전자가 결손된 CHO 세포를 사용하여 항체를 발현시키는 방법을 들 수 있고, 푸코오스가 결합되지 않은 항체를 취득할 수 있다. 푸코오스가 결합되지 않은 항체는 높은 ADCC 활성을 갖는다.

[0358] 한편, 항체의 Fc에 결합되어 있는 N 결합 복합형 당쇄에 결합하는 푸코오스의 함량을 증가시키는 방법으로서는, 예를 들어, α 1,6-푸코오스 전이효소 유전자를 도입한 숙주 세포를 사용하여 항체를 발현시키는 방법을 들 수 있고, 푸코오스가 결합되어 있는 항체를 취득할 수 있다. 푸코오스가 결합되어 있는 항체는, 푸코오스가 결합되지 않은 항체보다도 낮은 ADCC 활성을 갖는다.

[0359] 또한, 항체의 Fc 영역의 아미노산 잔기를 개변함으로써 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 증가 또는 저하시킬 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제2007/0148165호 명세서에 기재된 Fc 영역의 아미노산 서열을 사용함으로써 항체의 CDC 활성을 증가시킬 수 있다.

[0360] 또한, 미국 특허 제6737056호 명세서, 미국 특허 제7297775호 명세서 또는 미국 특허 제7317091호 명세서에 기재된 아미노산 개변을 행함으로써, ADCC 활성 또는 CDC 활성을, 증가시킬 수도 저하시킬 수도 있다.

[0361] 또한 본 발명의 항체에는, 상술한 항체 정상 영역에 있어서의 아미노산 개변이나 당쇄 개변에 따라, 예를 들어 일본 특허 공개 제2013-165716호 공보, 일본 특허 공개 제2012-021004호 공보 등에 기재된 아미노산 개변을 행함으로써, Fc 수용체에 대한 반응성을 제어함으로써 혈중 반감기를 제어한 항체도 포함된다.

[0362] 또한, 상술한 방법을 조합하여, 하나의 항체에 사용함으로써, 항체의 이펙터 활성이나 혈중 반감기가 제어된 항체를 취득할 수 있다.

- [0363] 5. 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용한 질환의 치료 방법
- [0364] 본 발명의 항체는, 인간 CRTH2가 관계하는 질환의 치료에 사용할 수 있다. 투여 경로로서는, 예를 들어 경구 투여, 또는 구강 내, 기도 내, 직장 내, 피하, 근육 내, 정맥 내 또는 복강 내 등의 비경구 투여를 들 수 있다. 투여 형태로서는, 예를 들어 분무제, 캡슐제, 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 유제, 좌제, 주사제, 연고 또는 테이프제 등을 들 수 있다.
- [0365] 경구 투여에 적당한 제제로서는, 예를 들어 유제, 시럽제, 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등을 들 수 있다.
- [0366] 유제 또는 시럽제와 같은 액체 조제물은, 물, 자당, 소르비톨 또는 과당 등의 당류, 폴리에틸렌글리콜 또는 프로필렌글리콜 등의 글리콜류, 호마유, 올리브유 또는 대두유 등의 유류, p-히드록시벤조산에스테르류 등의 방부제, 또는 스트로베리 플레이버 또는 페퍼민트 등의 플레이버류 등을 첨가제로서 사용하여 조제한다.
- [0367] 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등은, 유당, 포도당, 자당 또는 만니톨 등의 부형제, 전분 또는 알긴산나트륨 등의 붕괴제, 스테아르산마그네슘 또는 탈크 등의 활택제, 폴리비닐알코올, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 젤라틴 등의 결합제, 지방산에스테르 등의 계면 활성제 또는 글리세린 등의 가소제 등을 첨가제로서 사용하여 제조한다.
- [0368] 비경구 투여에 적당한 제제로서는, 예를 들어 주사제, 좌제 또는 분무제 등을 들 수 있다.
- [0369] 주사제는, 염 용액, 포도당 용액, 또는 그 양자의 혼합물을 포함하는 담체 등을 사용하여 제조한다.
- [0370] 좌제는 카카오 버터, 수소화 지방 또는 카르복실산 등의 담체를 사용하여 제조한다.
- [0371] 분무제는 수용자의 구강 및 기도 점막을 자극하지 않고, 또한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 미세한 입자로서 분산시켜, 흡수를 쉽게 만드는 담체 등을 사용하여 제조한다. 담체로서는, 예를 들어 유당 또는 글리세린 등을 사용한다. 또한, 에어로졸 또는 드라이 파우더로서 제조할 수도 있다.
- [0372] 또한, 상기 비경구제에 있어서도, 경구 투여에 적당한 제제로 첨가제로서 예시한 성분을 첨가할 수도 있다.
- [0373] 6. 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 사용한 질환의 진단 방법
- [0374] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여, 인간 CRTH2 또는 인간 CRTH2가 발현한 세포를 검출 또는 측정함으로써, 인간 CRTH2가 관련되는 질환을 진단할 수 있다.
- [0375] 인간 CRTH2가 관련되는 질환의 하나인 알레르기 질환의 진단은, 예를 들어 환자 유래의 말초혈, 객담, 콧물 또는 폐포 세정액 등에 존재하는 염증성 세포에 발현되고 있는 인간 CRTH2를 플로우 사이토미터 등의 면역학적 방법을 사용하여 검출함으로써 행할 수 있다.
- [0376] 면역학적 방법이란, 표지를 실시한 항원 또는 항체를 사용하여, 항체량 또는 항원량을 검출 또는 측정하는 방법이다. 예를 들어, 방사성 물질 표지 면역 항체법, 효소 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 발광 면역 측정법, 웨스턴 블로트법 또는 물리 화학적 방법 등을 사용한다.
- [0377] 방사성 물질 표지 면역 항체법은, 예를 들어 항원 또는 항원을 발현한 세포 등에, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시키고, 또한 방사선 표지를 실시한 항 면역글로불린 항체 또는 결합 단편을 반응시킨 후, 신틸레이션 카운터 등으로 측정한다.
- [0378] 효소 면역 측정법은, 예를 들어 항원 또는 항원을 발현한 세포 등에, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시키고, 또한 표지를 실시한 항 면역글로불린 항체 또는 결합 단편을 반응시킨 후, 발색 색소를 흡광 광도계로 측정한다. 예를 들어 샌드위치 ELISA법 등을 사용한다.
- [0379] 효소 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 공지[효소 면역 측정법, 이가쿠 쇼인(1987)]된 효소 표지를 사용할 수 있다. 예를 들어, 알칼리 포스파타이제 표지, 페옥시다아제 표지, 루시페라이제 표지 또는 비오틴 표지 등을 사용한다.
- [0380] 샌드위치 ELISA법은, 고상에 항체를 결합시킨 후, 검출 또는 측정 대상인 항원을 포획시켜, 포획된 항원에 제2 항체를 반응시키는 방법이다. 해당 ELISA법에서는, 검출 또는 측정하고자 하는 항원을 인식하는 항체 또는 항체 단편이며, 항원 인식 부위가 다른 2종류의 항체를 준비하고, 그 중, 제1 항체 또는 항체 단편을 미리 플레이트(예를 들어, 96웰 플레이트)에 흡착시키고, 다음으로 제2 항체 또는 항체 단편을 FITC 등의 형광 물질, 페옥시다아제 등의 효소, 또는 비오틴 등으로 표지해둔다.

- [0381] 상기 항체가 흡착된 플레이트에, 생체 내에서 분리된, 세포 또는 그의 파쇄액, 조직 또는 그의 파쇄액, 세포 배양 상청, 혈청, 흥수, 복수 또는 암액 등을 반응시킨 후, 표지한 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 반응시켜, 표지 물질에 따른 검출 반응을 행한다. 농도 기지의 항원을 단계적으로 희석하여 제작한 검량선으로부터, 피검 샘플 중의 항원 농도를 산출한다.
- [0382] 샌드위치 ELISA법에 사용하는 항체로서는, 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체의 어느 것을 사용해도 되고, Fab, Fab' 또는 $F(ab')_2$ 등의 항체 프래그먼트를 사용해도 된다. 샌드위치 ELISA법에서 사용하는 2종류의 항체의 조합으로서는, 다른 에피토프를 인식하는 모노클로날 항체 또는 항체 단편의 조합이어야 되고, 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체 또는 항체 단편과의 조합이어야 된다.
- [0383] 형광 면역 측정법은, 문헌 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽(1987)] 등에 기재된 방법으로 측정한다. 형광 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 예를 들어 공지[형광 항체법, 소프트사이언스사(1983)]된 형광 표지를 들 수 있다. 예를 들어, 플루오레세인-소티오시아네이트(FITC) 또는 테트라메틸로다민-소티오시아네이트(RITC) 등을 들 수 있다.
- [0384] 발광 면역 측정법은 문헌 [생물 발광과 화학 발광 임상 검사 42, 히로카와 쇼텐(1998)] 등에 기재된 방법으로 측정한다. 발광 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 예를 들어 공지된 발광체 표지를 들 수 있고, 아크리디늄에스테르, 로핀 등을 들 수 있다.
- [0385] 웨스턴 블로트법은, 항원 또는 항원을 발현한 세포 등을 SDS(도데실황산나트륨)-PAGE[Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]로 분획한 후, 해당 절을 폴리불화비닐리텐(PVDF)막 또는 니트로셀룰로오스막에 블로팅하고, 해당 막에 항원을 인식하는 항체 또는 항체 단편을 반응시키고, 또한 FITC 등의 형광 물질, 페옥시다아제 등의 효소 표지, 또는 비오틴 표지 등을 실시한 항 마우스 IgG 항체 또는 결합 단편을 반응시킨 후, 해당 표지를 가시화함으로써 측정한다. 일례를 이하에 나타낸다.
- [0386] 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현하고 있는 세포 또는 조직을 용해시키고, 환원 조건하에서 레인당 단백량으로서 0.1 내지 $30\text{ }\mu\text{g}$ 을 SDS-PAGE법에 의해 영동시킨다. 영동된 단백질을 PVDF막에 트랜스퍼하고 1 내지 10% BSA-PBS에 실온에서 30분간 반응시켜 블로킹 조작을 행한다.
- [0387] 여기서 본 발명의 항체를 반응시켜, 0.05 내지 0.1%의 트윈(Tween)-20을 포함하는 PBS(이하, 트윈-PBS라 기재함)로 세정하고, 페옥시다아제 표지한 염소 항 마우스 IgG를 실온에서 2시간 반응시킨다. 트윈-PBS로 세정하고, ECL 웨스턴 블로팅 검출 시약(ECL Western Blotting Detection Reagents; 아마샵사제) 등을 사용하여 모노클로날 항체가 결합한 밴드를 검출함으로써, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 검출한다. 웨스턴 블로팅에서의 검출에 사용되는 항체로서는, 천연형 입체 구조를 유지하고 있지 않은 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체가 사용된다.
- [0388] 물리 화학적 방법은, 예를 들어 항원인 인간 CRTH2와 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 결합시킴으로써 응집체를 형성시켜, 이 응집체를 검출함으로써 행한다. 이 밖에 물리 화학적 방법으로서, 예를 들어 모세관법, 일차원 면역 확산법, 면역 비탁법 또는 라텍스 면역 비탁법[임상 검사법 제요, 가네하라 슈판(1998)] 등을 들 수 있다.
- [0389] 라텍스 면역 비탁법은, 항체 또는 항원을 감작시킨 입경 0.1 내지 $1\mu\text{m}$ 정도의 폴리스티렌 라텍스 등의 담체를 사용하여, 대응하는 항원 또는 항체에 의해 항원 항체 반응을 일으키면, 반응액 내의 산란광은 증가하고, 투과광은 감소된다. 이 변화를 흡광도 또는 적분구 탁도로서 검출함으로써 피검 샘플 중의 항원 농도 등을 측정한다.
- [0390] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여, 당해 항체에 의한 치료 유효성을 치료 개시 전에 판단하는 방법으로서는, 예를 들어 이하를 들 수 있다.
- [0391] 먼저, 치료 개시 전에, 환자 체내로부터 예를 들어 말초혈, 객담, 폐포 세정액, 콧물 등을 채취하고, 그 혼탁액에 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 첨가하여, 일정 시간 후, 염증성 세포의 제거나 Th2 타입 사이토카인 등의 생체 기능 분자에 대한 저해 활성을 비롯한, 항염증성 세포 활성을 측정한다. 측정의 결과, 항염증성 세포 활성이 검출된 경우, 그 말초혈, 객담, 콧물 등을 갖는 환자의 치료에는, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편이 유효하다고 치료 개시 전에 판단할 수 있다.

[0392] 실시예

[0393] 이하에, 실시예에 의해 본 발명을 설명하지만, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0394] [실시예 1]

[0395] 인간 CRTH2 발현 세포의 조성(造成)

[0396] (1) 인간 CRTH2 발현 벡터의 제작

[0397] 인간 CRTH2(이하 CRTH2라 기재하는 경우도 있음)의 cDNA는 전체 합성하고, 이후의 시험에 사용하였다. 인간 CRTH2의 cDNA 서열을 서열 번호 1에, 아미노산 서열을 서열 번호 2에 기재한다.

[0398] (i) 인간 CRTH2 유전자 발현 pKANTEX93 벡터의 구축

[0399] 제한효소 EcoRI 및 KpnI를 사용하여, 인간 CRTH2의 cDNA를 벡터 pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호)과 연결하여, 인간 CRTH2 유전자 발현 pKANTEX93 벡터를 구축하였다.

[0400] (ii) 인간 CRTH2 유전자 발현 pAMoh 벡터의 구축

[0401] pAMoh(국제 공개 제03/087366호)에 대해서도, 제한효소 KpnI 및 HindIII를 사용하여 인간 CRTH2 유전자를 편입하고, 인간 CRTH2 유전자 발현 pAMoh 벡터를 구축하였다.

[0402] (2) 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포의 조성

[0403] DHFR 유전자 결손 CHO(차이니즈 햄스터 난소) 세포 DG44주(CHO/DG44 세포)를 미쓰비시 가가꾸 가부시키가이샤·요코하마 종합 연구소로부터 입수하고, 인간 CRTH2 발현 세포 조성에 사용하였다. 배양에는 10% 투석 소태아 혈청(dFBS)(GIBCO사), HT[히포크산틴(H), 티미딘(T)] 보충제(supplement)(GIBCO사) 및 50 µg/mL 젠타마이신(나카라이 테스크사)을 첨가한 IMDM(GIBCO사)(이하, IMDM 배양 배지라 약기함)을 사용하였다.

[0404] 먼저, (1)-(i)에서 제작된 인간 CRTH2 유전자 발현 pKANTEX93 벡터를 제한효소 AatII 처리에 의해 절단하고, 얻어진 직쇄상 DNA를 정제하여, 멸균수에 용해시켰다. 이 DNA를 일렉트로포레이션법에 의해, CHO/DG44 세포에 도입하고, HT 보충제를 뺀 IMDM 배양 배지에서 3일 정도 배양하였다.

[0405] 그 후, 10% dFBS, 0.5mg/mL G418(나카라이 테스크사) 및 50 µg/mL 젠타마이신(나카라이 테스크사)을 첨가한 IMDM(이하, IMDM 선택 배지라 약기함)에서 약제 내성 세포를 선택하였다. 선택한 약제 내성 세포를, 96웰 플레이트에 75cells/플레이트가 되도록 과종하고, 또한 2주일 정도 IMDM 선택 배지에서 배양하였다. 웰마다 현미경 하에서 관찰하고, 성글 클론이 된 것을 순차 확대 배양하였다.

[0406] 얻어진 약제 내성 세포를 0.02% EDTA 용액(나카라이 테스크사)으로 박리하고, PBS(phosphate buffered saline; 포스페이트 완충 염수)로 세정한 후, 2% 소태아혈청(FBS), 0.05% NaN₃ 및 1mM EDTA를 포함하는 PBS(Staining Medium(염색 배지), 이하 SM이라 약기함)로 혼탁시켰다. 이어서, 2×10^5 cells/well이 되도록 96 웰 플레이트에 과종하고, 1700rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다.

[0407] 상청을 제거한 후, SM으로 조제한 PE 표지 항 인간 CRTH2 항체(베크만 쿨터사)를 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다. 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토미터(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다. 인간 CRTH2가 고발현하는 클론을 선택하고, 이 세포를 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포로 하였다.

[0408] (3) FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 벡터의 제작

[0409] (i) FLAG 융합 인간 CRTH2 유전자 발현 pAMoh 벡터의 구축

[0410] (1)-(ii)에서 제작된 인간 CRTH2 유전자 발현 pAMoh로부터, 프라이머 인간(human) CRTH2FLAG-A(서열 번호 3) 및 인간 CRTH2FLAG-B(서열 번호 4)를 사용하여, C 말단에 FLAG 태그가 부가된 인간 CRTH2(서열 번호 5)를 폴리메라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; 이하, PCR이라 기재함)으로 증폭시키고, 제한효소 KpnI 및 HindIII를 사용하여, 벡터 pAMoh(국제 공개 제03/087366호)와 연결하여, FLAG 융합 인간 CRTH2 유전자 발현 pAMoh 벡터를 구축하였다.

[0411] (ii) FLAG 융합 인간 CRTH2 유전자 발현 pKANTEX93 벡터의 구축

[0412] (3)-(i)에서 구축된 FLAG 융합 인간 CRTH2 유전자 발현 pAMoh 벡터로부터, 프라이머 인간 CRTH2FLAG-C(서열 번

호 6) 및 인간 CRTH2FLAG-D(서열 번호 7)를 사용하여, C 말단에 FLAG 태그가 부가된 인간 CRTH2를 PCR로 증폭시키고, 제한효소 EcoRI 및 KpnI을 사용하여, 벡터 pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호)과 연결하여, FLAG 융합 인간 CRTH2 유전자 발현 pKANTEX93 벡터를 구축하였다.

[0413] (4) FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 3Y1-B 세포의 조성

[0414] 래트 3Y1-B 세포를, 리캔 바이오리소스 센터로부터 입수하고, FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 세포 조성에 사용하였다. 배양에는 10% FBS(GIBCO사) 및 50 μ g/mL 젠타마이신(나카라이 테스크사)을 첨가한 DMEM(GIBCO사)(이하, DMEM 배양 배지라 약기함)을 사용하였다.

[0415] (3)-(ii)에서 제작된 FLAG 융합 인간 CRTH2 유전자 발현 pKANTEX93 벡터를 제한효소 AatII 처리에 의해 절단하고, 얻어진 직쇄상 DNA를 정제하여, 멸균수에 용해시켰다. 이 DNA를, 퓨진6(Fugene6)(프로메가사)을 사용한 리포펙션(Lipofection)법에 의해 3Y1-B 세포에 도입하고, DMEM 배양 배지에서 3일간 정도 배양하였다. 그 후, 10% FBS, 0.8mg/mL G418(나카라이 테스크사) 및 50 μ g/mL 젠타마이신(나카라이 테스크사)을 첨가한 DMEM(이하, DMEM 선택 배지)에서 약제 내성 세포를 선택하였다.

[0416] 얻어진 약제 내성 세포를 0.05% 트립신 용액(invitrogen사)으로 박리하고, PBS로 세정한 후, SM으로 혼탁시켰다. 이어서, 2×10^5 cells/well이 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, 1700rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다. 상청을 제거한 후, SM으로 조제한 PE 표지 항 인간 CRTH2 항체(베크만 쿨터사)를 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다. 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토미터(BD 바이오사이언스, FACS Aria)로 해석하였다. FLAG 융합 인간 CRTH2를 고발현하는 획분을 싱글 셀 소팅하고, 확대 배양을 행하여, FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 3Y1-B 세포로 하였다.

[0417] [실시예 2]

[0418] 인간 CRTH2에 대한 항체 모노클로날 항체의 제작

[0419] (1) 래트에 대한 면역

[0420] 인간 CRTH2에 대한 모노클로날 항체를 취득하기 위해서, 첫회 투여 시의 주령이 9주령인 암컷 WKY/NCr1Cr1j 래트(WKY 래트)(찰스 리버사)에 면역시켰다.

[0421] 첫회 투여는, 5×10^6 cells의 FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 3Y1-B 세포를 100 μ L의 생리 식염액(오쓰카 세이야꾸고조사)에 혼탁시키고, 시그마 아주반트 시스템(Sigma Adjuvant System)(등록 상표)(시그마 알드리치사) 100 μ L 와 합하여 200 μ L의 세포 혼탁액을 조제하고, 1군데당 100 μ L를 WKY 래트의 미근부에 좌우 2군데 근육 내 투여하였다.

[0422] 또한 첫회 투여 2주일 후에, 5×10^6 cells의 FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 3Y1-B 세포를 200 μ L의 생리 식염액에 혼탁시키고, 동일한 방법으로 투여를 행하였다.

[0423] (2) 하이브리도마의 제작

[0424] (1)에서 2회째의 면역을 행한 3일 후에, 외과적으로 WKY 래트로부터 장골 림프절을 적출하고, 세포 융합에 제공하였다.

[0425] 먼저, 적출한 장골 림프절을 슬라이드 클래스로 갈아 으깨어, 조직을 풀었다. 이 장골 림프절 조직을 최소 필수 배지(Minimum Essential Media; MEM)(invitrogen사)에 혼탁시키고, 셀 스트레이너를 통과시킴으로써, 여분의 조직을 제거하였다. 1200rpm으로 5분간 원심 분리함으로써 상청을 제거한 후, 다시 MEM으로 혼탁시켜, 장골 림프절 세포로 하였다.

[0426] 얻어진 장골 림프절 세포수에 대하여, 1/5 세포수의 마우스 미엘로마 세포주 P3-U1(ATCC)을 혼합하였다. 원심 분리에 의해 상청을 제거한 후, 37°C의 온육 내에서 테우면서, 500 μ L의 PEG 용액[폴리에틸렌글리콜(Polyethyleneglycol) 1000(준세이 가가꾸사) 및 MEM을 각각 1mL씩 혼합하고, DMSO(디메틸су포시드)(시그마 알드리치사)를 350 μ L 첨가한 것]을 완만하게 첨가하고, 거기에 1분마다 MEM 1mL를 5회 첨가한 후 추가로 45mL의 MEM을 첨가하였다.

[0427] 900rpm으로 5분간 원심 분리함으로써 상청을 제거한 후, 세포를 HAT 배지[500mL의 RPMI-1640(와코 준야쿠사)에 대하여, 10mL의 HAT(히포크산틴(H), 아미노프테린(A), 티미딘(T)) 용액(GIBCO사), 0.5mL의 55mmol/L 2-미캡토

에탄올(invitrogen사), 50mL의 소태아혈청(Moregate Biotech사) 및 0.5mL의 10mg/mL 젠타마이신 용액(나카라이 테스크사)을 첨가한 것]로 혼탁시키고, 96웰 플레이트에 과종하여 배양하였다.

[0428] (3) 하이브리도마 스크리닝

[0429] (2)에서 과종된 하이브리도마를 7일간 배양한 후, 각 웰의 배양 상청을 채취하여, 인간 CRTH2에 대한 반응성을 해석하였다. 양성 대조 세포 및 음성 대조 세포는, 각각 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포 및 CHO/DG44 세포로 하였다. 먼저, 양성 대조 세포 및 음성 대조 세포를 0.02% EDTA 용액(나카라이 테스크사제)으로 박리하고, 1 웨ル당 각각 1×10^5 cells/50 μ L가 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, 50 μ L의 배양 상청을 첨가하고, 4°C에서 30분간의 반응을 행하였다.

[0430] 세포를 세정한 후, SM으로 300배로 희석한 항-래트(Anti-rat) IgG(Fc)-DyLight488(abcam사) 100 μ L로 혼탁시키고, 4°C에서 30분간의 반응을 행하였다. 다시 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스, FACS CantoII)로 해석하였다.

[0431] 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포에 특이적인 반응을 보였던 웰의 하이브리도마에 대해서, 클로닝 배지[에스·클론 클로닝 미디엄 CM-B(에이디아사)에, 0.5mL의 10mg/mL 젠타마이신 용액(나카라이 테스크사), 5mL의 HT 보충제(Gibco사)를 첨가한 것]를 사용하여 한계 희석법에 의한 싱글 셀 클로닝을 2회 행하였다. 최종적으로, 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포에 가장 강한 플로우 사이토메트리 반응성을 나타내는 하이브리도마 Lym2 클론(이하, 하이브리도마 Lym2라 기재함)을 수립하였다.

[0432] (4) 하이브리도마 Lym2의 배양 상청에 포함되는 항체의 서브클래스의 동정

[0433] 하이브리도마 Lym2를 3일간 배양한 배양 상청을 PBS(나카라이 테스크사제)로 10배로 희석하고, 그 희석액을 150 μ L 사용하여 래트 모노클로날 항체 아이소타이핑 시험 키트(Rat Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit)(AbD Serotec사)에 첨부된 설명서에 따라서 서브클래스의 해석을 행하였다.

[0434] 그 결과, 하이브리도마 Lym2의 배양 상청 중에 포함되는 래트 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체(이하, 간단히 Lym2 항체라 약기하는 경우도 있음)는 래트 IgG2b 항체인 것이 명백해졌다.

[0435] (5) Lym2 항체의 정제

[0436] 하이브리도마-SFM(invitrogen사)에 5%의 소태아혈청(Fetal Bovine Serum) 울트라 로우(Ultra Low) IgG(invitrogen사)를 첨가한 배지에서, 하이브리도마 Lym2를 1주일 배양하였다. 배양 상청을 회수하여 정제에 제공하였다.

[0437] 배양 상청으로부터, Prosep-G(GE 헬스케어사)를 사용하여, Lym2 항체를 정제하였다. 먼저, 배양 상청을 칼럼에 로딩하고, PBS로 칼럼을 세정한 후, pH 5.0, 3.5 및 3.0의 용출 버퍼(0.1M 시트르산 1수화물-NaOH/pH 5.0, 3.5 및 3.0)로 순서대로 용출시켰다. 용출된 프랙션은 빠르게 중화 버퍼(2M Tris-HCl/pH8.5)로 중화시켰다.

[0438] 각각의 프랙션의 흡광도(280nm)를 측정하고, 측정값이 높은 연속 프랙션을 항체 획분으로서 회수하였다. PBS로 투석을 행하고, 0.22 μ m의 필터를 통과시킨 것을 정제 단백질로 하였다. 280nm의 흡광 계수를 1.4로 하여, 농도를 산출하였다.

[0439] [실시예 3]

[0440] Lym2 항체의 플로우 사이토메트리에 의한 항원 결합성 평가

[0441] FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 3Y1-B 세포를 0.05% 트립신 용액(invitrogen사)으로 박리하고, PBS로 세정한 후, SM으로 혼탁시켰다. 이어서, 1웨ル당 2×10^5 cells가 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, 1700rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다. 상청을 제거한 후, SM으로 10 μ g/mL가 되도록 조제한 Lym2 항체를 100 μ L 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다.

[0442] 세포를 세정한 후, SM으로 100배로 희석한 항-래트 IgG-FITC(베크만 쿨터사)를 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다. 다시 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스, FACS CantoII)로 해석하였다. 그 결과, Lym2 항체의 FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 3Y1-B 세포에 대한 결합이 확인되었다.

[0443] [실시예 4]

[0444] Lym2 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 클로닝

[0445] RNAiso plus(다카라 바이오사)를 사용하여, 첨부된 설명서에 따라서, PBS로 세정한 하이브리도마 Lym2를 용해시 키고, 총(total) RNA를 조제하였다. 얻어진 총 RNA는, DEPC 처리된 물(DEPC treated water)(invitrogen사)에 용해시켰다. 이어서, 올리고텍스-dT30<Super>mRNA 정제 키트(Oligotex-dT30<Super>mRNA Purification Kit)(총 RNA 유래(From Total RNA))(다카라 바이오사)를 사용하여, 첨부된 설명서에 따라서, 얻어진 총 RNA로부터 mRNA를 정제하였다. 또한, SMART RACE cDNA 증폭 키트(� amplification Kit)(Clontech사)를 사용하여, 첨부된 설명서에 따라서, 정제한 mRNA로부터 cDNA를 조제하였다.

[0446] 얻어진 cDNA를 주형으로, 프라이머 래트(Rat) IgG2bH-A(서열 번호 8) 및 래트 IgG2bH-B(서열 번호 9)를 사용하여, 래트 IgG2b 중쇄 유전자를, 프라이머 Ratk-A(서열 번호 10) 및 Ratk-B(서열 번호 11)를 사용하여, 래트 경쇄(κ 쇄) 유전자를, 각각 PCR에 의해 증폭시켰다. 증폭시킨 유전자를 서브클로닝하여, 염기 서열을 해석하였다.

[0447] 그 결과, 시그널 서열을 포함하는 Lym2 항체의 VH 및 VL의 염기 서열 및 아미노산 서열을 동정하였다. VH, VL 각각의 염기 서열을 서열 번호 12, 14, 아미노산 서열을 서열 번호 13, 15에 나타냈다. 또한, 카바트(Kabat) 등[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]의 보고로부터, 시그널 서열을 포함하지 않은 Lym2 항체의 VH 및 VL의 서열을 동정하였다.

[0448] 시그널 서열을 제외한 VH, VL 각각의 염기 서열을 서열 번호 16, 18에, 아미노산 서열을 서열 번호 17, 19에 나타냈다. 또한, Lym2 항체의 VH의 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열을, 각각 서열 번호 20, 21 및 22에, Lym2 항체의 VL의 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열을, 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 나타냈다.

[0449] [실시예 5]

[0450] 래트/인간 키메라형 Lym2 항체의 제작

[0451] (1) 래트/인간 키메라형 Lym2 항체 발현 벡터의 구축

[0452] 래트/인간 키메라형 Lym2 항체 발현 벡터는, 이하의 방법으로, Lym2 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자를, 각각 인간 IgG1 중쇄 및 κ 쇄 정상 영역 유전자에 연결함으로써 제작하였다.

[0453] 먼저 VH로서, 서열 번호 26의 서열을, VL로서, 서열 번호 27의 서열을 전체 합성하였다. 합성된 서열로부터, 프라이머 chLym2VH-A(서열 번호 28) 및 프라이머 chLym2VH-B(서열 번호 29)를 사용하여 VH를, 프라이머 chLym2VL-A(서열 번호 30) 및 프라이머 chLym2VL-B(서열 번호 31)를 사용하여 VL을 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0454] 유전자 단편은 아가로오스 겔 전기 영동을 행하고, 퀴아크 겔 추출 키트(QIAquick Gel Extraction Kit)(QIAGEN사)에 의해 정제하였다. 이 단편과, 인간 κ 쇄 정상 영역 발현 벡터(BgIII/BsiWI 처리) 및 인간 중쇄(IgG1) 정상 영역 발현 벡터(SalI/NheI 처리)를 사용하여, 인-퓨전 HD 클로닝 키트(In-Fusion HD Cloning Kit)(크론텍사)에 의한 벡터에 대한 서브클로닝을 첨부된 설명서에 따라서 행하였다.

[0455] 대장균 DH5 α 적격 세포(다카라 바이오사)로 형질전환하여, 플라스미드 추출, 시퀀스 확인을 실시함으로써, 래트/인간 키메라형 Lym2 항체(이하, chLym2라 기재함) 발현 벡터를 제작하였다.

[0456] (2) chLym2 일파성 발현 세포주의 조제

[0457] chLym2의 일파성 발현주를 제작하기 위해서, 프리스타일(FreeStyle)(상표) MAX CHO 발현 시스템(Expression System)(Lifetechnologies사)을 첨부된 설명서에 따라서 사용하고, 이하의 방법으로, 숙주 세포에 (1)에서 제작된 발현 벡터를 도입하였다. 숙주 세포에는, FUT8 녹아웃 CHO 세포(국제 공개 제2005/035586호, 국제 공개 제02/31140호)를 프리스타일(상표) CHO 발현 배지(Expression Medium)(Lifetechnologies사)에 순화(馴化)시킨 주를 사용하였다.

[0458] (1)에서 제작한 312.5 μ g의 chLym2 항체 발현 벡터(경쇄 발현 벡터와 중쇄 발현 벡터를 1:2로 혼합한 것)를 20mL의 Opti-Pro SFM(invitrogen사)에, 또한 312.5 μ L의 프리스타일 MAX 시약(Freestyle MAX Reagent)(invitrogen사)를 20mL의 Opti-Pro SFM에 각각 용해시키고, 실온에서 5분간 방치하였다. 상기 2액을 혼합하고, 실온에서 15분간 방치하였다. 해당 혼합 용액을 250mL의 숙주 세포 배양액(1×10^6 cells/mL)에 전량 첨가하여 chLym2 일파성 발현 세포주를 얻었다.

[0459] (3) chLym2의 정제

- [0460] (2)에서 얻어진 chLym2 일과성 발현 세포주를, 8mM의 L-글루타민(invitrogen사)을 첨가한 프리 스타일 CHO 발현 배지(invitrogen사)에 혼탁시키고, 삼각 플라스크에서 5일간 배양한 후, 배양 상청을 회수하였다. 회수한 배양 상청을 원심 분리하고, 0.22 μ m 필터를 사용하여 여과함으로써 chLym2를 포함하는 배양 상청을 조제하였다.
- [0461] 조제한 배양 상청으로부터 MabSelect SuRe(GE 헬스케어사)를 사용하여, chLym2를 정제하였다. 먼저, 배양 상청을 칼럼에 로딩하고, PBS로 칼럼을 세정한 후, pH 5.0, 3.5, 3.0의 용출 버퍼(0.1M 시트르산 1수화물-NaOH/pH 5.0, 3.5, 3.0)로 순서대로 용출시켰다. 용출된 프랙션은 빠르게 중화 버퍼(2M 트리스-HCl/pH 8.5)로 중화시켰다.
- [0462] 각각의 프랙션에 280nm의 흡광도(A280)를 측정하고, 측정값이 높은 연속 프랙션을 항체 획분으로서 회수하였다. 항체 획분을 PBS로 투석하고, 0.22 μ m의 필터를 통과시킨 것을 정제 단백질로 하였다. 280nm의 흡광 계수를 1.37로 하여, 농도를 산출하였다.
- [0463] [실시예 6]
- [0464] 인간화 항체의 제작
- [0465] (1) 인간화 Lym2 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 설계
- [0466] (i) 인간화 Lym2 항체의 VL 및 VH의 아미노산 서열의 설계
- [0467] 인간화 Lym2 항체의 VL의 아미노산 서열을 이하와 같이 하여 설계하였다.
- [0468] 먼저 Lym2 항체의 VL의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열(서열 번호 23, 24, 25)의 이식에 적합한 인간 항체의 VL의 FR의 아미노산 서열을, 이하와 같이 하여 선택하였다.
- [0469] 기지의 인간 항체 중쇄 가변 영역 서열은 미국 국립 생물 공학 정보 센터(The National Center for Biotechnology Information)가 제공하는 BLASTP 데이터베이스에 의해, Lym2 항체의 VL의 FR 서열과 상동성이 높은 인간 항체 서열을 검색하였다. 그 결과, GeneBank ID: ABA71374.1이 가장 상동성이 높은 인간 항체 서열이었기 때문에, 이 항체의 FR을 선택하였다. 이상과 같이 하여 결정한 인간 항체 FR 서열의 적절한 위치에서 서열 번호 23, 24, 25로 표시되는 Lym2 항체의 VL의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 이식함으로써, LV0(서열 번호 33)을 설계하였다.
- [0470] 이어서, 인간화 Lym2 항체의 VH의 아미노산 서열을 이하와 같이 하여 설계하였다. Lym2 항체의 VH의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열(서열 번호 20, 21, 22)의 이식에 적합한 인간 항체 VH의 FR의 아미노산 서열을 이하와 같이 하여 선택하였다. VL과 동일하게 BLASTP 데이터베이스에 의해, Lym2의 VH의 FR 서열과 상동성이 높은 인간 항체 서열을 검색하였다.
- [0471] 그 결과, GeneBank ID: AAY33331.1이 가장 상동성이 높은 인간 항체 서열이었기 때문에, 이 항체의 FR을 선택하였다. 이상과 같이 하여 결정한 인간 항체 FR 서열의 적절한 위치에서 서열 번호 20, 21, 22로 표시되는 Lym2 항체의 VH의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 이식함으로써, HV0(서열 번호 49)을 설계하였다.
- [0472] 상기에서 설계한 인간화 Lym2 항체의 VL의 아미노산 서열 LV0, 및 VH의 아미노산 서열 HV0은, 선택한 인간 항체의 FR의 아미노산 서열에, 래트 모노클로날 항체인 Lym2 유래의 CDR의 아미노산 서열만을 이식한 서열이다. 그러나, 일반적으로, 인간화 항체를 제작하는 경우에는, 단순히 설치류 유래 항체의 CDR의 아미노산 서열을 인간 항체의 FR에 이식하는 것만으로는, 결합 활성이 저하되어버리는 경우가 많다.
- [0473] 이러한 결합 활성의 저하를 피하기 위해서, CDR의 아미노산 서열의 이식과 함께, 인간 항체와 설치류 항체에서 상이한 FR의 아미노산 잔기 중, 결합 활성에 영향을 준다고 생각되는 아미노산 잔기를 치환하는 것이 행해지고 있다. 그래서, 본 실시예에 있어서도, 결합 활성에 영향을 준다고 생각되는 FR의 아미노산 잔기를 이하와 같이 하여 동정하고, 치환하였다.
- [0474] 먼저, 상기에서 설계한 인간화 Lym2 항체의 VL의 아미노산 서열 LV0, 및 VH의 아미노산 서열 HV0으로부터 구성되는 항체 가변 영역(이하, LV0HV0이라 표기함)의 삼차원 구조를 컴퓨터 모델링 방법을 사용하여 구축하였다.
- [0475] 삼차원 구조 좌표 제작 및 삼차원 구조의 표시에는, 디스커버리 스튜디오(Discovery Studio)(악셀리스사)를 사용하였다. 또한, Lym2 항체의 가변 영역의 삼차원 구조의 컴퓨터 모델도 동일하게 하여 구축하였다. 또한, LV0HV0의 VL 및 VH의 FR의 아미노산 서열 중에서, Lym2 항체와 상이한 아미노산 잔기를 선택하고, Lym2 항체의 아미노산 잔기에 개변한 아미노산 서열을 제작하여, 동일하게 삼차원 구조 모델을 구축하였다. 이를 제작한

Lym2 항체, LVOHV0 및 개변체의 각 가변 영역의 삼차원 구조를 비교하고, 항체의 결합 활성에 영향을 줄 것으로 예측되는 아미노산 잔기를 동정하였다.

[0476] 그 결과, LVOHV0의 FR의 아미노산 잔기 중에서 항원 결합 부위의 삼차원 구조를 변화시켜, 항체의 결합 활성에 영향을 줄 것으로 생각되는 아미노산 잔기로서, LV0에서는, 서열 번호 33의 아미노산 서열의 2번째의 Ile, 4번째의 Met, 15번째의 Pro 및 85번째의 Ala를, HV0에서는, 서열 번호 49의 아미노산 서열의 18번째의 Leu, 77번째의 Asn, 93번째의 Val 및 117번째의 Thr을, 각각 선택하였다.

[0477] 이를 선택된 아미노산 잔기 중 적어도 1 이상의 아미노산 서열을 Lym2 항체의 동일한 부위에 존재하는 아미노산 잔기로 치환하는 아미노산 개변을 행하여, 각종 개변을 갖는 인간화 항체의 VL 및 VH를 설계하였다. 구체적으로는, VL에 대해서는, 서열 번호 33의 아미노산 서열의 2번째의 Ile을 Val로, 4번째의 Met를 Leu로, 15번째의 Pro를 Leu로, 또는 85번째의 Ala를 Pro로 치환하는 아미노산 개변 중 적어도 하나의 개변을 도입하였다. VH에 대해서는, 서열 번호 49의 아미노산 서열의 18번째의 Leu를 Met로, 77번째의 Asn을 Ser로, 93번째의 Val을 Thr로, 또는 117번째의 Thr을 Val로 치환하는 아미노산 개변 중 적어도 하나의 개변을 도입하였다.

[0478] LVOHV0 또는 LVOHV0의 FR에 존재하는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 개변한 인간화 Lym2 항체의 항체 가변 영역으로서, LVOHV0, LV1HV0, LV2aHV0, LV2bHV0, LV2cHV0, LV3aHV0, LV3bHV0, LV4HV0, LVOHV4, LV1HV4, LV2aHV4, LV2bHV4, LV2cHV4, LV3aHV4, LV3bHV4, LV4HV4, LVOHV1, LVOHV2a, LVOHV2b 및 LVOHV3을 각각 설계하였다.

[0479] 이후의 기술에 있어서는, 상술한 가변 영역을 포함하는 인간화 Lym2 항체를 각각 LVOHV0, LV1HV0, LV2aHV0, LV2bHV0, LV2cHV0, LV3aHV0, LV3bHV0, LV4HV0, LVOHV4, LV1HV4, LV2aHV4, LV2bHV4, LV2cHV4, LV3aHV4, LV3bHV4, LV4HV4, LVOHV1, LVOHV2a, LVOHV2b 및 LVOHV3이라 약기한다.

[0480] 경쇄 가변 영역 LVO(서열 번호 33), LV1(서열 번호 35), LV2a(서열 번호 37), LV2b(서열 번호 39), LV2c(서열 번호 41), LV3a(서열 번호 43), LV3b(서열 번호 45), LV4(서열 번호 47), 및 중쇄 가변 영역 HV0(서열 번호 49), HV1(서열 번호 51), HV2a(서열 번호 53), HV2b(서열 번호 55), HV3(서열 번호 57), HV4(서열 번호 59)의 아미노산 서열을 각각 도 1 및 도 2에 나타낸다.

[0481] (ii) 인간화 Lym2 항체의 가변 영역 유전자의 설계

[0482] 인간화 항체의 가변 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열은, 동물 세포에서 고빈도로 사용되는 코돈을 사용하여 설계하였다. 이를 염기 서열을 사용하여, 이하에 나타내는 인간화 Lym2 항체 발현 벡터의 구축 및 대응하는 항체의 발현을 행하였다.

[0483] (2) 인간화 Lym2 항체 발현 벡터의 구축

[0484] 실시예 5-(1)에 기재된 방법에 준하여, 인간화 Lym2 항체 발현 벡터를 구축하였다. 즉, 서열 번호 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57 및 59로 나타내는 아미노산 서열을 각각 코딩하는, 서열 번호 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 및 58로 나타내는 염기 서열의 DNA를 전체 합성하고, 서열 번호 28-31로 나타내는 프라이머에 의해, 대응하는 VL, VH 유전자 단편을 PCR에 의해 증폭시켰다. 유전자 단편은 아가로오스 겔 전기 영동을 행하고, 퀴아크 겔 추출 키트(QIAGEN사)에 의해 정제하였다.

[0485] 이 VL 또는 VH 단편을, 인-퓨전 HD 클로닝 키트(크론텍사)를 사용하여 첨부된 설명서에 따라서, 각각 인간 κ쇄 정상 영역 발현 벡터(BgIII/BsiWI 처리) 및 인간 중쇄(IgG1) 정상 영역 발현 벡터(SalI/NheI 처리)에 서브클로닝하였다. 제작한 벡터를 사용하여 대장균 DH5 α 적격 세포(다카라 바이오사)를 형질전환하여, 플라스미드 추출, 시퀀스 확인을 실시하고, 올바른 서열이 삽입된 콜로니를 선발하여, 일과성 발현을 위해 플라스미드 대량 조제를 행하였다.

[0486] (3) 인간화 Lym2 항체의 일과성 발현

[0487] 제작한 인간화 Lym2 항체의 일과성 발현은, 실시예 5-(2)에 기재된 프리스타일(상표) CHO 발현 배지(Lifetechnologies사)에 순화시킨 CHO 세포를 숙주로 하고, 프리스타일(상표) MAX CHO 발현 시스템(Expression System)(Lifetechnologies사)을 사용하여 행하였다. 플라스미드 도입의 방법은 첨부된 설명서에 따랐다. 경쇄 발현 벡터와 중쇄 발현 벡터는 1:2의 비율로 혼합하여 사용하였다.

[0488] 배양액량은 200mL로 행하고, 37°C, 8% CO₂, 125rpm의 설정 조건하에서, 5일간 배양하였다. 배양 후, 세포 혼탁액의 원심 분리를 행하고, 0.2μm 필터(Thermo Scientific사)를 통과시켜 인간화 Lym2 항체를 포함하는 배양

상청을 회수하였다.

[0489] (4) 인간화 Lym2 항체의 정제

[0490] 이하에 나타내는, MabSelect SuRe(GE Healthcare사)를 사용한 친화성 정제에 의해, 인간화 Lym2 항체를 정제하였다. 레진을 PBS로 평형화한 후, (3)에서 취득된 배양 상청을 로딩하고, PBS로 2회 세정하였다.

[0491] 세정 후, 용출 버퍼(20mM 시트르산, 50mM NaCl, pH 3.4)를 사용하여 항체를 용출시키고, 중화 버퍼(1M 인산-NaOH, pH 7.0)를 1/10량 첨가하여 중화시켰다. 계속해서 NAP25(GE Healthcare사)를 사용하여 PBS로 버퍼 치환을 행하였다. 아미콘 울트라-4 원심 필터 유닛(Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units)(밀리포어사)을 사용하여 한회 여과에 의한 농축을 행하고, 나노드롭8000(Nanodrop8000)(Thermo Scientific사)을 사용하여 280nm에 있어서의 흡광도(A_{280})를 측정하고, 항체 용액의 농도 측정 및 조제를 행하였다.

[0492] [실시예 7]

[0493] chLym2 및 인간화 Lym2 항체의 항원 결합 활성

[0494] FLAG 융합 인간 CRTH2 발현 3Y1-B 세포를 0.25% 트립신-EDTA(나카라이 테스크사)로 박리하고, PBS로 세정한 후, SM으로 혼탁시켰다. 이어서, 세포수를 1웰당 1×10^5 개가 되도록 96웰 플레이트에 파종하고, 50000, 12500, 3125, 781, 195, 49, 12 및 3ng/mL 각 최종 농도의 chLym2 또는 인간화 Lym2 항체를 첨가하고, 4°C에서 60분간의 반응을 행하였다.

[0495] 세포를 SM으로 세정한 후, SM으로 500배로 희석한 염소(Goat) F(ab')₂ 항-인간(Anti-Human) IgG PE(γ 쇄 특이적(γ chain specific))(Southern Biotech사)를 첨가하고, 4°C에서 60분간의 반응을 행하였다. SM으로 세포를 세정한 후, 세포를 50 μ L의 SM으로 재현탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 측정하였다.

[0496] 데이터는 FlowJo 7.65(토미 디지털 바이올로지사)에 의해 해석하고, 각 농도에 있어서의 기하평균(Geomean)값으로부터 로지스틱(Logistic) 곡선에 의한 커브 피팅을 행하고, 통계 해석 언어 R(Ver.3.02)을 사용하여 chLym2 및 각 인간화 Lym2 항체의 결합(50% 유효 농도(effective concentration)(EC50)값 및 그의 표준오차(standard error; SE)값을 산출하였다. 결과를 표 1에 나타낸다.

표 1

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

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

[0497]

[0498] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이, 각종 인간화 항체가 키메라 항체와 동등한 인간 CRTH2 반응성을 갖는 것이 시사되었다.

[0499] [실시예 8]

[0500] chLym2 및 인간화 Lym2 항체의 호산구, 호염기구에 대한 제거(depletion) 활성

[0501] 혜파린나트륨 주사액을 첨가하여 채취한 인간 말초혈을 4°C, 1500rpm, 30분간 원심 분리하고, 혈장을 회수하였다.

- [0502] 혈장을 회수한 후의 적혈구를 포함하는 펠릿에, PBS(나카라이 테스크사)를 가하여 원래의 혈액 용량으로 복귀시키고, 혼탁시킨 것 1mL에 대하여, 용혈용 용액[10×RBC 라이시스 버퍼(Lysis buffer)(e-bioscience사)]를 멸균 수로 10배로 회석한 것]을 10mL 첨가하여 전도 혼화하였다. 실온에서 10분간 방치한 후, 상온, 1500rpm, 5분간의 원심 분리를 행하고, 상청을 제거하고, PBS로 2회 세정하였다.
- [0503] 그 후, 세포 펠릿을, 회수한 혈장으로 혼탁시켜, 300 μ L/well로 48웰 플레이트에 과종하고, 1000, 100, 33, 11, 3.7, 1.2, 0.4 및 0.01ng/mL 각 최종 농도의 chLym2, 각 인간화 Lym2 항체 LVOHVO, LVOHV1, LVOHV2a 또는 아이소타입 컨트롤 항체[Clin Cancer Res 2005, 11(8), 3126-3135에 기재된 항 2,4-디니트로페놀(DNP) IgG1 항체를 코딩하는 백터를 사용하고, 실시예 5에 기재된 방법에 준하여 제작한 IgG1 항체(이하, 항 DNP IgG1 항체라 기재함)]를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서, 20시간 반응시켰다.
- [0504] 반응 후, 각 웰의 세포액을 회수하여, SM을 10mL 첨가하고, 컨트롤 비즈로서, 플로우 사이토메트리용 카운트 브라이트 절대 카운팅 비즈(Count Bright Absolute Counting Beads, for flow cytometry)(Molecular Probes사)를 200 μ L/샘플로 첨가한 후, 4°C, 2000rpm, 10분간의 원심 분리를 행하고, 상청을 제거하였다. SM으로 2회 세정하고, SM으로 회석한 10000 μ g/mL의 인간 혈청으로부터의 IgG(IgG from human serum)(시그마 알드리치사)를 300 μ L/샘플로 첨가하고, 혼탁시킨 후, 4°C, 30분간 반응시켰다.
- [0505] 그 후, 40 μ L/well로 96웰 플레이트에 과종하고, 호산구의 검출로서, PE 항-인간 Siglec-8 항체(PE anti-human Siglec-8 Antibody)(BioLegend사), 호염기구의 검출로서 PE-Cy7 마우스 항-인간 CD123(PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD123)(BD 바이오사이언스사) 및 항-인간 Fc 엡실론-수용체 I 알파(Anti-Human Fc epsilon Receptor I alpha)(Fc ϵ RI) APC(eBioscience사)를, 각각 5 μ L/well 첨가하고, 4°C, 40분간 반응시켰다.
- [0506] SM으로 2회 세정 후, 7-AAD 염색 용액(Staining Solution)(BD 바이오사이언스사)을 1% 함유한 SM으로 세포를 혼탁시키고, 4°C, 10분간 방치한 후, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사제, FACS CantoII)를 사용하여 해석하였다.
- [0507] 인간 호산구는, FSC-SSC 전개의 과립구 획분에 있어서의 7-AAD 음성 siglec8-PE 양성 획분으로서 검출하였다. 인간 호염기구는, FSC-SSC 전개의 림프구 획분에 있어서의 7-AAD 음성, CD123-PC-Cy7 양성, Fc ϵ RI-APC 양성 획분으로서 검출하였다. 세포 제거 활성은, 일정수의 카운트브라이트(CountBright)의 카운트(count)수당 각각의 세포의 카운트수를 해석함으로써 평가하였다.
- [0508] 그 결과, 도 3의 (A) 내지 도 3의 (C)에 나타낸 바와 같이, 평가한 인간화 Lym2 항체 LVOHVO, LVOHV1 및 LVOHV2a는 모두, 키메라 Lym2 항체 chLym2와 동등한 호산구 및 호염기구에 대한 세포 상해 활성을 나타내는 것이 명확해졌다.
- [0509] [실시예 9]
- [0510] 비교 대조용 항 인간 CRTH2 항체의 제작
- [0511] (1) 비교 대조용 항 인간 CRTH2 항체 발현 백터의 제작
- [0512] 국제 공개 제2014/144865호 기재된 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체 hu19A2 v52, hu8B1 v1, mu8B1, mu3C12 및 mu31A5의 VH 및 VL의 아미노산 서열(각각, 국제 공개 제2014/144865호 내에서는 SEQ ID NOS: 57 및 40, 64 및 52, 62 및 50, 63 및 51, 및 65 및 53으로 표시됨)을 코딩하는 염기 서열을, 전체 합성하였다.
- [0513] 실시예 5-(1)에 기재된 방법에 준하여, 각각의 항체의 VH 및 VL의 조합이 되도록, 상기 염기 서열을 항체 발현 백터에 편입하여, 5종의 비교 대조용 인간화 또는 키메라 항 인간 CRTH2 항체(각각 hu19A2 v52, hu8B1 v1, ch8B1, ch3C12 및 ch31A5) 발현 백터를 각각 제작하였다.
- [0514] (2) 비교 대조용 항 인간 CRTH2 항체의 일과성 발현 세포의 제작 및 항체의 정제
- [0515] 실시예 5-(2) 및 (3)에 기재된 방법에 준하여, hu19A2 v52, hu8B1 v1, ch8B1, ch3C12 또는 ch31A5의 항체 발현 백터를 숙주 세포에 일과성 발현시키고, 배양 상청으로부터 각각의 항체의 정제를 행하였다.
- [0516] [실시예 10]
- [0517] 인간 CRTH2 아미노산 치환체 발현 세포를 사용한, 항 인간 CRTH2 모노클로날 항체의 에피토프 해석
- [0518] (1) 인간 CRTH2 아미노산 치환체 발현 백터의 제작

- [0519] 인간 CTRH2의 아미노산 서열 중, 세포 외 영역의 아미노산 잔기를 부분적으로 별도의 아미노산 잔기로 치환한 아미노산 치환체의 발현 벡터를 제작하였다. 구체적으로는, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열에 S2A; N4A; T6A 및 L7A; K8A, P9A 및 L10A; P12A, L14A 및 E15A; Q16E, R19H 및 Q21R; H23A, S24A 및 N25A; T26A, S27A 및 I28A; D171A, T172A 및 I173A; S174A, R175A 및 L176A; D177A, G178A 및 R179A; I180A 및 M181A; Y183A, Y184A 및 N185A; L187A, L188A 및 L189A; N190A; P191A; G192A; P193A; D194A; R195A; D196A 및 T198A; N275A, G277A 및 L278A; P276A; P279A 및 L281A; P280A; 또는 V282A, R283A 및 R284A의 치환을 행한 아미노산 치환체를 발현하는 벡터를 각각 제작하였다. 또한, 상기 아미노산 치환 기호는 [치환 전의 아미노산 잔기의 1 문자 표기][N 말단으로부터 센 치환 위치][치환 후의 아미노산 잔기의 1 문자 표기]를 나타낸다.
- [0520] 발현 벡터로서는, phmAG1-MNLinker(MBL사)를 사용하고, BamHI 및 HindIII의 제한효소 사이트에 종시 코돈을 결실시킨 각종 아미노산 치환체를 코딩하는 유전자를 삽입함으로써, 세포 내 C 말단 영역에 아자미 그린의 태그가 부가되도록 하였다.
- [0521] 상기 아미노산 치환체를 발현하는 벡터는, 1) 아미노산 치환체를 코딩하는 유전자 서열을 전체 합성하고, 벡터에 삽입하는 방법, 또는 2) 서열 번호 1로 나타내는 야생형 인간 CTRH2 아미노산 서열을 코딩하는 DNA가 삽입된 벡터로부터, 부위 특이적 변이 도입을 행함으로써 제작하였다.
- [0522] (2) 인간 CTRH2 아미노산 치환체 일과성 발현 세포의 조성
- [0523] 인간 CTRH2 아미노산 치환체의 발현 세포주의 조제에는, CHO-S 세포(LifeTechnologies사)를 사용하였다. 세포의 계대에는 8mM L-글루타민(invitrogen사)을 포함하는 프리 스타일 CHO 발현 배지(invitrogen사)를 사용하고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 진탕 배양하였다.
- [0524] (1)에서 제작된 25 μg의 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 벡터를 400 μL의 Opti-Pro SFM(invitrogen사)에, 또한 25 μL의 프리스타일 MAX 시약(invitrogen사)을 400 μL의 Opti-Pro SFM에 각각 용해시키고, 실온에서 5분간 방치하였다. 상기 2액을 혼합하여, 실온에서 15분간 방치하였다. 해당 혼합 용액을 상기 CHO-S 배양액에 첨가하여, 24시간 배양함으로써 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 세포주를 얻었다.
- [0525] (3) 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 세포를 사용한, 쥐두 항체의 반응성 해석
- [0526] (2)에서 수립된 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 CHO-S 세포를, SM으로 세정한 후, 1웰당 2×10⁵ cells가 되도록 96웰 플레이트에 파종하고, 1700rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다. 상청을 제거한 후, SM으로 10 μg/mL가 되도록 조제한 chLym2, LVOHV1, 실시예 9에서 제작된 항 인간 CTRH2 항체 hu19A2 v52, hu8B1 v1, ch3C12 또는 ch31A5, 또는 시판 래트 항 인간 CTRH2 항체 BM16(santa cruz사)을 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다.
- [0527] 세포를 세정한 후, chLym2, LVOHV1, hu19A2 v52, hu8B1 v1, ch3C12 또는 ch31A5가 첨가된 웰에는 SM으로 희석한 염소 항-인간 IgG alexa647(Molecular Probes사)을, BM16이 첨가된 웰에는 SM으로 희석한 염소 항-래트 IgG alexa647(Molecular Probes사)을 각각 최종 농도 10 μg/mL로 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다.
- [0528] 반응 후, 세포를 세정하고, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다. 해석에 대해서는, 전체 세포로부터 아자미 그린의 양성 세포를 게이팅(gating)하고, 그 집단에 있어서의 각 항체의 반응성을 해석하였다.
- [0529] 또한, 각 변이체 간에서의 발현 레벨을 보정하기 위해서, 각 항체의 결합에 의한 Alexa647의 형광 강도를, C 말단 영역에 부가한 아자미 그린의 형광 강도로 나누어 상대적 형광 강도를 산출하고, 각 항체의 반응성으로 하였다. 그리고, 야생형 인간 CTRH2 발현 세포에 대한 각 항체의 형광 강도를 100%로 했을 때의, 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 상대적 형광 강도를, 각 항체에 대하여 해석하였다.
- [0530] 그 결과, 도 4 내지 도 7에 나타낸 바와 같이, 인간화 Lym2 항체 LVOHV1은, P12A, L14A 및 E15A; D177A, G178A 및 R179A; I180A 및 M181A; Y183A, Y184A 및 N185A; L187A, L188A 및 L189A; G192A; D194A; R195A; 또는 D196A 및 T198A의 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성이 소실되는 것이 명백해졌다.
- [0531] 또한, 키메라 Lym2 항체 chLym2는, 부가적으로, D171A, T172A 및 I173A의 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성이 소실되는 것이 명백해졌다. 인간화 Lym2 항체 LVOHV1의 D171A, T172A 및 I173A를 포함하는 인간 CTRH2 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성은, 대폭 저하되어 있는 점에서, LV1HV0 및 cLym2는 모두 동일한 에피토프에 결합되어 있음이 시사되었다.

- [0532] 한편, 금회 비교한 다른 항 인간 CRTH2 항체는, 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체와는 다른 부위의 인간 CRTH2 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성이 현저하게 저하되어 있었던 점에서, 기존의 다른 항 인간 CRTH2 항체는, 본원 발명의 항체와는 다른 에피토프를 인식하고 있음이 명백해졌다.
- [0533] 또한, 각 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성을 상세하게 확인한 결과, 기존의 항 인간 CRTH2 항체는 모두 G192A 또는 D194A를 포함하는 아미노산 치환체 발현 세포에 대한 반응성은 저하되지 않고, 본원 발명의 항체만이, 해당 세포에 대한 반응성이 저하된 점에서, 본원 발명의 항 인간 CRTH2 항체는, 인간 CRTH2의 G1y192 및 Asp194 중 적어도 하나의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는 것이 명백해졌다.
- [0534] [실시예 11]
- [0535] 인간 호산구에 대한 반응성 평가
- [0536] 혜파린나트륨 주사액을 첨가하여 채취한 인간 말초혈에 대하여, 등량의 주사용 생리 식염수를 첨가하고, 혼화하였다. 50mL 용량의 원침관에 피콜-파크(Ficoll-Paque) PREMIUM1.084(GE 헬스케어사)를 15mL 첨가하고, 생리 식염수로 희석한 상기 인간 말초혈을 30mL 중충하고, 실온, 1500rpm으로 30분간 원심 분리를 행하였다.
- [0537] 원심 분리 후, 혈장층, 단핵구층 및 피콜(Ficoll)층의 절반량을 아스피레이터로 제거하고, 그리고 원심간의 벽면에 부착되어 있는 혈소판을 멸균된 면봉을 사용하여 제거하였다. 그 후, 멸균된 냉장수 27mL를 각 튜브에 분주하여 30초간 용혈시켰다.
- [0538] 그 후, 냉장시킨 10×PIPES 완충액[500mL의 중류수에, 32.15g의 염화나트륨(와코 준야쿠사), 1.85g의 염화칼륨(나카라이 테스크사), 38g의 PIPES(피페라진-1,4-비스(2-에탄솔폰산, 나카라이 테스크사), 8.4g의 수산화나트륨(나카라이 테스크사)을 용해시킨 것]을 3mL 첨가하여 등장으로 복귀시키고, 4℃, 1200rpm, 5분간 원심 분리하였다. 원심 분리 종료 후, 상청을 흡인하고, 2mL의 1×PIPES 완충액[중류수를 사용하여 10×PIPES 완충액을 10배로 희석한 용액]을 첨가하여 세포 펠릿을 풀었다.
- [0539] 다시 상기 용혈 조작을 반복하여, 얻어진 세포 펠릿을, 오토MACS 린스 용액(autoMACS Rinsing Solution)(밀테니 바이오텍사)에 MACS BSA 원액(Stock Solution)(밀테니 바이오텍사)을 첨가한 것(이하, MACS 버퍼라 약기함)을 사용하여 2회 세정하였다.
- [0540] 세포수를 카운트한 후, CD16 마이크로비즈(MicroBeads), 인간(human)(밀테니 바이오텍사)을 사용하여, 첨부된 설명서에 따라서 호산구를 네거티브 셀렉션법에 의해 단리하였다.
- [0541] 단리된 세포를 SM으로 세정한 후, 1웰당 1×10^5 cells가 되도록 96웰 플레이트에 퍼트하고, 2000rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다. 상청을 제거한 후, SM으로 희석한, 10, 3.3, 1.1, 0.37 및 $0.12 \mu\text{g/mL}$ 각 최종 농도의 Lym2 항체, 시판 CRTH2 항체의 BM16(santa cruz사) 또는 301108(R&D사)을 첨가하고, 4℃에서 1시간의 반응을 행하였다.
- [0542] 세포를 세정한 후, Lym2 항체 또는 BM16이 첨가된 웰에는, SM으로 희석한 CELL LAB 마우스 항-래트 카파(Mouse Anti-Rat Kappa)(카파 경쇄 특이적(kappa light chain specific)) FITC(베크만 쿨터사)를, 301108이 첨가된 웰에는, SM으로 희석한 CELL LAB 염소 항-마우스(Anti-Mouse) IgG(γ 쇄 특이적) 플루오레세인(FITC) 컨쥬게이트(베크만 쿨터사)를 각각 최종 농도 $10 \mu\text{g/mL}$ 로 첨가하고, 4℃에서 1시간의 반응을 행하였다. 다시 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사제, FACS CantoII)로 해석하였다.
- [0543] 그 결과, 래트 항 인간 CRTH2 항체 Lym2는 인간 호산구에 대하여, 시판되고 있는 래트 항 인간 CRTH2 항체 BM16 및 마우스 항 인간 CRTH2 항체 301108보다도 강한 반응성을 나타내는 것이 명백해졌다(도 8).
- [0544] [실시예 12]
- [0545] 인간 호염기구에 대한 chLym2의 반응성
- [0546] 혜파린나트륨 주사액을 첨가하여 채취한 인간 말초혈에 대하여, 등량의 주사용 생리 식염수를 첨가하고, 혼화하였다. 50mL 용량의 원침관에 피콜-파크 PREMIUM 1.084(GE 헬스케어사)를 15mL 첨가하고, 생리 식염수로 희석한 인간 말초혈을 30mL 중충하고, 실온, 1500rpm으로 30분간 원심 분리를 행하였다.
- [0547] 원심 분리 후, 단핵구층을 퍼펫으로 회수하고, MACS 버퍼를 사용하여 2회 세정하였다. 세포수를 카운트한 후, 바소필 단리 키트 II, 인간(Basophil Isolation Kit II, human)(밀테니 바이오텍사제)을 사용하여, 첨부된 설

명서에 따라서 호염기구를 네거티브 셀렉션법에 의해 단리하였다.

[0548] 단리된 세포를 SM으로 세정한 후, 1웰당 5×10^4 cells가 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, 2000rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다. 상청을 제거한 후, 100 μ L의 SM으로 세포를 혼탁시키고, 제논 알렉사 플루오르 647 인간 IgG 라벨링 키트(Zenon Alexa Fluor 647 Human IgG Labeling Kit)(Molecular Probes사제)를 사용하여 첨부된 설명서에 따라서 표지를 행한, chLym2 또는 실시예 8에 기재된 아이소타입 컨트롤 항체를, 최종 농도 10 μ g/mL가 되도록 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다. 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다.

[0549] 그 결과, 인간 호염기구에 대하여, chLym2의 반응성이 확인되었다(도 9). 따라서, 본원 발명의 키메라 항 인간 CRTH2 항체 cLym2는, 호염기구에 결합하는 것이 명백해졌다.

[0550] [실시예 13]

[0551] 인간 CD4 양성 T세포에 대한 인간화 Lym2 항체의 반응성

[0552] 실시예 12에 준하여, 피콜-파크 PREMIUM 1.084 대신에 피콜-파크 PREMIUM(GE 헬스케어사)을 사용하여 조제한 단핵구층의 세포 혼탁액을 100 μ L/well로 96웰 플레이트에 과종하고, EZ-링크 술포-NHS-LC-비오틴, 노-웨이 포맷(EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh Format)(PIERCE사)을 사용하여 첨부된 설명서에 따라서 비오틴 표지한 인간화 Lym2 항체 LVOHV1을 최종 농도 10 μ g/mL가 되도록 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다.

[0553] 세포를 세정한 후, SM으로 희석한 최종 농도 10 μ g/mL 스트렙타비딘(streptavidin), 및 첨부된 설명서에 기재된 양의 알렉사 플루오르 647 컨쥬케이트(Molecular Probes사), FITC 항-인간 CD3 항체(바이오 레전드사) 및 CD4 항체, 클론 SK3, PE-컨쥬케이트(stem cell technology사)를 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다.

[0554] 다시 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다. 해석은, FSC-SSC 전개에 의해 램프구를 분획하고, 또한 CD3 양성 또한 CD4 양성 세포로 분획된 세포군에 대하여, 인간화 Lym2 항체 LVOHV1에 의한 형광 염색의 형광 강도를 종축에, CD4 항체에 의한 형광 염색의 형광 강도를 횡축에 나타냄으로써, CD3 양성 CD4 양성 세포에 있어서의 인간화 Lym2 항체 LVOHV1의 반응성 획분의 비율을 산출하였다. 그 결과, CD3 양성 CD4 양성의 T세포 획분의 약 2 내지 3%로 인간화 Lym2 항체 LVOHV1이 반응하였다(도 10).

[0555] [실시예 14]

[0556] 호산구, 호염기구에 대한 세포 상해 활성

[0557] 실시예 8과 동일하게 하여 조제한 세포 혼탁액을, 95 μ L/well로 96웰 플레이트에 과종하고, 1000, 10, 3, 1, 0.3, 0.1ng/mL 각 최종 농도의 피검 항체를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20시간 반응시켰다. 피검 항체로서는, 인간화 Lym2 항체 LVOHV1, 실시예 9에서 제작된 항 인간 CRTH2 항체 hu19A2 v52, hu8B1 v1, ch3C12 및 ch31A5를 사용하였다. 아이소타입 컨트롤 항체로서는 항 DNP IgG1 항체를 사용하였다.

[0558] 반응 후의 각 웰에 SM을 100 μ L/well로 첨가하고, 컨트롤 비즈로서, 플로우 사이토메트리용 카운트 브라이트 절대 카운팅 비즈(Molecular Probes사)를 20 μ L/well로 첨가하고, 4°C, 2000rpm, 2분간의 원심 분리를 행하고, 상청을 제거하였다. SM으로 2회 세정하고, SM으로 희석한 10000 μ g/mL의 인간 혈청으로부터의 IgG(시그마 알드리치사)를 100 μ L/well로 첨가하고, 4°C, 30분간 반응시켰다. 이후는, 실시예 8과 동일한 방법으로 행하였다.

[0559] 그 결과, 인간화 항 인간 CRTH2 항체 LVOHV1은, 항체 농도 의존적으로 호산구 및 호염기구의 어느 세포도 제거하였다. 기존의 항 인간 CRTH2 항체 ch3C12는, 인간화 항 인간 CRTH2 항체 LVOHV1과 비교하여 세포를 제거하는 활성이 약하였다[도 11의 (A) 및 도 11의 (B)]. 따라서, 본원 발명의 항 인간 CRTH2 항체는, CRTH2가 발현하는 호산구 또는 호염기구를 표적으로 한 치료 효과를 발휘할 수 있음이 시사된다.

[0560] [실시예 15]

[0561] Th2 세포에 대한 세포 상해 활성

[0562] 실시예 13과 동일하게 하여 조제한 단핵구층을, 1/10volume FBS(Gibco사), 200mM-L-글루타민 원액(Stock Solution)(나카라이 테스크사), 10mM MEM 비필수 아미노산 용액(Non-Essential Amino Acids Solution)(Gibco사), 100mM 피루브산나트륨(Gibco사), 1M HEPES 베퍼 용액(Gibco사) 및 1/100volume 페니실린-스트렙토마이신, 액체(Gibco사)를 첨가한 RPMI1640(와코 춘야쿠사)[이하, PBMC(말초 혈액 단핵 세포(peripheral

blood mononuclear cell)) 배양 배지라 기재함]으로 2회 세정하고, 1×10^7 cells/mL 세포 혼탁액을 조제하였다.

[0563] 조제한 세포 혼탁액을 100 μ L/well로 96웰 플레이트에 과종하고, chLym2 항체, 인간화 항 인간 CRTH2 항체 LVOHV1 또는 실시예 8에 기재된 아이소타입 컨트롤 항체를 최종 농도 10 μ g/mL 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20시간 반응시켰다.

[0564] 반응 후의 세포를 PBMC 배양 배지로 7회 세정하고, 피검 항체를 충분히 제거한 후, 100 μ L의 PBMC 배양 배지에 혼탁시키고, 항 CD3 항체 OKT3(Abcam사)을 1 μ g/mL의 농도로 고상화한 플레이트에 과종하였다. 그 후, 2 μ g/mL로 조제한 항 CD28 항체(BD 바이오사이언스사)를 100 μ L/well로 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 3일간 반응시켰다.

[0565] 반응 후의 상청을 회수하고, 인간 IFN- γ 플렉스 세트(Flex Set)(BD 바이오사이언스사), 인간 IL-5 플렉스 세트(BD 바이오사이언스사), 인간 IL-13 플렉스 세트(BD 바이오사이언스사)를 사용하여, 첨부된 설명서에 따라서 상청 중 사이토카인의 정량을 행하였다.

[0566] 그 결과, 키메라 항 인간 CRTH2 항체 chLym2 및 인간화 항 인간 CRTH2 항체 LVOHV1은, Th2 사이토카인인 IL-5 및 IL-13의 산생을 감소시켰지만, 한편, Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 산생은 변화시키지 않았다. 즉, 본 발명의 항체는 Th2 세포를 선택적으로 제거한 것이 시사되었다[도 12의 (A) 및 도 12의 (B)]. 따라서, 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체는, Th2 세포를 표적으로 한 치료 효과를 발휘할 수 있음이 시사되었다.

[0567] [실시예 16]

[0568] 리간드 존재 하에 있어서의 반응성 평가(293EBNA)

[0569] 실시예 1-(1)-(ii)에서 제작한 인간 CRTH2 유전자 발현 pAMoh 벡터를, 퓨진6(프로메가사)을 사용하여 293EBNA 세포(invitrogen사)에 도입하고, 10% FBS, 0.25mg/mL G418(나카라이 테스크사), 100 μ g/mL 페니실린, 100U/mL 스트렙토마이신(나카라이 테스크사) 및 300 μ g/mL 하이그로마이신 B(와코 줌야쿠사) DMEM을 포함하는 배지에서 약제 내성 세포를 선택하고, 인간 CRTH2 발현 293EBNA 세포를 수립하였다.

[0570] 인간 CRTH2 발현 293EBNA 세포를 0.02% EDTA 용액(나카라이 테스크사)으로 박리하고, PBS로 세정한 후, 상기 배지로 혼탁시켰다. 이어서, 1×10^5 cells/90 μ L/well이 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, DKPGD2(Cayman chemical사)를 최종 농도 10 μ M이 되도록 첨가하였다.

[0571] 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 15분간 방치한 후, 0.3, 1 및 3 μ g/mL 각 최종 농도의 인간화 Lym2 항체 LVOHV1, 공지된 항 인간 CRTH2 항체 hu19A2 v52, hu8B1 v1, ch3C12, ch31A5, BM16(santa cruz사) 또는 301108(R&D사)을 첨가하고, 상온에서 30분간의 반응을 행하였다.

[0572] 세포를 SM으로 5회 세정한 후, LVOHV1, hu19A2 v52, hu8B1 v1, ch3C12 또는 ch31A5가 첨가된 웰에는 SM으로 희석한 10 μ g/mL 염소 항-인간 IgG Alexa647(Molecular Probes사)을, BM16이 첨가된 웰에는 SM으로 희석한 10 μ g/mL 염소 항-래트 IgG Alexa647(Molecular Probes사)을, 301108이 첨가된 웰에는, SM으로 희석한 10 μ g/mL 염소 항-마우스 IgG Alexa647(Molecular Probes사)을 각각 최종 농도 10 μ g/mL로 첨가하고, 4°C, 40분간의 반응을 행하였다. 다시 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다.

[0573] 그 결과, 도 13의 (A) 내지 (C)에 나타낸 바와 같이, 기존의 항 인간 CRTH2 항체는, 모두 인간 CRTH2 리간드인 DKPGD2 존재 하에서, 인간 CRTH2 발현 세포에 대한 결합이 저하된 것에 비해, 인간화 Lym2 항체 LVOHV1은, 검토한 어느 항체 농도에 있어서도, 인간 CRTH2 발현 세포에 대한 결합은 거의 저하되지 않았다.

[0574] 즉, 본 발명의 항체는, 고농도의 리간드 존재 하에서도 높은 반응성을 갖는 것이 명백해졌다. 따라서, 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체는, 리간드 존재 하에서도 인간 CRTH2 발현 세포에 대하여 리간드 비존재 하에서의 반응성과 동등하게 결합할 수 있어, 해당 인간 CRTH2 발현 세포에 작용할 수 있는 유용한 항체임이 시사되었다.

[0575] [실시예 17]

[0576] 분화 유도 인간 비만 세포에 대한 반응성 해석

[0577] Nature Protocols 2006, 1(4), 2178-2183에 기재된 방법에 준하여 비만 세포를 조제하였다. 분화 유도 개시로부터 11주 시점의 비만 세포를 SM으로 세정하고, 1웰당 5×10^4 cells가 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, PE 항

-인간 CD203c(E-NPP3) 항체(BioLegend사제), 브릴리언트 바이올렛(Brilliant Violet) 421(상표) 항-인간 CD117(c-kit) 항체(BioLegend사제), 항-인간 Fc 엡실론-수용체 I 알파(Fc ε RI) PE(eBioscience사제)를 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다. 세포를 세정한 후, SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사제, FACS CantoII)로 해석하였다.

[0578] 그 결과, 분화 유도를 행한 비만 세포는, 비만 세포 표면 마커인 CD203c, CD117, Fc ε RI를 모두 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0579] 분화 유도 개시로부터 15주간 시점의 비만 세포 배양액에, 항 DNP IgG1 항체의 정상 영역을 IgE형으로 재조합한 인간 IgE를 최종 농도 10 μg/mL로 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 3일간 반응시켰다.

[0580] 반응 후의 비만 세포를 최종 농도 100 μg/mL 페니실린, 100U/mL 스트렙토마이신(나카라이 테스크사) 및 55 μM β-ME(Gibco사)를 첨가한 IMDM(Gibco사)(이하, 기본 배양 배지(basic culture medium)라 약기함)로 2회 세정하고, 4mL의 기본 배양 배지로 혼탁시키고, 최종 농도 10 μg/mL 토끼 폴리클로날 항-인간 IgE 항체(Dako사)를 첨가하고, MACS 믹스 투브 로테이터(mix tube rotator)(밀테니 바이오텍사)를 사용하여 회전시키면서 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 반응시켰다.

[0581] 반응 후의 세포를 SM으로 2회 세정하고, 1웰당 5×10⁴개가 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, 2000rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다. 상청을 제거한 후, SM으로 희석한 10000 μg/mL의 인간 혈청으로부터의 IgG(시그마 알드리치사)를 100 μL/well로 첨가하고, 4°C, 30분간 반응시켜, EZ-링크 슬포-NHS-LC-비오틴, 노-웨이 포맷(PIERCE사)을 사용하여 첨부된 설명서에 따라서, 각각 비오틴 표지한 인간화 항 인간 CRTH2 항체 LVOHV1, 항 인간 CRTH2 항체 hu19A2 v52, ch8B1, ch3C12 또는 ch31A5, 또는 미표지의 시판되고 있는 항 인간 CRTH2 항체 BM16(santa cruz사) 또는 301108(R&D사)을 최종 농도 10 μg/mL로 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다.

[0582] 또한, 아이소타입 컨트롤 항체로서, BM16에 대해서는 정제된 래트(Purified Rat) IgG2a, κ 아이소타입(Isotype) Ctrl1 항체(BioLegend사)를 301108에 대해서는 네거티브 컨트롤 마우스(Negative Control Mouse) IgG2a(Dako사)를, 그 이외의 항체에 대해서는 항 DNP IgG1 항체를, 각각 사용하였다.

[0583] 세포를 세정한 후, 비오틴 표지한 LVOHV1, hu19A2 v52, ch8B1, ch3C12 또는 ch31A5를 첨가한 웰에는 SM으로 희석한 스트렙타비딘, 알렉사 플루오르 647 컨쥬케이트(Molecular Probes사)를, BM16을 첨가한 웰에는 SM으로 희석한 염소 항-래트 IgG Alexa647(Molecular Probes사)을, 301108을 첨가한 웰에는 SM으로 희석한 염소 항-마우스 IgG Alexa647(Molecular Probes사)를 최종 농도 10 μg/mL로 첨가하고, 4°C, 40분간의 반응을 행하였다. 다시 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다.

[0584] 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, hu19A2 v52가 비만 세포에 대하여 반응성을 나타내는 한편, LVOHV1을 포함하는 hu19A2 v52 이외의 항체는 반응성을 나타내지 않았다.

[0585] [실시예 18]

[0586] 분화 유도 Th1에 대한 반응성 해석

[0587] (1) PBMC로부터의 나이브 T세포의 분리

[0588] 건강인 유래 동결 PBMC(Allcells사)를, RNase가 없는 DNase I 재조합체(DNase I recombinant, RNase-free)(Roche Diagnostics사)를 50 μL 함유한 20mL의 PBMC 배양 배지로 1회 세정하고, 다시 RNase가 없는 DNase I 재조합체를 50 μL 함유한 20mL의 PBMC 배양 배지에 혼탁시키고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 방치하였다.

[0589] 그 후, 실시예 11에 기재된 MACS 버퍼로 2회 세정하고, 나이브(Naive) CD4⁺ T세포 단리 키트 II 인간(T Cell Isolation Kit II human)(밀테니 바이오텍사)을 사용하여, 첨부된 설명서에 따라서 나이브 CD4 양성 T세포를 네거티브 셀렉션법에 의해 단리하였다. 나이브 CD4 양성 T세포의 순도를 높이기 위해서, 상기 네거티브 셀렉션을 2회 실시하였다.

[0590] (2) 나이브 CD4 양성 T세포로부터의 Th1 세포의 분화 유도

[0591] J Immunol, 2002. 169(5): p. 2498-2506에 기재된 방법에 준하여 분리한 나이브 CD4 양성 T세포를, 10%

FBS(Gibco사) 및 2mM 글루탐산(나카라이 테스크사)을 첨가한 RPMI1640(Gibco사)(이하, 배양 배지라 약기함)으로 1×10^6 cells/mL로 혼탁시키고, 자극 공정으로서, 항 CD3 항체 OKT3(Abcam사)을 1 μ g/mL의 농도로 고상화한 플레이트에 과종하고, 최종 농도 2 μ g/mL 항 CD28 항체(BD 바이오사이언스사), 100ng/mL 재조합체 인간 IL-12(peprotech사), 10ng/mL 재조합체 인간 IL-2(peprotech사) 및 5 μ g/mL 항 IL-4 항체(BD 바이오사이언스사)를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 4일간 반응시켰다.

[0592] 그 후, 세포를 회수하고, 원심 분리에 의해 상청을 제거한 후, 배양 배지로 1×10^6 cells/mL로 혼탁시키고, 증식 공정으로서, 최종 농도 100ng/mL 재조합체 인간 IL-12(peprotech사), 10ng/mL 재조합체 인간 IL-2(peprotech사) 및 5 μ g/mL 항 IL-4 항체(BD 바이오사이언스사)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 3일간 반응시켰다.

[0593] 상기 자극, 증식 공정을 합계 3회 반복함으로써, 분화 유도 Th1 세포를 수립하였다.

[0594] (3) 분화 유도 Th1 세포로부터의 사이토카인 산생 해석

[0595] (2)의 분화 유도 Th1 세포 배양액에, 최종 농도 20ng/mL의 포르볼(Phorbol) 12-미리스테이트(시그마 알드리치사), 1 μ g/mL의 스트렙토미세스로부터의 이오노마이신 칼슘염(Ionomycin calcium salt from Streptomyces)(시그마 알드리치사) 및 10 μ g/mL의 펜니실리움 브레펠디아눔으로부터의 브레펠드(Brefeld in A from Penicillium brefeldianum)(시그마 알드리치사)를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 6시간 반응시켰다. 그 후, 2×10^5 cells/well로 96웰 플레이트에 과종하고, PBS(나카라이 테스크사)로 세정하였다.

[0596] 그 후, 405nm 여기용 LIVE/DEAD 고정성 아쿠아 사멸 세포 염색 키트(LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405nm excitation)(Molecular Probes사)를 사용하여 첨부된 설명서에 따라서 사세포를 염색하고, PBS로 2회 세정한 후, 상청을 제거하고, 고정화 버퍼(Fixation Buffer)(BD 바이오사이언스사)를 사용하여 4°C, 45분간 반응시켰다.

[0597] 반응 후, PBS로 1회, 1×Perm/세정 버퍼(Wash Buffer)(BD 바이오사이언스사)로 2회 세정한 후, 최종 농도 2.5 μ L의 PE 항-인간 IFN- γ 항체(BioLegend사), 5 μ L의 APC 항-인간 IL-4 항체(BioLegend사), 10 μ L의 anti-IL-5 항체 APC(밀테니 바이오텍사) 및 20 μ L의 APC 항-인간 IL-13 항체(BioLegend사)를 첨가하고, 4°C에서 30분간 반응시켰다.

[0598] 그 후, 1×Perm/세정 버퍼로 2회 세정하고, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다.

[0599] 그 결과, 분화 유도 Th1은, IL-4/5/13이 음성이며, 90%가 IFN γ 양성의 집단(population)인 것이 확인되어, Th1 사이토카인을 선택적으로 생산하는 세포인 것을 확인할 수 있었다.

[0600] (4) 분화 유도 Th1 세포에 대한 항 인간 CRTH2 항체의 반응성 해석

[0601] (2)에 있어서 수립된 분화 유도 Th1 세포를 SM으로 세정한 후, 1웰당 5×10^4 cells가 되도록 96웰 플레이트에 과종하고, 2000rpm으로 2분간의 원심 분리를 행하였다. 상청을 제거한 후, SM으로 희석한 10 μ g/mL 래트 항 인간 CRTH2 항체 Lym2, 공지된 항 인간 CRTH2 항체 BM16(santa cruz사) 또는 301108(R&D사)을 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다.

[0602] 아이소타입 컨트롤 항체로서, Lym2에 대해서는 래트 IgG2b, 카파 모노클로날 [RTK4530]-BSA/아지드 무(Azide free)(abcam사)를, BM16에 대해서는 정제된 래트 IgG2a, κ 아이소타입 Ctrl 항체(BioLegend사)를, 301108에 대해서는 네거티브 컨트롤 마우스 IgG2a(Dako사)를, 각각 사용하였다.

[0603] 세포를 세정한 후, Lym2 항체 또는 BM16을 첨가한 웰에는 SM으로 희석한 10 μ g/mL CELL LAB 마우스 항-래트 카파(카파 경쇄 특이적) FITC(베크만 쿨터사)를, 301108을 첨가한 웰에는, SM으로 희석한 10 μ g/mL CELL LAB 염소 항-마우스 IgG(γ 쇄 특이적) 플루오레세인(FITC) 컨쥬게이트(베크만 쿨터사)를 최종 농도 10 μ g/mL로 각각 첨가하고, 4°C에서 1시간의 반응을 행하였다. 다시 세포를 세정한 후, 세포를 SM으로 혼탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 해석하였다.

[0604] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 래트 항 인간 CRTH2 항체 Lym2 및 시판되는 래트 항 인간 CRTH2 항체 BM16은 분화 유도 Th1에는 반응성을 나타내지 않았다. 한편, 시판되고 있는 마우스 항 인간 CRTH2 항체 301108은

분화 유도 Th1에 대하여 반응성을 나타냈다.

[0605] 따라서, 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체는, 호산구, 호염기구 및 Th2 세포에는 반응하지만, Th1 세포에는 반응하지 않는 것이 명백해졌다. 또한, 301108은, CRTH2를 발현하는 세포 이외에도 비특이적으로 반응성을 나타내는 것이 명백해졌다.

[0606] [실시예 19]

[0607] 인간 호산구의 형태 변화를 지표로 한, Lym2 항체의 안타고니스트 활성 평가

[0608] 실시예 11과 동일한 방법에 의해, 인간 말초혈로부터 호산구의 분리를 행하였다. 단리된 인간 호산구를 둘베코 인산 완충 생리 식염수(이하, D-PBS(-)라 기재함)(나카라이 테스크사)로 혼탁시키고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 30분 반응시켰다. 그 후, 10% FBS 함유 RPMI1640을 사용하여 2×10^5 cells/well로 96웰 플레이트에 과종하였다. 그 후, 최종 농도 10 μg/mL의 아이소타입 컨트롤 항체[CELL LAB 래트 IgG2b 아이소타입 컨트롤(베크만 쿨터사)], 또는 Lym2 항체, 또는 포지티브 컨트롤로서 최종 농도 10 μM CRTH2 저분자 길항약 OC000459(Cayman chemical사)를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 30분간 반응시켰다.

[0609] 이어서, 0.1, 1, 10, 100 및 1000nM 각 최종 농도의 DKPGD2(Cayman chemical사)를 첨가하고, 또한 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 60분간 반응시켰다. 반응 후, 냉동 PBS로 2회 세정하고, 고정화 베퍼(BD 바이오사이언스사)를 200 μL/well 첨가하고, 잘 혼탁시킨 후, 4°C에서 30분간 방치하였다. 그 후, SM으로 2회 세정하고, 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 호산구의 형태 변화를 해석하였다.

[0610] 호산구의 형태 변화는, 플로우 사이토미터에 의한 해석에 있어서 세포의 크기, 세포의 표면적 또는 세포 죽경의 지표인 전방 산란광(Forward Scatter Light; FSC) 플롯의 증가를 지표로 해석을 행하고, DKPGD2 미처리의 호산구 FSC를 기준으로 하여, 고FSC의 게이트(gate)에 검출되는 호산구의 비율(%)을 산출하였다.

[0611] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, 인간 CRTH2 리간드DKPGD2는, 농도 의존적인 호산구의 형태 변화 유도를 했지만, CRTH2 저분자 길항약 OC000459는, DKPGD2 의존적인 호산구의 형태 변화를 억제하였다. 이에 반해, 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체 Lym2 및 아이소타입 컨트롤 항체는, 모두 DKPGD2 의존적인 호산구의 형태 변화를 억제하지 않았다. 즉, 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체는 안타고니스트 활성을 갖지 않음이 시사되었다.

[0612] [실시예 20]

[0613] 인간 호산구의 형태 변화를 지표로 한, Lym2 항체의 아고니스트 활성 평가

[0614] 상술한 실시예 19와 동일한 실험계에 있어서, 0, 0.01, 0.1, 1 및 10 μg/mL 각 최종 농도의 래트 항 인간 CRTH2 항체 Lym2를 첨가하고, 1시간 반응시켜, 호산구의 형태 변화를 해석하였다.

[0615] 그 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이, Lym2 항체는 항체 농도 0-10 μg/mL의 범위에서 처리를 행해도 호산구의 형태 변화를 일으키지 않는 것으로 나타났다. 즉, 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체는 아고니스트 활성을 갖지 않음이 시사되었다.

[0616] [실시예 21]

[0617] 인간 호산구의 형태 변화를 지표로 한, 항 인간 CRTH2 항체의 아고니스트 활성, 안타고니스트 활성, 리간드에 의한 시그널의 증강 활성의 평가

[0618] 실시예 11과 동일한 방법에 의해, 인간 말초혈로부터 호산구의 분리를 행하였다. 단, 혈액에 등량의 주사용 생리 식염수를 첨가하는 조작은 행하지 않고, 직접 피콜-파크 PREMIUM 1.084(GE 헬스케어사)에 중증했다. 단리된 인간 호산구를 D-PBS(-)(나카라이 테스크사)로 혼탁시키고, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C, 1시간 30분 반응시켰다.

[0619] 그 후, 10% FBS 함유 RPMI1640을 사용하여 0.7×10^5 cells/well로 96웰 플레이트에 과종하였다. 그 후, 아이소타입 컨트롤 항체, 인간화 Lym2 항체 LVOHV1, 실시예 9에서 제작된 항 인간 CRTH2 항체 hu19A2 v52, ch8B1, ch3C12 또는 ch31A5 또는 시판되는 항 인간 CRTH2 항체 BM16(santa cruz사) 또는 301108(R&D사)을 최종 농도 10 μg/mL로 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 30분간 반응시켰다.

[0620] 또한, 아이소타입 컨트롤 항체로서, BM16에 대해서는 정제된 래트 IgG2a, κ 아이소타입 Ctrl

항체(BioLegend사), 301108에 대해서는 네거티브 컨트롤 마우스 IgG2a(Dako사), 기타 항체에 대해서는 항 DNP IgG1 항체를 사용하였다.

[0621] 이어서, 100nM 최종 농도의 DKPGD2(Cayman chemical사) 또는 10% FBS 함유 RPMI1640을 첨가하고, 또한 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 60분간 반응시켰다. 반응 후, 빙냉 PBS로 2회 세정하고, 고정화 버퍼(BD 바이오사이언스사)를 100 μL/well 첨가하고, 잘 혼탁시킨 후, 4°C에서 30분간 방치하였다. 그 후, SM으로 2회 세정하고, 실시예 19와 동일한 방법으로 호산구의 형태 변화를 해석하였다.

[0622] 그 결과, 도 18의 (A) 내지 (C)에 나타낸 바와 같이, 리간드 비준재 하에서의 항 인간 CRTH2 항체의 처리에 의한 형태 변화에 대해서는, hu19A2 v52에 있어서 약간의 형태 변화의 경향이 확인되기는 하지만, 강한 형태 변화를 일으키는 항체는 존재하지 않고, 어느 항체도 아고니스트 활성을 갖지 않음이 시사되었다.

[0623] 또한, DKPGD2 처리 조건하에 있어서의 항 인간 CRTH2 항체의 처리에 의한 형태 변화에 대해서는, ch8B1, ch3C12, ch31A5의 처리에 의해, DKPGD2에 의해 유발되는 형태 변화가 억제된 점에서, 이들 항체는 안타고니스트 활성을 갖는 것이 시사되었다. 본 결과는, 선행 특허문헌(국제 공개 제2014/144865호)에 있어서의 의견과 일치한다.

[0624] 한편, hu19A2 v52 및 BM16은, DKPGD2에 의해 유발되는 형태 변화를 증강시켰다. 특히 hu19A2 v52는, 100nM의 DKPGD2에 의해 유발되는 형태 변화를 약 2배까지 증강시키는 것이 명백해졌다.

[0625] 상술한 바와 같이, hu19A2 v52 및 BM16 항체는 리간드 비준재 하에서는 형태 변화를 유발하지 않는 점에서, 이들 항체는 CRTH2 리간드인 DKPGD2에 의한 시그널의 증강 활성을 가짐이 시사되었다.

[0626] 한편 LVOHV1 및 301108은, 아이소타입 컨트롤 항체와 동일하게, DKPGD2 비준재 하, 존재 하의 어느 조건하에서도, 형태 변화에 영향을 나타내지 않은 점에서, DKPGD2에 의한 시그널의 증강 활성을 갖지 않음이 시사되었다.

[0627] 본 발명의 항 인간 CRTH2 항체는, 생리적 시그널을 차단 또는 증강시키지 않는 점에서 바람직하다.

[0628] [실시예 22]

[0629] CRTH2 활성화 상태의 변천에 수반하는 콘포메이션 변화에 대한 CRTH2 모노클로날 항체의 반응성 평가

[0630] (1) 호스래디시 페옥시다아제(HRP) 표지 항체의 제작

[0631] 페옥시다아제 라벨링 키트(Peroxidase Labeling Kit)-NH2(Dojindo사)를 사용하여, 첨부 문서에 따라서, 인간화 Lym2 항체 LVOHV1 및 hu19A2 v52에 HRP를 직접 표지한 후, D-PBS(-)(나카라이 테스크사)에 의해 1mg/mL로 희석하였다.

[0632] (2) 인간 CRTH2 발현 세포의 막 획분의 조제

[0633] 실시예 1에서 수립한 인간 CRTH2 발현 CHO/DG44 세포를 0.02% EDTA 용액(나카라이 테스크사)으로 박리하고, 4°C로 냉각시킨 D-PBS(-)를 사용하여 세포를 세정하였다. 미누트 혈장 막 단백질 단리 키트(Minute Plasma Membrane Protein Isolation Kit)(Invent Biotechnologies)를 사용하여, 첨부 문서에 따라서 막 획분을 조제하였다.

[0634] (3) 인간 CRTH2 발현 세포의 막 획분에 대한 항 인간 CRTH2 항체의 반응성 평가

[0635] 50mM HEPES(Gibco사), 5mM MgCl₂(나카라이 테스크사), 100mM NaCl(나카라이 테스크사) 및 1mM EDTA(invitrogen사)를 첨가한 50mM 트리스-HCl 버퍼 pH 7.4(나카라이 테스크사)(이하, ELISA 반응액이라 기재함)를, (2)에서 조제한 막 획분에 첨가하여, 1mg/mL가 되도록 조제하고, 프로테오세이브 1.5mL 마이크로튜브(스미토모 베이크라이트사)에, 50 μL/tube로 첨가하였다.

[0636] 이어서, 500 μM GTP γ S(Roche Diagnostics) 또는 500 μM GDP(Sigma-Aldrich사)를 첨가한 ELISA 반응액을 50 μL/tube로 첨가하고, 30°C에서 1시간 인큐베이팅하였다.

[0637] 계속해서, D-PBS(-)에 의해 10mg/mL로 희석한 인간 혈청으로부터의 IgG(Sigma-Aldrich사) 및 30%w/v BSA-PBS 지방산 무(fatty acid free)(Wako사)를 각각 50 μL/tube로 첨가하고, 30°C에서 30분간 인큐베이팅하였다.

[0638] 이어서, (1)에서 제작한, HRP 표지된 LVOHV1 또는 hu19A2 v52를 ELISA 반응액에 의해 5 μg/mL로 희석시키고, 50 μL/tube로 첨가한 후 30°C에서 1시간 인큐베이팅함으로써, 막 획분에 대한 항체 반응을 행하였다. 16000g에

서 4°C에서 30분간 원심시킨 후, 상청을 제거하였다.

[0639] 그 후, 원래 GTP γ S를 첨가한 투브에는 100 μM GTP γ S를 첨가한 ELISA 반응액, GDP를 첨가한 투브에는 100 μM GDP를 첨가한 ELISA 반응액을 각각 1mL/tube로 첨가하고, 다시 16000g으로 4°C에서 30분간 원심시킨 후, 상청을 제거하였다. 동일한 조작을 4회 반복한 후, D-PBS(-)를 100 μL/tube로 첨가하고, 막 획분을 충분히 혼탁시켰다.

[0640] 혼탁액을 96웰 플레이트에 30 μL/well로 첨가하고, 1-Step Ultra TMB-ELISA 시약(Thermo scientific사)을 100 μL/well로 첨가하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후, 0.5mol/L 황산(Wako사)을 100 μL/well로 첨가하고, 반응을 정지시켰다.

[0641] SPECTRA max 340PC에 의해 480nm에 있어서의 흡광도를 측정하고, 얻어진 결과를 그래프패드 프리즘(Graphpad Prism)(ver.6.05)을 사용하여 해석하였다. 또한, 터키의 다중 비교 검정(Tukey's multiple comparisons test)을 적응시키고, 유의차 검정을 함께 실시하였다.

[0642] 그 결과, 도 19에 나타내는 바와 같이 GDP 처리 시에 있어서의 hu19A2 v52의 막 획분에 대한 반응성은, GTP γ S 처리 시에 비해 유의하게 저하되었다($p<0.0001$). 한편, LVOHV1의 반응성은, GTP γ S 또는 GDP 처리 시에 있어서도, 변화되지 않았다($p>0.1$).

[0643] CTRH2는 GPCR이며, GPCR은 일반적으로, 활성화형 콘포메이션에서는 GTP가 결합하고, 불활성화형 콘포메이션에서는 GDP가 결합하는 것이 알려져 있다. 상기 결과와 같이, 본 발명의 항 인간 CTRH2 항체는, GTP 유사체의 GTP γ S 또는 GDP에 의한 처리의 유무에 관계없이 CTRH2에 대한 반응성이 변화되지 않은 점에서, CTRH2의 활성화에 수반하는 콘포메이션 변화에 영향받지 않고, 일정한 반응성을 나타낼 가능성이 시사되었다.

[0644] [실시예 23]

[0645] 아자미 그린 융합 인간 및 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 phmAG1-MNLinker 벡터의 제작

[0646] (1) 아자미 그린 융합 인간 CTRH2 발현 phmAG1-MNLinker 벡터의 제작

[0647] 실시예 1의 (1)-(ii)에서 제작된 인간 CTRH2 유전자 발현 pAMoh에 대하여, 프라이머 인간 CTRH2azami-A(서열 번호 60) 및 인간 CTRH2azami-B(서열 번호 61)를 사용하여 목적 단편을 PCR로 증폭시키고, 제한효소 BamHI 및 HindIII를 사용하여, 벡터 phmAG1-MNLinker(MBL사)와 연결하여, 아자미 그린 융합 인간 CTRH2 발현 phmAG1-MNLinker 벡터를 구축하였다.

[0648] (2) 아자미 그린 융합 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 phmAG1-MNLinker 벡터의 제작

[0649] 전체 합성된 계잡이 원숭이 CTRH2의 cDNA(cDNA 서열: 서열 번호 62, 아미노산 서열: 서열 번호 63)를 사용하고, 실시예 1의 (1)-(ii)와 동일한 방법으로 구축한 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 pMoh 벡터에 대하여, 프라이머 cynoCTRH2azami-A(서열 번호 64) 및 cynoCTRH2azami-B(서열 번호 65)를 사용하고, (1)과 동일하게 하여 아자미 그린 융합 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 phmAG1-MNLinker 벡터를 구축하였다.

[0650] [실시예 24]

[0651] 아자미 그린 융합 인간 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포 및 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포의 조성

[0652] 실시예 23에서 제작된 인간 및 계잡이 원숭이 CTRH2 유전자 발현 phmAG1-MNLinker 벡터를 제한효소 BsaI 처리에 의해 절단하여, 얻어진 직쇄상 DNA를 정제하고, 멸균수에 용해시켰다. 이 DNA를 일렉트로포레이션법에 의해, CHO/DG44 세포에 도입하고, IMDM 배양 배지에서 3일 정도 배양하였다.

[0653] 그 후, 0.5mg/mL G418(나카라이 테스크사)을 첨가한 IMDM 선택 배지에서 약제 내성 세포를 선택하였다. 선택한 약제 내성 세포를, 0.25% 트립신-EDTA(나카라이 테스크사)로 박리하고, PBS로 세정한 후, IMDM 선택 배지로 혼탁시켰다. 그 후, 셀 소터(Cell Sorter) SH800(Sony사)을 사용하여, 인간 CTRH2 발현 세포 및 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 세포에서 동일한 정도의 아자미 그린 형광 강도를 나타내는 세포 집단을 각각 게이팅하여, 1cell/well로 소팅을 행하고, 확대 배양하여, 아자미 그린 융합 인간 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포 및 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포를 각각 수립하였다.

[0654] 아자미 그린 융합 인간 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포 및 계잡이 원숭이 CTRH2 발현 CHO/DG44 세포에 대해서, 상기와 동일한 방법으로 세포 조제를 행하고, 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)를 사용하여 아자미 그린의 발현 확인을 행하였다. 그 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이, 각각의 세포의 아자미 그린의 발현

이 동등한 것을 확인하였다.

[0655] [실시예 25]

[0656] 인간 또는 계집이 원숭이 CRTH2에 대한 인간화 Lym2 항체 LVOHV1의 결합 활성 평가

[0657] 실시예 24에서 수립된 아자미 그린 융합 인간 또는 계집이 원숭이 CRTH2 밸현 CHO/DG44 세포를, 0.02% EDTA 용액(나카라이 테스크사)으로 박리하고, PBS로 세정한 후, SM으로 혼탁시켰다. 이어서, 세포수를 1웰당 2×10^5 개가 되도록 96웰 플레이트에 퍼종하고, 30000, 7500, 1875, 469, 117, 29, 7 및 2ng/mL 각 최종 농도의 인간화 Lym2 항체 LVOHV1 또는 항 DNP IgG1 항체를 첨가하고, 4°C에서 40분간의 반응을 행하였다.

[0658] 세포를 SM으로 3회 세정한 후, SM으로 10 μ g/mL의 농도로 희석한 염소 항-인간 IgG alexa647(Molecular Probes사)를 1웰당 100 μ L 첨가하고, 4°C에서 40분간의 반응을 행하였다. SM으로 세포를 세정한 후, 세포를 100 μ L의 SM으로 재현탁시키고, 형광 강도를 플로우 사이토메트리(BD 바이오사이언스사, FACS CantoII)로 측정하였다.

[0659] 데이터는 FlowJo 7.65(토미 디지털 바이올로지사)에 의해 해석하였다. 그 결과, 도 21에 나타내는 대로, LVOHV1이, 인간 CRTH2 및 원숭이 CRTH2에 대하여 거의 동등한 결합성을 나타내는 것이 명백해졌다.

산업상 이용가능성

[0660] 본 발명에 의해 인간 CRTH2의 특징적인 에피토프를 인식하고, 결합함으로써 원하는 활성을 갖는 항 인간 CRTH2 항체, 해당 항체 단편, 해당 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA, 해당 DNA를 포함하는 벡터, 해당 항체를 생산하는 하이브리도마 및 항체 생산 세포, 해당 항체의 제조 방법, 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물, 해당 항체 또는 항체 단편을 사용하는 알레르기성 질환, 자기 면역 질환, 호산구 증다나 기능 항진을 수반하는 질환, Th2 세포의 증다나 기능 항진을 수반하는 질환 등의 치료 방법 및 진단 방법, 그리고 해당 항체 또는 항체 단편을 포함하는 의약 및 진단약을 제공할 수 있다.

[0661] 본 발명을 특정한 형태를 사용하여 상세하게 설명했지만, 본 발명의 의도와 범위를 벗어나지 않고 다양한 변경 및 변형이 가능한 것은, 당업자에 있어서 명백하다. 또한, 본 출원은, 2015년 7월 15일자로 출원된 일본 특허 출원(특원 2015-141633)에 기초하고 있으며, 그 전체가 인용에 의해 원용된다.

서열목록 자유텍스트

[0663] 서열 번호 3: 인공 서열의 기재: 인간 CRTH2FLAG-A의 염기 서열

서열 번호 4: 인공 서열의 기재: 인간 CRTH2FLAG-B의 염기 서열

서열 번호 5: 인공 서열의 기재: FLAG 태그 부 인간 CRTH2 cDNA의 염기 서열

서열 번호 6: 인공 서열의 기재: 인간 CRTH2FLAG-C의 염기 서열

서열 번호 7: 인공 서열의 기재: 인간 CRTH2FLAG-D의 염기 서열

서열 번호 8: 인공 서열의 기재: 래트 IgG2bH-A의 염기 서열

서열 번호 9: 인공 서열의 기재: 래트 IgG2bH-B의 염기 서열

서열 번호 10: 인공 서열의 기재: Ratk-A의 염기 서열

서열 번호 11: 인공 서열의 기재: Ratk-B의 염기 서열

서열 번호 20: 인공 서열의 기재: Lym2 항체 VH CDR1의 아미노산 서열

서열 번호 21: 인공 서열의 기재: Lym2 항체 VH CDR2의 아미노산 서열

서열 번호 22: 인공 서열의 기재: Lym2 항체 VH CDR3의 아미노산 서열

서열 번호 23: 인공 서열의 기재: Lym2 항체 VL CDR1의 아미노산 서열

서열 번호 24: 인공 서열의 기재: Lym2 항체 VL CDR2의 아미노산 서열

서열 번호 25: 인공 서열의 기재: Lym2 항체 VL CDR3의 아미노산 서열

서열 번호 26: 인공 서열의 기재: chLym2 밸현 벡터용 VH의 합성 DNA

서열 번호 27: 인공 서열의 기재: chLym2 발현 벡터용 VL의 합성 DNA
서열 번호 28: 인공 서열의 기재: chLym2 VH-A의 염기 서열
서열 번호 29: 인공 서열의 기재: chLym2 VH-B의 염기 서열
서열 번호 30: 인공 서열의 기재: chLym2 VH-C의 염기 서열
서열 번호 31: 인공 서열의 기재: chLym2 VH-D의 염기 서열
서열 번호 32: 인공 서열의 기재: LV0의 염기 서열
서열 번호 33: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 34: 인공 서열의 기재: LV1의 염기 서열
서열 번호 35: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 36: 인공 서열의 기재: LV2a의 염기 서열
서열 번호 37: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 38: 인공 서열의 기재: LV2b의 염기 서열
서열 번호 39: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 40: 인공 서열의 기재: LV2c의 염기 서열
서열 번호 41: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 42: 인공 서열의 기재: LV3a의 염기 서열
서열 번호 43: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 44: 인공 서열의 기재: LV3b의 염기 서열
서열 번호 45: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 46: 인공 서열의 기재: LV4의 염기 서열
서열 번호 47: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 48: 인공 서열의 기재: HV0의 염기 서열
서열 번호 49: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 50: 인공 서열의 기재: HV1의 염기 서열
서열 번호 51: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 52: 인공 서열의 기재: HV2a의 염기 서열
서열 번호 53: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 54: 인공 서열의 기재: HV2b의 염기 서열
서열 번호 55: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 56: 인공 서열의 기재: HV3의 염기 서열
서열 번호 57: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 58: 인공 서열의 기재: HV4의 염기 서열
서열 번호 59: 인공 서열의 기재: 합성 구축물의 아미노산 서열
서열 번호 60: 인공 서열의 기재: 인간 CRTH2 azami-A의 염기 서열
서열 번호 61: 인공 서열의 기재: 인간 CRTH2 azami-B의 염기 서열
서열 번호 64: 인공 서열의 기재: cyno CRTH2 azami-A의 염기 서열

서열 번호 65: 인공 서열의 기재: cyno CRTH2 azami-B의 염기 서열

도면

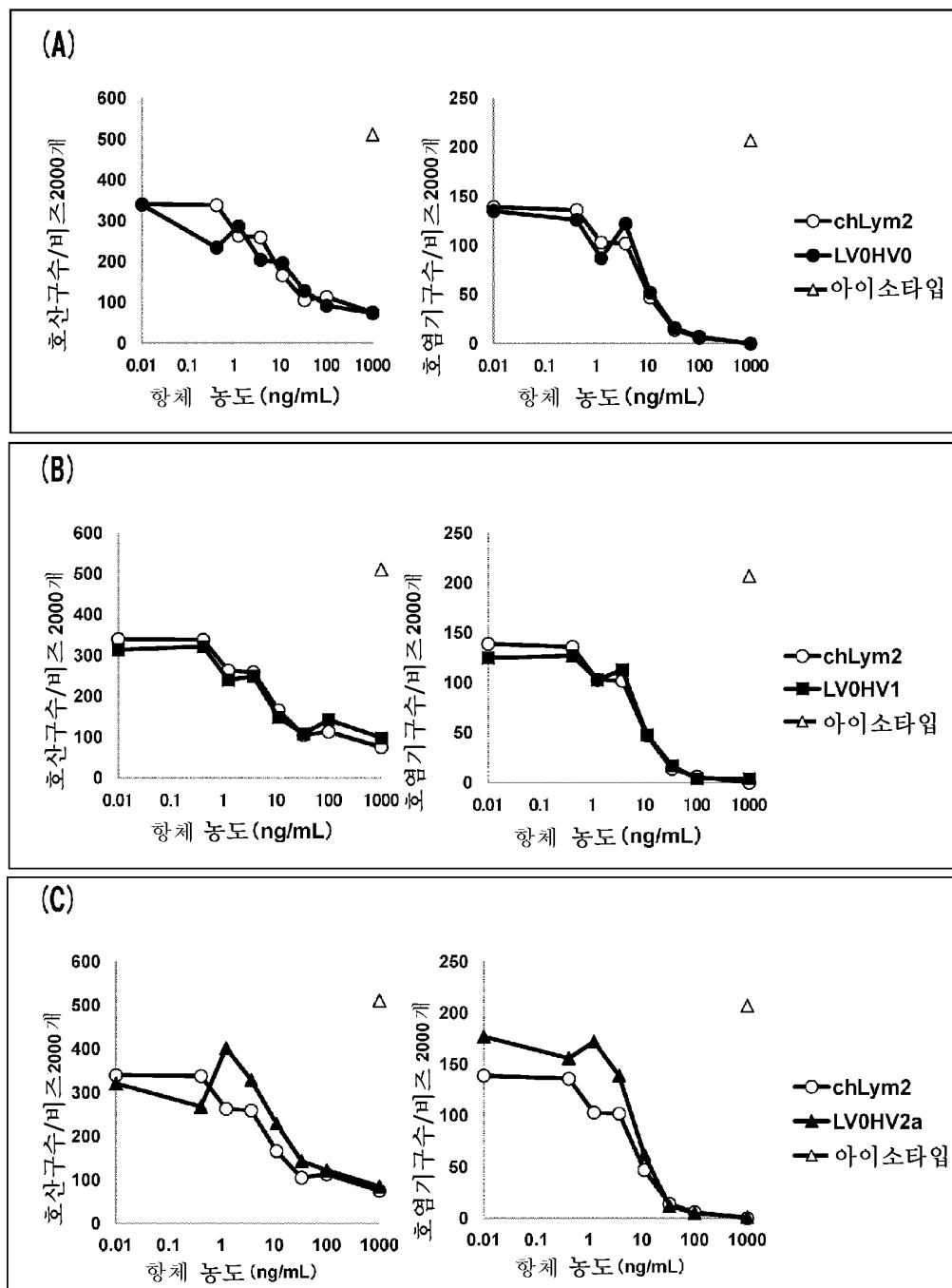
도면1

12345678901234567890123	4567890123456789	012345678901234	5678901
Lym2 VL DVVLQTPLSVPVTLGESASISC	RSSQSLEYSDGYTYLE	WYLOKPGQSPQVLIY	GVSNRFS
LV0 DIVMTQTPLSLPVTGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
LV1 DIVMTQTPLSLPVTGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
LV2a DIVLTQTPLSLPVTGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
LV2b DIVMTQTPLSLPVTGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
LV2c DIVVLQTPLSVPVTLGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
LV3a DVVLQTPLSVPVTLGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
LV3b DVVLQTPLSVPVTLGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
LV4 DVVLQTPLSVPVTLGESASISC		WYLOKPGQSPQVLIY	
CDR L1		CDR L2	
23456789012345678901234567890123	456789012	3456789012	
Lym2 VL GVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDGVVYYC	FQATHDPLT	FGSGTKLEIK	
LV0 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADGVVYYC		FGQGTKLEIK	
LV1 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADGVVYYC		FGQGTKLEIK	
LV2a GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADGVVYYC		FGQGTKLEIK	
LV2b GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDGVVYYC		FGQGTKLEIK	
LV2c GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADGVVYYC		FGQGTKLEIK	
LV3a GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDGVVYYC		FGQGTKLEIK	
LV3b GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADGVVYYC		FGQGTKLEIK	
LV4 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDGVVYYC		FGQGTKLEIK	
CDR L3			

도면2

123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	01234567890123456
Lym2 VH EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFS	NYIMA	WVRQAPKKGLEWVA	TISYDGSSYYRDSVKKG
HV0 EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV1 EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV2a EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV2b EVQLVESGGGVVQPGRSRMLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV3 EVQLVESGGGVVQPGRSRMLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV4 EVQLVESGGGVVQPGRSRMLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
CDR H1		CDR H2	
78901234567890123456789012345678	90123456789012	34567890123	
Lym2 VH RFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTATYYCAR	HRGYYYSGAGYFDY	WGQGVMTVSS	
HV0 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTATYYCAR		WGQGTMVTVSS	
HV1 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTATYYCAR		WGQGTMVTVSS	
HV2a RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTATYYCAR		WGQGVMTVSS	
HV2b RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTATYYCAR		WGQGVMTVSS	
HV3 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTATYYCAR		WGQGVMTVSS	
HV4 RFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDTATYYCAR		WGQGVMTVSS	
CDR H3			

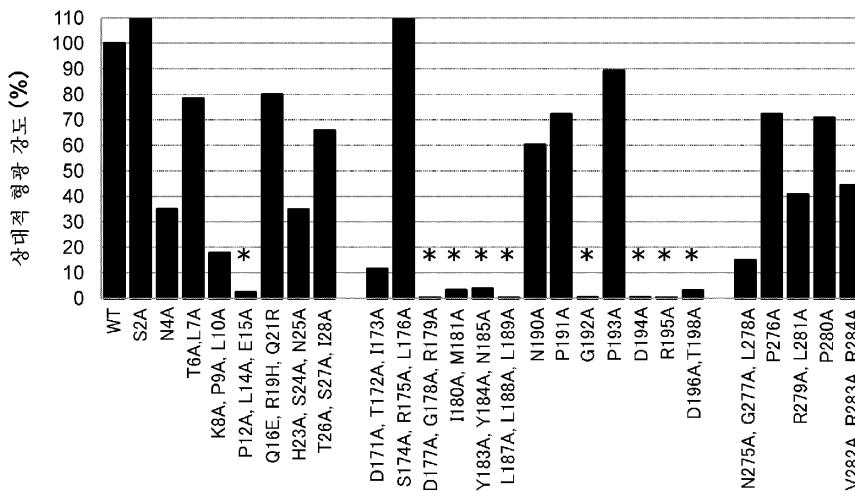
도면3



도면4

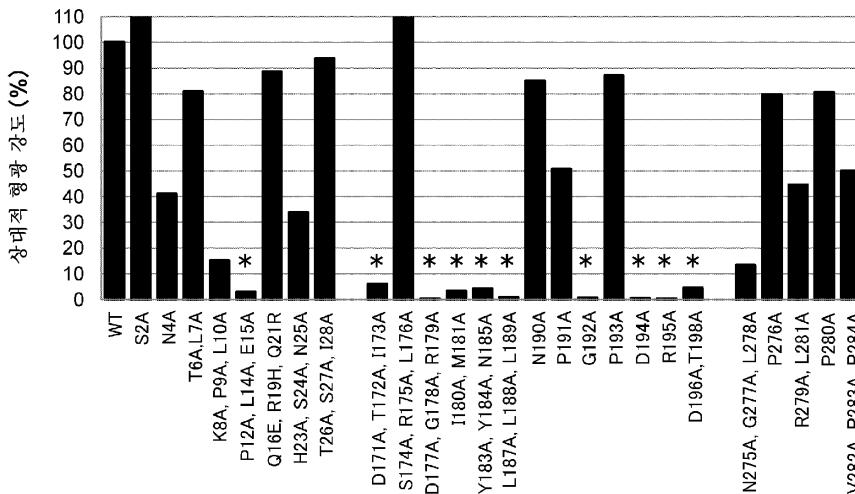
(A)

LV0HV1

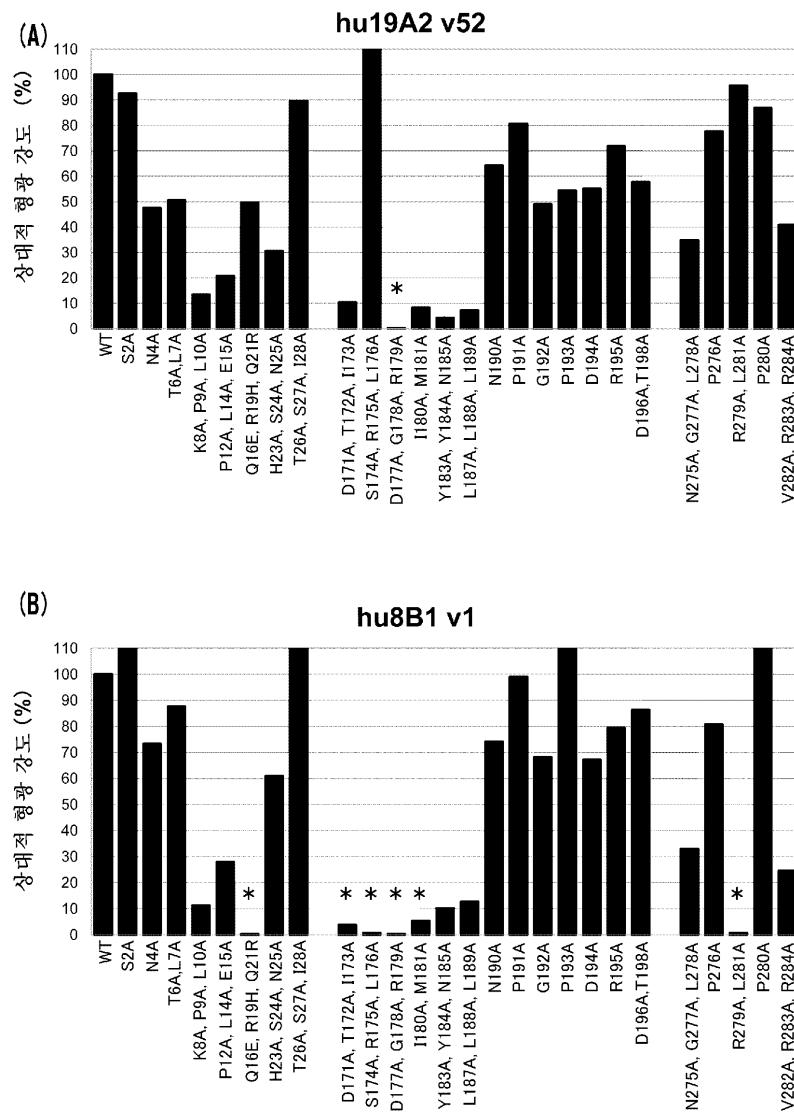


(B)

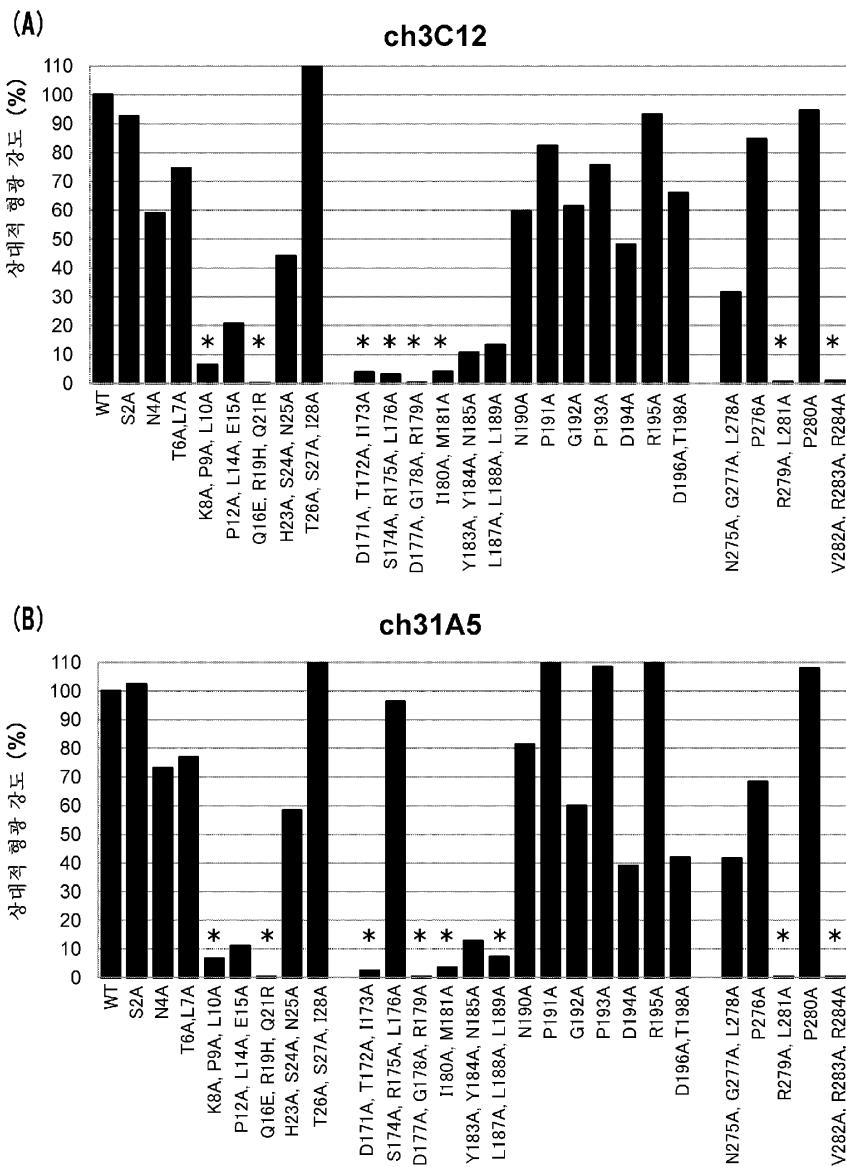
chLym2



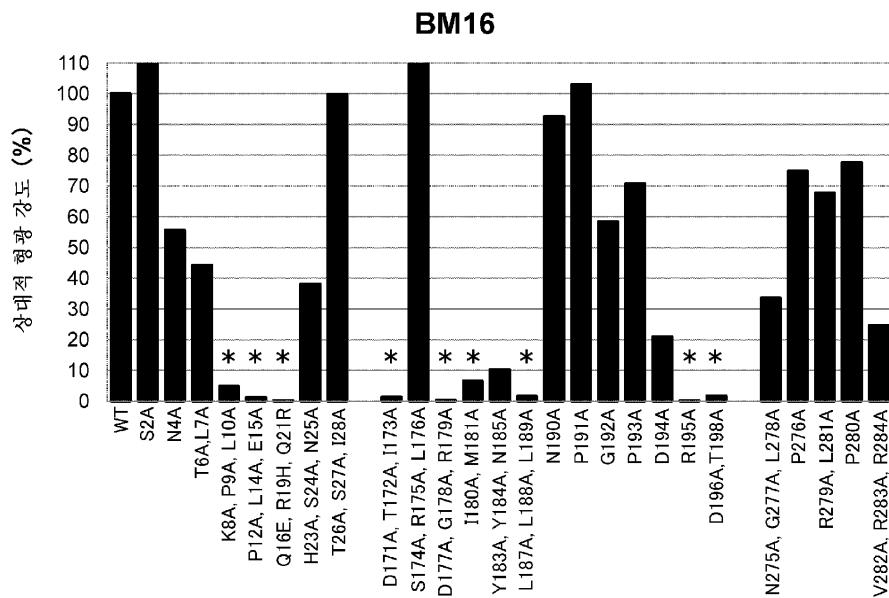
도면5



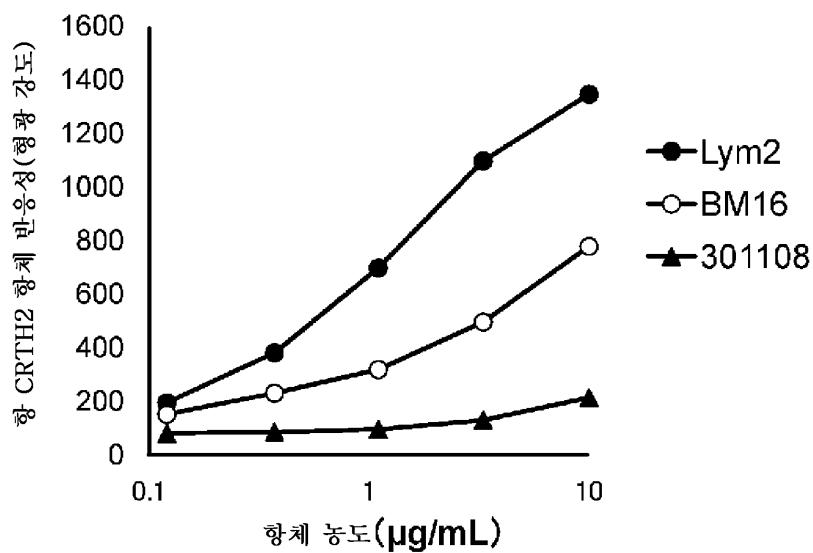
도면6



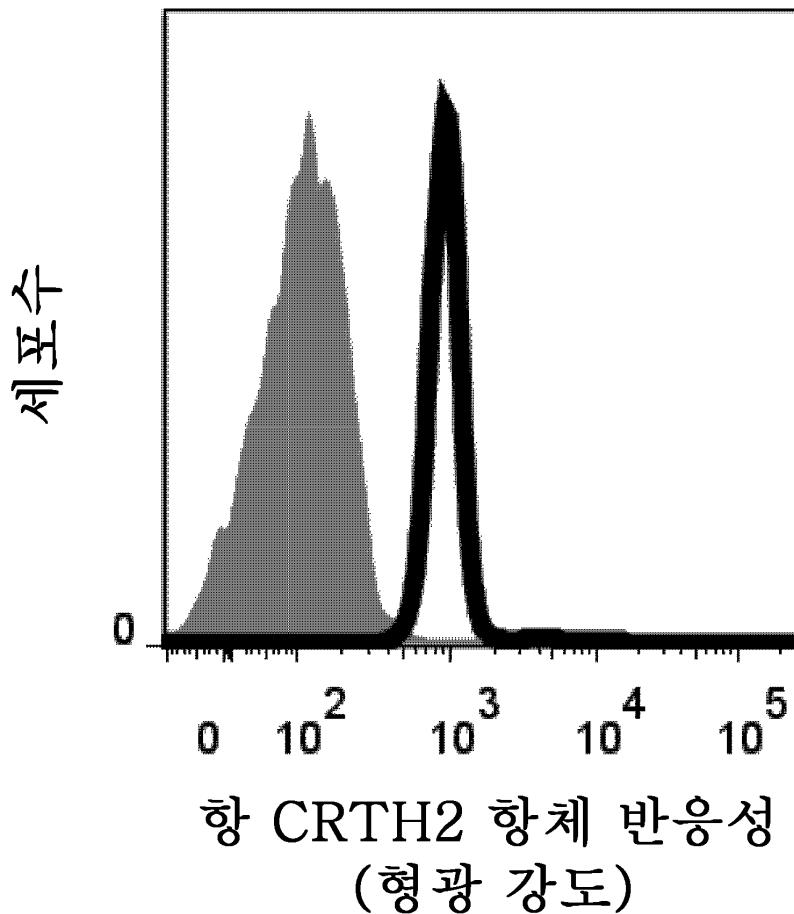
도면7



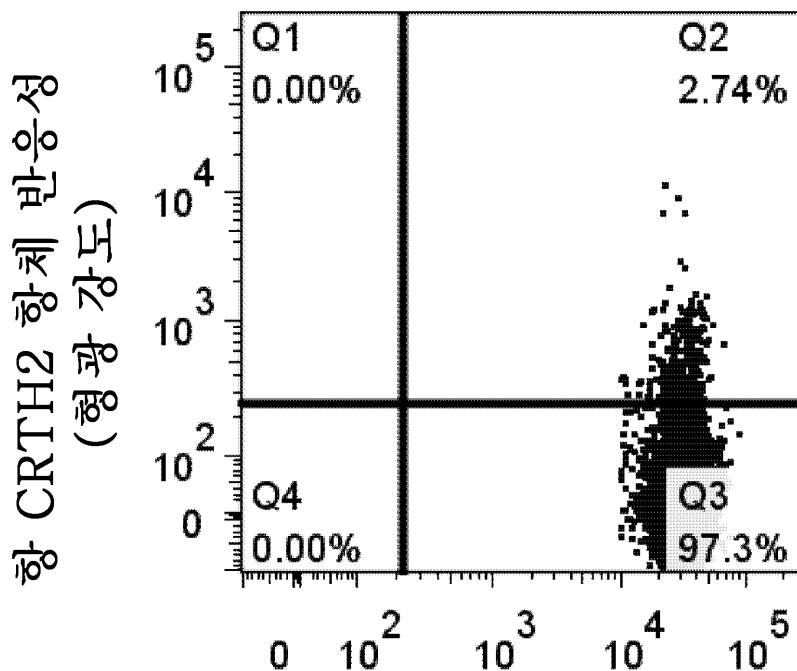
도면8



도면9

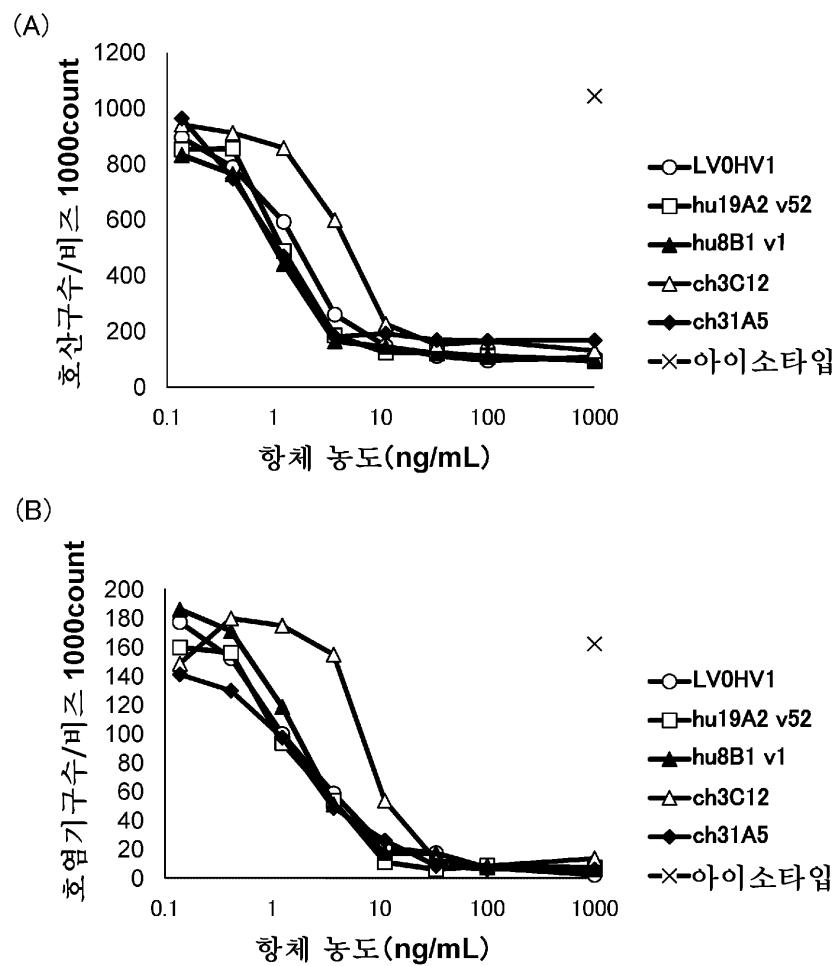


도면10

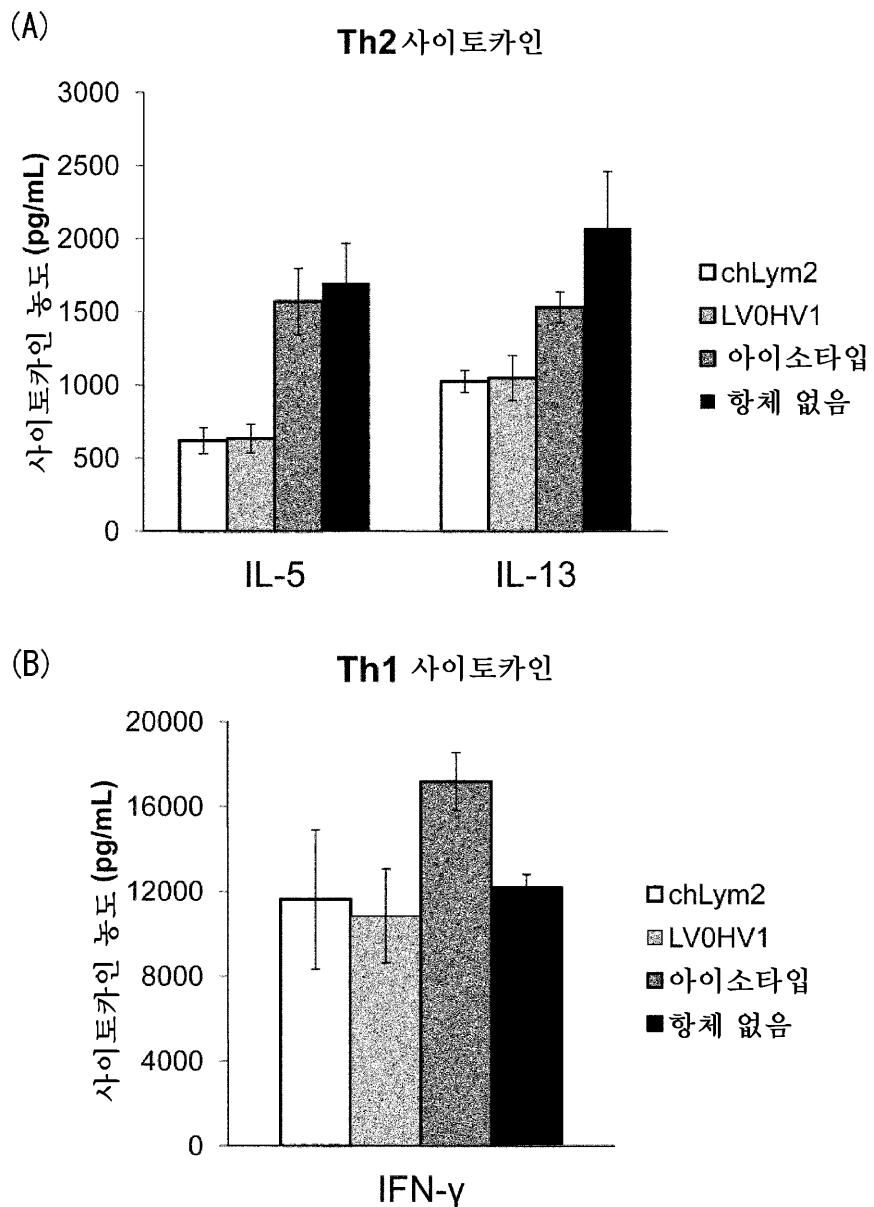


항 CD4 항체 반응성
(형광 강도)

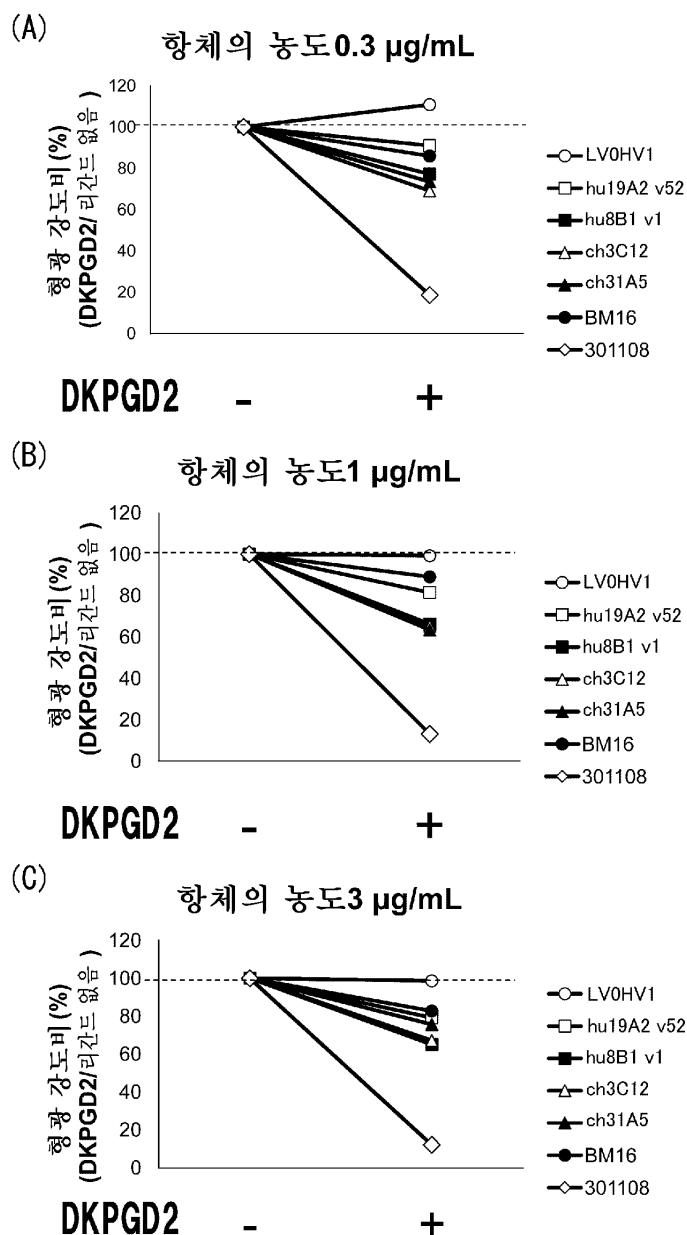
도면11



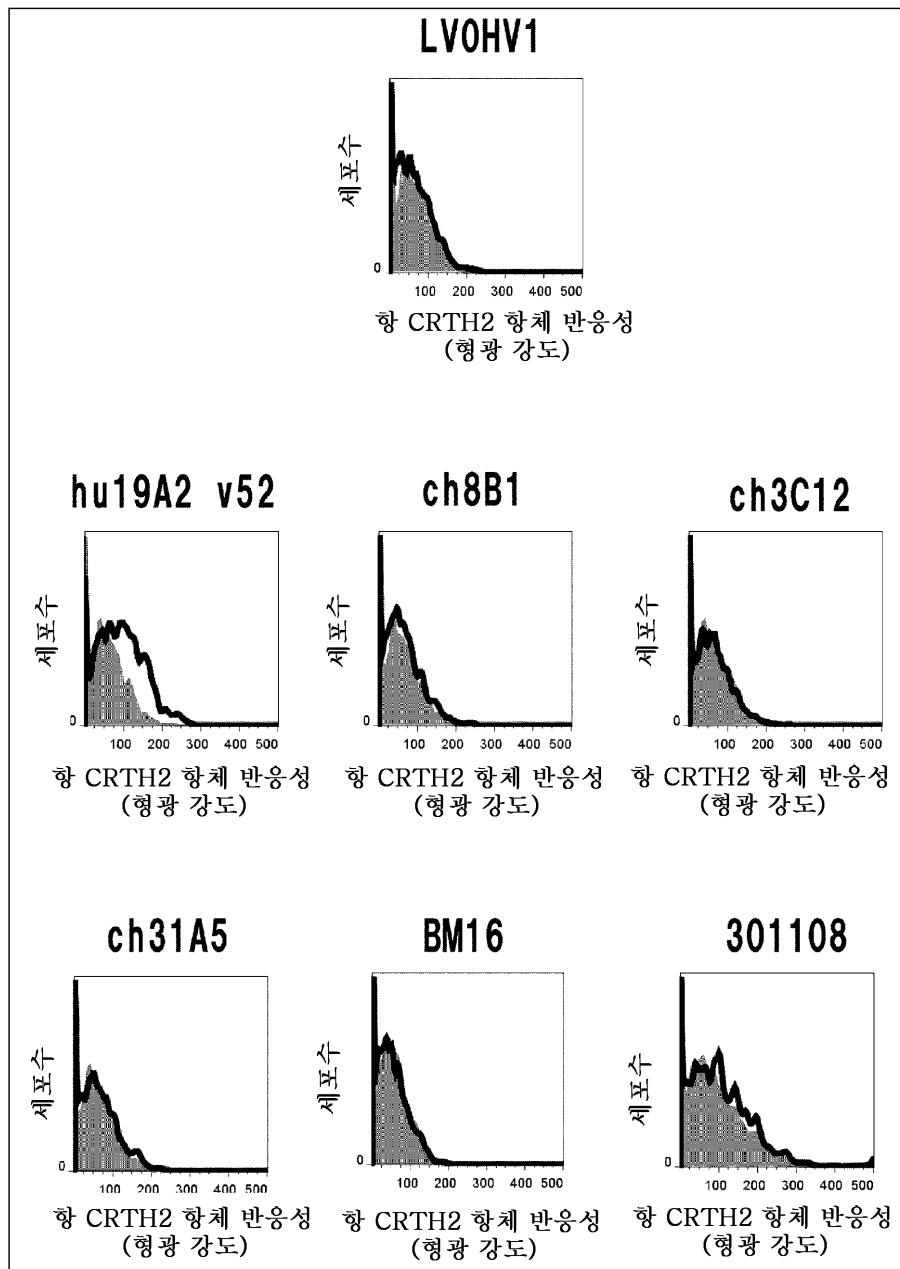
도면12



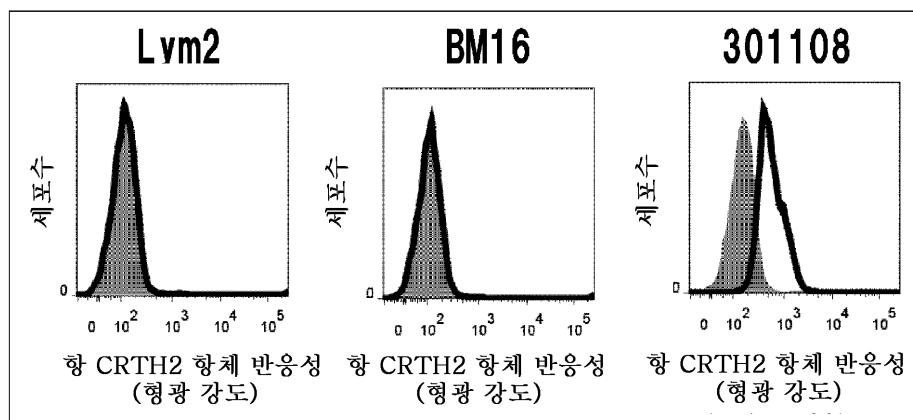
도면13



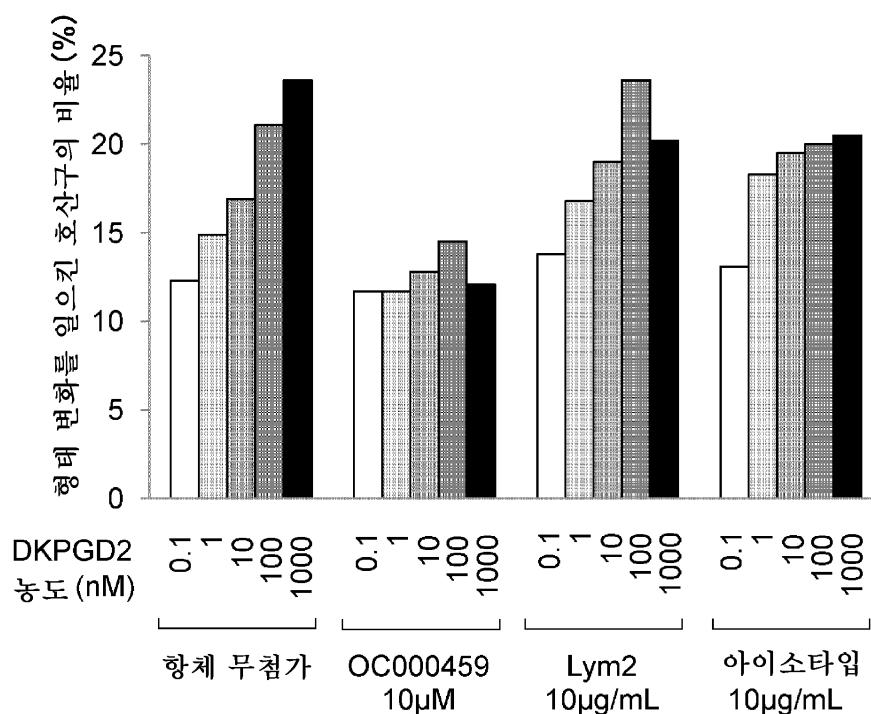
도면14



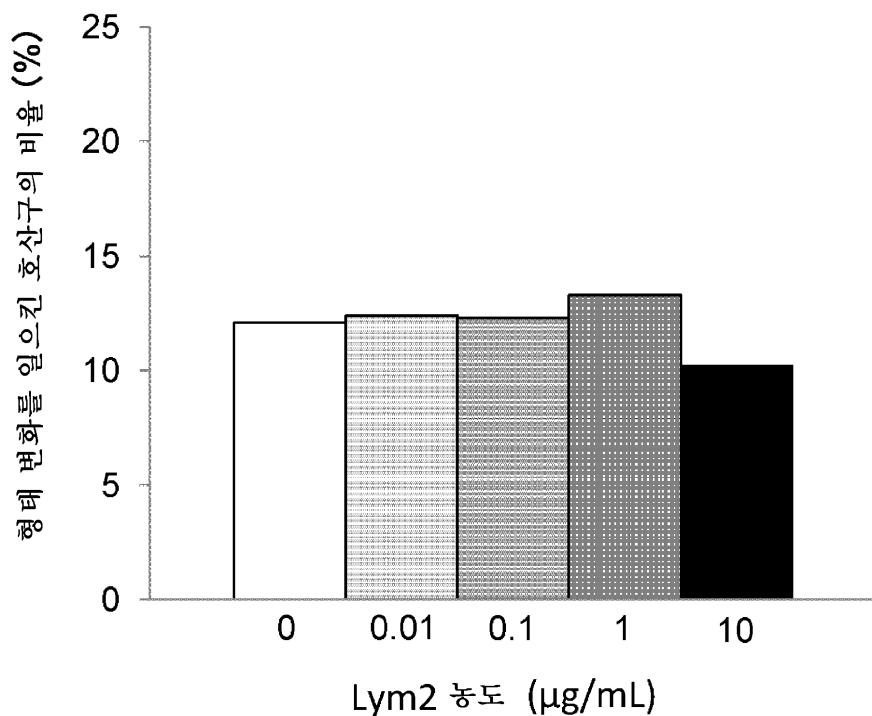
도면15



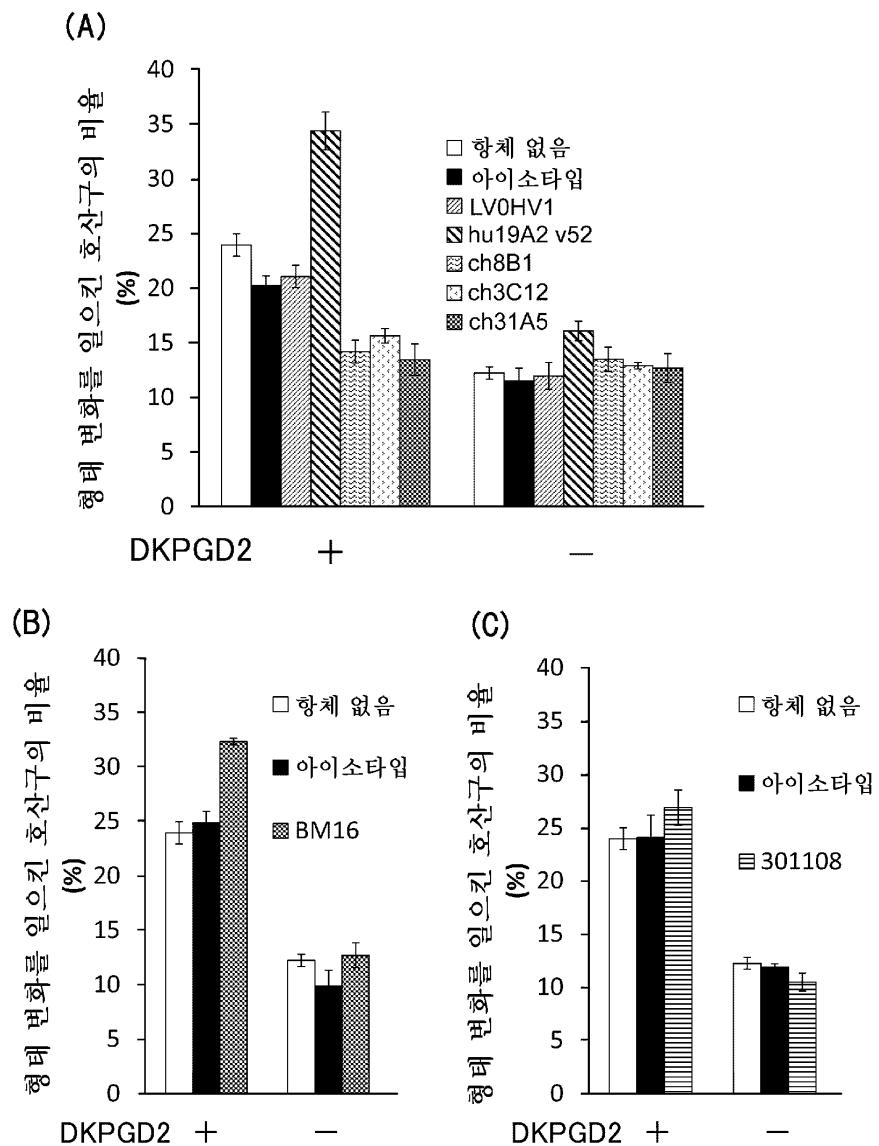
도면16



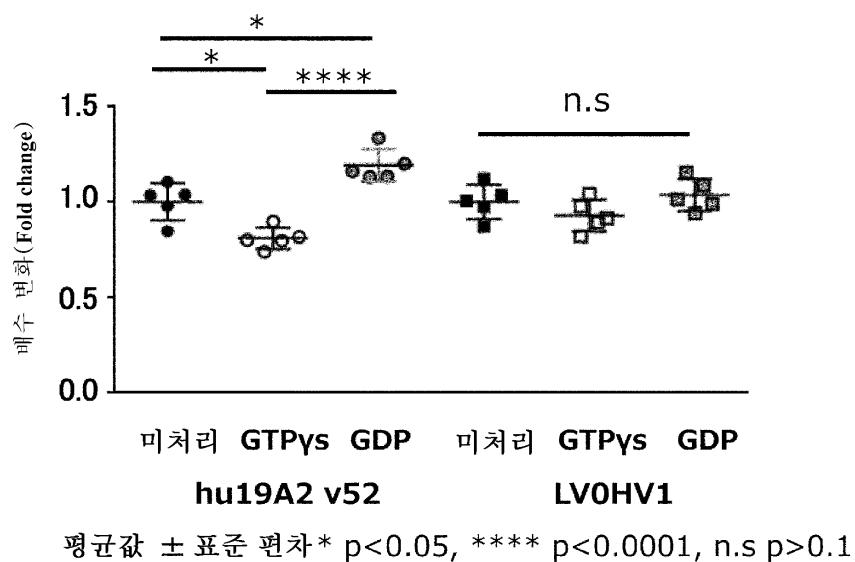
도면17



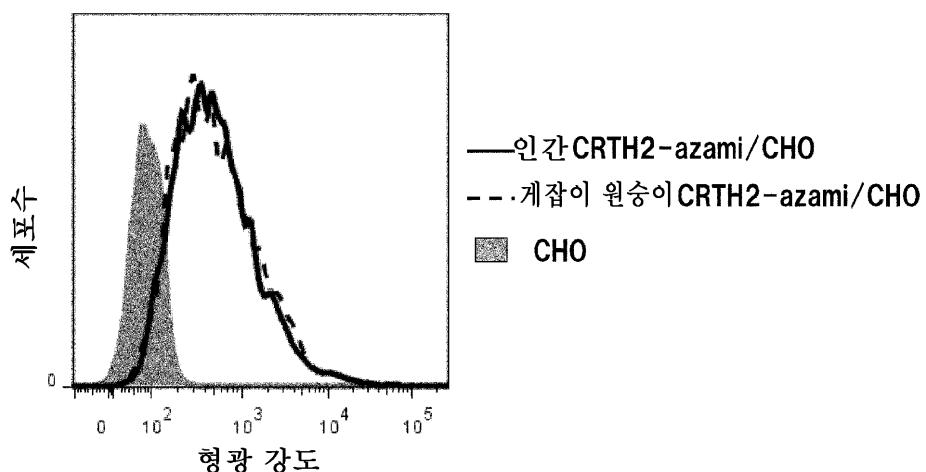
도면18



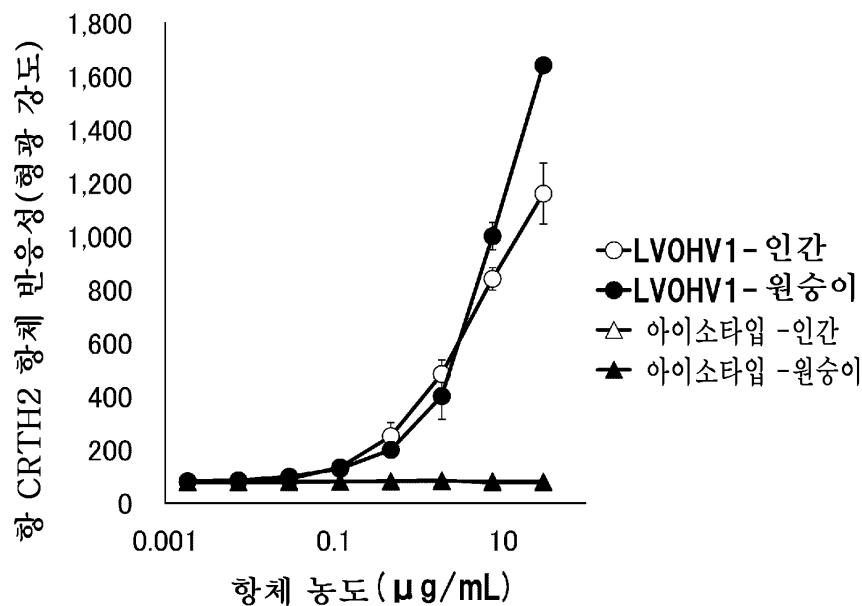
도면19



도면20



도면21



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kirin, Co., Ltd.

<120> antibody specifically binding to human CRTH2

<130> W520787

<150> JP2015-141633

<151> 2015-7-15

<160> 65

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1188

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1188)

<400> 1

atg tcg gcc aac gcc aca ctg aag cca ctc 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	agc	atc	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	ctg	ctg	cac	ggg	ctg	gcc	tcg	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	ctc	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	ctg	gcg	ctg	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	ctg	ccc	ttc	ttc	acc	tac	ttc	ttg	gcc	gtg	ggc	cac	tcg	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	336
Trp	Glu	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe	Cys	Lys	Leu	His	Ser	Ser	Ile	Phe	Phe	
100																
105																
110																
ctc	aac	atg	ttc	gcc	agc	ggc	ttc	ctg	ctc	agc	gcc	atc	agc	ctg	gac	384
Leu	Asn	Met	Phe	Ala	Ser	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Leu	Asp	
115																
120																
125																
cgc	tgc	ctg	cag	gtg	gtg	cgg	ccg	gtg	ggc	cag	aac	cac	cgc	acc	432	
Arg	Cys	Leu	Gln	Val	Val	Arg	Pro	Val	Trp	Ala	Gln	Asn	His	Arg	Thr	
130																
135																
140																
gtg	gcc	gcf	gcf	cac	aaa	gtc	tgc	ctg	gtg	ctt	tgg	gca	cta	gcf	gtg	480
Val	Ala	Ala	Ala	His	Lys	Val	Cys	Leu	Val	Leu	Trp	Ala	Leu	Ala	Val	
145																
150																
155																
160																
ctc	aac	acg	gtg	ccc	tat	ttc	gtg	ttc	cgf	gac	acc	atc	tcg	cgg	ctg	528
Leu	Asn	Thr	Val	Pro	Tyr	Phe	Val	Phe	Arg	Asp	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	
165																
170																
175																
gac	ggg	cgc	att	atg	tgc	tac	tac	aat	gtg	ctg	ctc	ctg	aac	ccg	ggg	576

Asp Gly Arg Ile Met Cys Tyr Tyr Asn Val Leu Leu Leu Asn Pro Gly
 180 185 190
 cct gac cgc gat gcc acg tgc aac tcg cgg cag gtg gcc ctg gcc gtc 624
 Pro Asp Arg Asp Ala Thr Cys Asn Ser Arg Gln Val Ala Leu Ala Val

 195 200 205
 agc aag ttc ctg ctg gcc ttc ctg gtg ccg ctg gcg atc atc gcc tcg 672
 Ser Lys Phe Leu Leu Ala Phe Leu Val Pro Leu Ala Ile Ile Ala Ser
 210 215 220
 agc cac ggc gtc agc ctg cgg ttg cag cac cgc ggc cgc cgg cgg 720
 Ser His Ala Ala Val Ser Leu Arg Leu Gln His Arg Gly Arg Arg Arg
 225 230 235 240

 cca ggc cgc ttc gtg cgc ctg gtg gcg gcc gtc gtg gcc gtc ttc gcg 768
 Pro Gly Arg Phe Val Arg Leu Val Ala Ala Val Val Ala Ala Phe Ala
 245 250 255
 ctc tgc tgg ggg ccc tac cac gtg ttc agc ctg ctg gag gcg cgg gcg 816
 Leu Cys Trp Gly Pro Tyr His Val Phe Ser Leu Leu Glu Ala Arg Ala
 260 265 270
 cac gca aac ccg ggg ctg cgg ccg ctc gtg tgg cgc ggg ctg ccc ttc 864

 His Ala Asn Pro Gly Leu Arg Pro Leu Val Trp Arg Gly Leu Pro Phe
 275 280 285
 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 cgc aag ctg cgg cgc tcg ctg cgc 960
 Val Leu Thr Cys Pro Asp Met Leu Arg Lys Leu Arg Arg Ser Leu Arg

 305 310 315 320
 acg gtg ctg gag agc gtg ctg gtg gac gac gag ctg ggt ggc gcg 1008
 Thr Val Leu Glu Ser Val Leu Val Asp Asp Ser Glu Leu Gly Gly Ala
 325 330 335
 gga agc agc cgc cgc cgc acc tcc tcc acc gcc cgc tcg 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 cgg ggc ccc gcg 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 gcg 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 cgg gcg ctg agc 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> Homo sapiens			
<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 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 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> Artificial			
<220><223> description of the artificial sequence: human CRTH2 FLAG-A			
<400> 3			
cataagctt ccaccatgtc ggccaa			27
<210> 4			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> description of the artificial sequence: human CRTH2 FLAG-B			
<400> 4			
catggtaacc tacttatcgt cgtcatcctt gtaatcactc gaggtgctgc tcagcgcccg			60
gttcag			66
<210> 5			
<211> 1212			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> description of the artificial sequence: FLAG tagged human CRTH2			
cDNA			
<400> 5			
atgtcggcca acgccacact gaagccactc tgccccatcc tggagcagat gagccgtctc			60
<211> 1212			
cDNA			
<400> 5			
cagagccaca gcaacaccag catccgctac atcgaccacg cggccgtgct gctgcacggg			120
ctggcctcgc tgctggcct ggtggagaat ggagtcatcc tcttcgtgg gggctgccgc			180
atgcgccaga ccgtggtcac cacctgggtc ctgcacctgg cgctgtccga cctgttgccc			240
tctgcttccc tgcccttctt cacctacttc ttggccgtgg gccactcgtg ggagctggc			300
accaccttct gcaaactgca ctcctccatc ttcttctca acatgttcgc cagcggcttc			360
ctgctcagcg ccatcagcct ggaccgctgc ctgcaggtgg tgccggccgt gtggcgcag			420

aaccaccgca ccgtggccgc ggccgcacaaa gtctgcctgg tgctttggc actagcggtg 480

ctcaacacgg tgccctattt cgtgttccgg gacaccatct cgccgcgttga cgggcgcatt 540
 atgtgctact acaatgtgct gtcctgaac ccggggccctg acccgatgc cacgtcaac 600
 tcgcggcagg tggccctggc cgtcagcaag ttccctgtgg cttccctgtt ggcgttggcg 660
 atcatcgctt cgagccacgc ggccgtgagc ctgcgggttc agcaccgcgg ccgcggcg 720
 ccaggccgt tcgtgcgcctt ggtggcgcc gtcgtggccg cttcgcgtt ctgctgggg 780
 cccttaccacg ttttacgcct gtcggaggcg cgggcgcacg caaaccggg gtcgcggccg 840
 ctcgtgtggc gccggctgcc cttcgttacc agcctggcct tttcaacag cgtggcaac 900

ccgggtgtct acgtgtcac ctggccgcac atgtgcgcga agtcgcggcg ctgcgtgcgc 960
 acgggtgtgg agagcgtgct ggtggacgc agcgagctgg gtggcgccgg aagcagccgc 1020
 cgccgcgcga cctcctccac cgccgcgtcg gcctccctt tagctctgt cagccggccg 1080
 gagaaaccgc gggccccgc gcgtctccctc ggctggctgc tggcagctg cgcagcgtcc 1140
 ccgcagacgg gcccctgaa cgggcgcgtg agcagcacct cgagtgattt caaggatgac 1200
 gacgataagt ag 1212

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223>

> description of the artificial sequence: human CRTH2 FLAG-C

<400> 6

catgaattcg ccaccatgtc ggccaaac 27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: human CRTH2 FLAG-D

<400> 7

catggtaccc tacttatgtc cgtcatc 27

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Rat IgG2bH-A

<400> 8

cgctggacag ggctccagag ttcc

24

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Rat IgG2bH-B

<400> 9

ggccatgttag ggcatttgtg tccaatgc

28

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Ratk-A

<400> 10

gactgaggca cctccagttg ctaactgttc c

31

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Ratk-B

<400> 11

cctgttgaag ctcttgacga cgggtgagg

29

<210> 12

<211> 426

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<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
cct gga agg tcc atg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act ttc				144
Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe				
35				40
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				65
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
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				100
acc cta tac ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act				336
105				110
110				115
115				120
120				125
125				130
130				135
135				140
<210> 13				
<211> 142				
<212> PRT				
<213> Rattus norvegicus				
<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	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> Rattus norvegicus

<220><221> CDS

<222> (1)..(393)

<400> 14

atg	aaa	gtg	cct	ggt	agg	ctg	ctg	gtg	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	act	cca	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	ctt	gga	gat	caa	gct	tct	ata	tct	tgc	agg	tct	agt	cag	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 tac 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 cca cag gtc ctc atc tat gga gtt tcc aac cga ttt tct 240

Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80

ggg gtc cca 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> Rattus norvegicus

<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> Rattus norvegicus			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(369)			
<400> 16			
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga agg 48			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
tcc atg aaa ctc tcc tgt gca gcc 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 gct 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 cga ttc act 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 gcc 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 Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc tca 369

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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> Rattus norvegicus
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(336)
 <400> 18

gat gtt gtg ttg aca caa act cca gtt tcc ctg tct 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 gct tct ata tct tgc agg tct 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 cct ctc acg 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> Rattus norvegicus

<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	
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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Lym2 VH CDR1 amino acid

<400> 20

Asn Tyr Tyr Met Ala

1		5
---	--	---

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Lym2 VH CDR2 amino acid

<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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Lym2 VH CDR3 amino acid

<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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Lym2 VL CDR1 amino acid

<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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Lym2 VL CDR2 amino acid

<400> 24

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: Lym2 VL CDR3 amino acid

<400> 25

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 26

<211>

> 437

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: synthetic DNA of chLym2

VH for vector

<400> 26

gaccctcac	catgaatctg	ggctgtcgc	tatcttcct	ggcgctgatc	ctgaaggcg	60
tgcagtgcga	agtgcagctt	gtcgaatccg	gcggcggct	tgttcagccc	ggcgctcga	120
tgaagctgtc	gtgcgcgcg	tccggctica	cgttctgaa	ctactacatg	gcgtgggtgc	180
gccaggcgcc	gaagaagggg	ctggagtggg	tcgcgacgat	ctcgtacgac	ggctcgtcga	240
cgtactatcg	cgttccgtg	aaggggcgct	tcacgatctc	gcgcgacaac	gcgaagtctg	300

cgctgtatct	gcagatggat	tcgctgcgt	ccgaggatac	cgcgacgtac	tactgcgcgc	360
gccatcgccg	ctactactac	tccggcgccg	gctacttcga	ctactggggg	cagggcgtga	420
tggtgaccgt	gtcgtcc					437

<210> 27

<211> 404

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: synthetic DNA of chLym2

VL for vector

<400> 27

gcctttcac	catgaagctg	ccgttcgcc	tgcttgtct	gatgttctgg	atcccccg	60
cgtcgccga	cgtcgctgt	acgcagacgc	ccgtgtcgct	gtccgtgacg	ctggcgatc	120

aggcgtcgat	ctcggtcg	tcgtcgact	cgctggagta	ctccgacggc	tacacgtatc	180
tggagtggta	tctgcagaag	ccggggcagt	cggccgacgt	gctgatctac	ggcgtgtcga	240
atcgcttctc	cgggttccc	gatcgcttca	tcggctccgg	ctccgggacc	gacttcacgc	300
tgaagatctc	gcgcgtcgaa	cccgaggatac	tggcggtgt	ctactgttgc	caggcgacgc	360
acgatccgct	gacgttcggc	tccgggacga	agctggagat	caag		404

<210> 28

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: chLym2 VH-A

<400> 28

atcacagatc gtcgacgacc cctcaccatg aatctg 36

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: chLym2 VH-B

<400> 29

ggcccttggc gctagcggac gacacggta ccatc 35

<210> 30

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: chLym2 VH-C

<400> 30

acgccccatcac agatctgcct cttcaccatg aagctg 36

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: chLym2 VH-D

<400> 31

gtgcagccac cgtacgcttg atctccagct tcgtc 35

<210> 32

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: LV0 DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 32

gac atc gtg atg acg cag acg ccg ctg tcg 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 tcg atc tcg 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
 ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg 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 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
 tcg 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 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> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Construct
 <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> Artificial			
<220><223> description of the artificial sequence: LV1 DNA			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(336)			
<400> 34			
gac atc gtg atg acg cag ccg ctg tcg 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 tcg atc tcg 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	
ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg 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 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

tcg 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 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> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: LV2a DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 36

gac atc gtg ctg acg cag 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 tcg atc tcg tgt cgc tcg tcg cag tcg 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

ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg 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 acg ctg aag atc 240

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

tcg 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 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> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: LV2b DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 38

gac atc gtg atg acg cag acg ccg ctg tcg 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 tcg atc tcg 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
 ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg 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 acg ctg aag atc 240

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

tcg cgc gtc gaa ccc 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

acg cac 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> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<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 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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: LV2c DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 40

gac gtc gtg ctg acg acg ccg ctg tcg 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 gcg tcg atc tcg 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

ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg 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 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

tcg 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 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> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<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

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> 42

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: LV3a DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 42

gac gtc gtg ctg acg acg ccg ctg tcg 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 gcg tcg atc tcg 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

ccg cag gtg 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 acg ctg aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tcg cgc gtc gaa ccc 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

acg cac 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> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<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 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> Artificial			
<220><223> LV3b DNA			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(336)			
<400> 44			
gac 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 tcg atc tcg 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	
ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg 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 acg ctg aag atc 240			
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
tcg 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 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> 45			
<211> 112			

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<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 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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: LV4 DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 46

gac 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 tcg atc tcg 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
ccg cag gtg ctg atc tac ggc gtg 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 acg ctg aag atc	240	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
tcg cgc gtc gaa ccc 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
acg cac 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> 47		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Synthetic Construct		
<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 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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: HVO DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 48

gaa gtg cag 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

tcg ctg cgc ctg tcg 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 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 tcg tac gac ggc tcg tcg 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 tcg cgc 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

gcg cgc cat cgc ggc tac tac tac tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac 336

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr

100	105	110	
tgg ggg cag ggg acg atg gtg acc gtg tcg tcc			369
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 49			
<211> 123			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic Construct			
<400> 49			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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> Artificial			
<220><223> description of the artificial sequence: HV1 DNA			
<220><221> CDS			

<222> (1)..(369)

<400> 50

gaa gtg cag ctt gtc gaa tcc ggc ggc gtc gtg cag ccc ggg cgc 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1	5	10	15	
tcg ctg cgc ctg tcg 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 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 tcg tac gac ggc tcg 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 tcg cgc 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 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 tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac			336
Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr			
100	105	110	
tgg ggg cag ggg acg atg gtg acc gtc tcg tcc			369
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser			

115	120	
-----	-----	--

<210> 51

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: HV2a DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 52

gaa gtg cag ctt gtc gaa tcc ggc ggc gtc gtg cag ccc ggg cgc 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

tcg ctg cgc ctg tcg 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 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 tcg tac gac ggc tcg tcg 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 tcg cgc 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 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 tac tcc ggc gcc tac ttc gac tac 336
 Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 tgg ggg cag ggc gtg atg gtg acc gtg tcg tcc 369
 Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 53
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <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 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> Artificial
 <220><223> description of the artificial sequence: HV2b DNA
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(369)
 <400> 54
 gaa gtg cag ctt gtc gaa tcc ggc ggc ggc gtc gtt cag ccc ggg cgc 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcg atg cgc ctg tcg tgc gcc gcg tcc ggc ttc acg ttc tcg aac tac 96
 Ser Met 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 tcg tac gac ggc tcg tcg 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 tcg cgc 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
 gcg cgc cat cgc ggc tac tac tac tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac 336

 Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 tgg ggg cag ggc gtg atg gtg acc gtg tcg tcc 369
 Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 55
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 55
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: HV3 DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 56

gaa gtg cag ctt gtc gaa tcc ggc ggc gtc gtt cag ccc ggg cgc 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

tcg atg cgc ctg tcg tgc gcc gcg tcc ggc ttc acg ttc tcg aac tac 96

Ser Met 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 tcg tac gac ggc tcg 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 tcg cgc 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 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 tac tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac 336

Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

tgg ggg cag ggc gtg atg gtg acc gtg tcg tcc 369

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 57

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: HV4 DNA

<220><221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 58

gaa gtg cag ctt gtc gaa tcc ggc ggc gtc gtt cag ccc ggg cgc 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

tcg atg cgc ctg tcg tgc gcc gcg tcc ggc ttc acg ttc tcg aac tac	96		
Ser Met 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 tcg tac gac ggc tcg 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 tcg cgc gac aac gcg aag tcg tcg 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 tcg 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 tac tcc ggc gcc ggc tac ttc gac tac	336		
Ala Arg His Arg Gly Tyr Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr			
100	105	110	
tgg ggg cag ggc gtg atg gtg acc gtg tcg tcc	369		
Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 59			
<211> 123			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic Construct			
<400> 59			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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 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> Artificial

<220><223> description of the artificial sequence: human CRTH2 azami-A

<400> 60

catggatccg ccaccatgtc ggccaaacgcc acactgaag 39

<210> 61

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223>

description of the artificial sequence: human CRTH2 azami-B

<400> 61

cataagctta ctcgaggtgc tgctcagc 28

<210> 62

<211> 1191

<212> DNA

<213> Macaca fascicularis

<400> 62

atgtccgcca acgccacgct gaagccgctc tgccccatcc tagaggagat gagccatctc 60

cggagccaca gcaacaccag catccgctac atcgaccacg cgaccgtgct gctgcacggg 120

ctggcctcg tgcgtggcct ggtggagaac ggagtcatcc tttcggtt gggctgcc
atgcgccaga ccgtggcac cacctgggtt ctacacctgg cactgtctga cctgtggcc 180
240

tctgtttccc tgccttctt cacctactt ttggccgtgg gccactcgtt ggagctggc
accacccctt gcaaaactgca tccctccatc ttcttctca acatgtttgc cagcggcttc
ctgttcagcg ccatcagcct ggaccgctgc ctgcagggtt tgccggcgtt gtggcgcag
aaccaccgca ccgtggccgc agcgcacaaa gtctgcctgg tgctctggc actagcgt
ctcaacacgg tgccctattt cgtgttccgg gacaccatct cacggcttgg tggcgcattc
atgtgtact acaacgtgt gctcctgaac ccggggcctt accgtgacgc cacgtgcaac
tcgcgccagg cggccctggc agtcagcaag ttccgttgg cttccgtt gcccgtggc 300
360
420
480
540
600
660

atcatcgcc tggccatgc ggccgtgagc ctgcgtactgc agcaccgcgg acgcccgg
cccgccgct ttgtgcgcct ggtggcggcc gtcgtggcgg cttcgact ctgtgggg
cccttaccacg tttcagcct gctggaggcg cggcgcacg ccaaccccg gttcggcc
cttgcgttgc ggggctgcc cttcgactt accgtggcctt tttcaacag cgtggcaac
ccgggtgtct acgtgtcac ctggccgac atgcgtgcga agtgcggcg ctcgtgcgc
acgggtgtgg agagcgtgt ggtggacgc acgcagctgg gtggcgggg aagcagccgc
cgccgccccc gcacccctc cacggccgc tcggcctctt ctttagtct cagcagccgc 720
780
840
900
960
1020
1080

cccgaggaac ggcggggccc cgcgcgcctc ttggctggc tgctggcgg ctgcgcagcg
tcccccaga gggcccccctt gaaccggcg ctgagcagca cttcgagttt g 1140
1191

<210> 63

<211> 396

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<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 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 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> Artificial			
<220><223> description of the artificial sequence: cyano CRTH2 azami-A			
<400> 64			
catggatccg ccaccatgtc cgccaaacgcc acgctgaag			39
<210> 65			
<211> 28			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> description of the artificial sequence: cyano CRTH2 azami-B			
<400> 65			
cataagctta ctcgagggtgc tgctcagc			28