

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6077745号
(P6077745)

(45) 発行日 平成29年2月8日(2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月20日(2017.1.20)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
A O 1 K	67/027	(2006.01)	A O 1 K	67/027	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	

請求項の数 17 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-534331 (P2011-534331)	(73) 特許権者	000149837
(86) (22) 出願日	平成22年9月30日 (2010.9.30)		富士フイルムR1ファーマ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/067141		東京都中央区京橋二丁目14番1号
(87) 国際公開番号	W02011/040565	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成23年4月7日 (2011.4.7)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	平成25年8月6日 (2013.8.6)	(74) 代理人	100077562
審査番号	不服2015-17224 (P2015-17224/J1)		弁理士 高野 登志雄
審査請求日	平成27年9月18日 (2015.9.18)	(74) 代理人	100096736
(31) 優先権主張番号	特願2009-226143 (P2009-226143)		弁理士 中嶋 俊夫
(32) 優先日	平成21年9月30日 (2009.9.30)	(74) 代理人	100117156
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人
		(72) 発明者	加藤 幸成
			山形県山形市桜町2-35-1402
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ポドブラニン抗体、及び抗ポドブラニン抗体を含む医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをエピトープとする抗ポドブラニン抗体であって、

以下の a) ~ f) に示すポリペプチドを含み、ヒトFc領域を含むヒトキメラ型抗体：

a) 配列番号：6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 ；

b) 配列番号：7 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 ；

c) 配列番号：8 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 ；

d) 配列番号：9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1 ；

e) 配列番号：10 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 ；及び、

f) 配列番号：11 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 。

【請求項2】

以下のポリペプチドを含む、請求項1に記載の抗体：

i) 配列番号：18 に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域 (VH)、又は配列番号：18 に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域 (VH) ；及び

ii) 配列番号：19 に示す軽鎖可変領域 (VL)、又は配列番号：19 に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域 (VL) 。

【請求項3】

10

20

配列番号：37に示すアミノ酸配列からなる重鎖、又は配列番号：37に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、

配列番号：39に示すアミノ酸配列からなる軽鎖、又は配列番号：39に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖と、を含む請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】

Fc領域に1以上のN-結合型糖鎖が結合し、該N-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体。

10

【請求項5】

抗がん活性を有する物質を結合させた、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項6】

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体をコードするDNA。

【請求項7】

請求項6に記載のDNAを含むベクター。

【請求項8】

請求項7に記載のベクターを含む形質転換体。

【請求項9】

請求項7に記載のベクターを含み、GDP-フコースの合成に關与する酵素の活性、又は-1,6-フコシルトランスフェラーゼの活性が低下又は欠失した細胞からなる形質転換体。

20

【請求項10】

請求項9に記載の形質転換体を培養する工程と、
得られた培養物から抗ポドプラニン抗体を精製する工程と、を含む請求項4に記載の抗体を含む抗体組成物の製造方法。

【請求項11】

請求項7に記載のベクターを含むトランスジェニック昆虫。

【請求項12】

請求項11に記載のトランスジェニック昆虫又はその分泌物から抗ポドプラニン抗体を抽出する工程を含む、請求項4に記載の抗体を含む抗体組成物の製造方法。

30

【請求項13】

請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項14】

抗体依存性細胞障害活性及び補体依存性細胞障害活性を有する、請求項13に記載の医薬組成物。

【請求項15】

抗腫瘍活性及び/又は腫瘍増殖抑制活性を有する、請求項13又は14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

ポドプラニンを発現する腫瘍、血栓症及び動脈硬化症からなる群の少なくとも一の疾患の治療剤である、請求項13～15のいずれか1項に記載の医薬組成物。

40

【請求項17】

前記ポドプラニンを発現する腫瘍が、脳腫瘍、中皮腫、精巣腫瘍(セミノーマ)及び扁平上皮がんからなる少なくとも一の腫瘍である請求項16に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な抗ポドプラニン抗体、及び抗ポドプラニン抗体を含む抗がん剤等に関する。

50

【背景技術】

【0002】

がん細胞の血行性転移において、がん細胞による血小板凝集が認められることが報告されている。ほとんどのがん細胞は血管に侵入すると、宿主の免疫系による攻撃や物理的衝撃によって破壊される。しかしながら、血小板凝集を引き起こすことにより、これらの過程から保護され、転移が可能になると考えられている(図13)。一方、血小板凝集はがん細胞の血管内皮細胞への接着を促し、また増殖因子を放出することにより、がん細胞の局所的な増殖も引き起こすと考えられている。さらに、がん細胞による血小板の凝集塊が毛細血管に詰まることも、血行性転移の促進に寄与している。

【0003】

マウス結腸がん細胞株 colon 26 を繰り返し実験的に肺転移させることで、高転移性株 NL - 17 細胞と低転移性株 NL - 14 細胞が樹立された(非特許文献1)。さらに、NL - 17 細胞に高反応性を示し、NL - 14 細胞には低反応性を示すモノクローナル抗体 8F11 抗体を作製した。in vitro の実験で、NL - 17 細胞はマウスの血小板凝集を引き起こしたが、8F11 抗体によりその活性は阻害された。また、in vivo の実験で、NL - 17 細胞の実験的肺転移が8F11 抗体の投与によって阻害された。これらのことから、NL - 17 細胞は、8F11 抗体に認識される血小板凝集因子を発現することによってマウス血小板を凝集させ、その結果、肺転移を起こすことが示唆された。この血小板凝集因子が後にポドプラニン(別名: Aggrus、アグラス)と名付けられた。

【0004】

その後、8F11 抗体カラムとWGAカラムを使ってNL - 17 細胞からマウスのポドプラニタンパク質が精製された(非特許文献2)。精製されたポドプラニンは、血漿成分非存在下で、濃度依存的にマウスの血小板凝集を引き起こし、さらにこの凝集反応は、8F11 抗体によって完全に阻害された。

【0005】

本発明者らは、これまでにポドプラニンの遺伝子クローニングに成功した(非特許文献3)。ポドプラニンは、C末端に膜貫通部位を有するI型膜貫通型タンパク質である。ヒトポドプラニンは、マウスポドプラニンとホモロジーが低いにも関わらず、マウスの血小板凝集を引き起こし、逆にマウスポドプラニンはヒトの血小板凝集を引き起こす。マウスポドプラニンの中和抗体8F11 抗体のエピトープ解析や、詳細な変異実験により、EDxxVTPG という配列の3回繰り返し(PLAGドメイン)のスレオニン(Thr)がポドプラニンによる血小板凝集の活性中心であり、種を越えて保存されていることが明らかとなった(非特許文献4)。ポドプラニンはその分子量の約半分が糖鎖であるが、糖鎖合成不全の変異CHO細胞(Lec1, Lec2, Lec8)を用いることにより、PLAGドメインのThrに付加されているO-結合型糖鎖のシアル酸が血小板凝集の活性中心であることがわかった(非特許文献5)。

【0006】

また、本発明者らは、ヒトポドプラニンを精製するために、特異性が高いラットモノクローナル抗体NZ - 1 抗体を作製した(非特許文献6)。NZ - 1 抗体は、ウェスタンブロットやフローサイトメトリー、免疫組織染色に有用なだけでなく、免疫沈降においても感度及び特異度が高い抗体として利用できることがわかった。質量分析計(MS)を使った詳細な糖鎖構造解析(特にO-結合型糖鎖)には数十μgの精製タンパク質が必要となるため、ヒトポドプラニンを高発現しているがん細胞株のスクリーニングも同時に行った。その結果、NZ - 1 抗体を用いて、ヒトポドプラニンを高発現しているヒト膠芽腫細胞LN319からヒトポドプラニンを大量に精製することができた(非特許文献7)。

【0007】

さらに、ヒトポドプラニンの詳細な糖鎖構造解析を行った結果、ヒトポドプラニンの血小板凝集の活性中心は、PLAGドメインのThr52に付加されたdisialyl-core1構造であることが明らかとなった(非特許文献7)。

10

20

30

40

50

【0008】

本発明者らはまた、ポドブラニンの血小板上受容体が、C型レクチン様受容体のCLEC-2 (C-type lectin-like receptor-2) であることを見出した(非特許文献8)。CLEC-2のFcキメラや膜型発現株を作製したところ、ポドブラニンとCLEC-2が特異的に結合した。また、CLEC-2のFcキメラによってポドブラニンによる血小板凝集が阻害された。

【0009】

さらに、ポドブラニンとCLEC-2の反応がPLAGドメインを介して起こっていることを確かめるため、PLAGドメインのThr52のみにO-結合型糖鎖を付加した様々な糖ペプチドを*in vitro*で合成した。その結果、PLAGドメインにdisialyl-core1構造を付加した糖ペプチドのみがCLEC-2と高い反応性を示した(非特許文献9)。

10

【0010】

NZ-1抗体はポドブラニンとCLEC-2との結合を阻害し、ポドブラニンによる血小板凝集も濃度依存的に阻害した。また、NZ-1抗体をポドブラニン発現細胞と共に尾静注すると、肺転移も有意に抑制した(非特許文献9)。

本発明者らはまた、6種類のポドブラニン-Fcキメラと21種類のペプチドを合成し、NZ-1の最小エピトープがAMPGAEであること、また、NZ-1との強固な結合のためには、GVAMPGAE DDの10アミノ酸が必要であることを確認した。

なお、他のエピトープを認識する抗ポドブラニン抗体(D2-40、AB3、18H5及びラビットポリクローナル抗体)は、ポドブラニンとCLEC-2の相互作用を阻害しなかった(非特許文献10)。

20

【0011】

以上の結果から、ヒトポドブラニンは、CLEC-2に結合することにより血小板凝集を起こし、さらにはがんの血行性転移に重要な役割を果たすことが示され、がん治療のターゲットとなりうることが示唆された。

【0012】

ところで、近年、疾患に関連するターゲットに対する抗体を用いる抗体医薬品が開発されている。抗体は一对のジスルフィド結合で安定化された2本の重鎖(H鎖)と2本の軽鎖(L鎖)が会合した構造をとる。重鎖は、重鎖可変領域VH、重鎖定常領域CH1、CH2、CH3、及びCH1とCH2の間に位置するヒンジ領域からなり、軽鎖は、軽鎖可変領域VLと軽鎖定常領域CLとからなる。この中で、VHとVLからなる可変領域断片(Fv)が、抗原結合に直接関与し、抗体に多様性を与える領域である。また、VL、CL、VH、CH1からなる抗原結合領域をFab領域と呼び、ヒンジ領域、CH2、CH3からなる領域をFc領域と呼ぶ。

30

【0013】

抗体医薬の薬効メカニズムは、抗体が有する2つの生物活性に基づいている。一つは標的抗原特異的な結合活性であり、結合することによって標的抗原分子の機能を中和する活性である。標的抗原分子の機能の中和はFab領域を介して発揮される。抗原分子に対する中和活性を利用した抗体医薬としては、インフリキシマブやベバシズマブが知られている。

40

【0014】

もう一つは、エフェクター活性と呼ばれる抗体の生物活性である。エフェクター活性は、抗体のFc領域を介して、抗体依存性細胞障害活性(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)、補体依存性細胞障害活性(complement-dependent cytotoxicity; CDC)、アポトーシスの直接誘導等の態様で発揮される。エフェクター活性を利用して薬効を発現する抗体医薬としてはリツキシマブやトラスツズマブが挙げられる(非特許文献11)。

中和活性とエフェクター活性は、それぞれ独立しており、いずれかの活性を有する抗体

50

が他方の活性を有するとは限らない。また、A D C C 活性やC D C 活性は抗体のサブクラスに依存しており、A D C C 活性を持っていてもC D C 活性があるとは限らず、またC D C 活性を持っていてもA D C C 活性があるとは限らない。

【0015】

抗体医薬の活性として、特にエフェクター活性が重要視されている。例えば、ヒトのF c 受容体I I I aには、リツキシマブに対して親和性の高い多型と低い多型が存在するが、親和性の高い多型を有する非ホジキンリンパ腫患者において、より優れた臨床効果が得られている。また、トラスツズマブによる乳がん治療においても、末梢血をエフェクター細胞として用いた*in vitro*のA D C C 活性測定において、有意に高い活性が得られた患者において、より高い治療効果が観察されている。これらの結果は、臨床的に効果のある抗体医薬を開発するためにA D C C 活性が重要であることを示唆している。従って、特に抗がん剤について、臨床応用可能で、かつエフェクター活性の強い抗体医薬が求められている（非特許文献11）。

10

【0016】

抗体のA D C C 活性を増強する手段として、抗体のF c 領域のアミノ酸配列を改変する方法とF c 領域に結合している糖鎖の構造を制御する方法がある。しかしながら、これらの方法によってA D C C 活性が必ず増強されるものではない。また、増強される場合も、アミノ酸配列の改変や、糖鎖構造の制御には種々の態様があり、所定の抗体についてA D C C 活性を増強する方法を見出すのは容易ではない。

【0017】

20

これまでに、ポドプラニン、脳腫瘍、中皮腫、精巣腫瘍、卵巣がん、及び各種扁平上皮がん（口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、食道がん、肺癌、皮膚がん、子宮頸がん）などに高発現していることが報告されている（非特許文献12 - 15）。特に、脳腫瘍の中でも星細胞系腫瘍においては、悪性度と相関してポドプラニンが発現している。従って、結合活性のみでなく、A D C C 活性やC D C 活性等のエフェクター活性も有する抗ポドプラニン抗体があれば、これらのがんにおいても抗がん作用が得られることが期待される。

しかしながら、上述のとおり、これまでN Z - 1 抗体については、ポドプラニンとC L E C - 2 との結合を阻害することによる血小板凝集中和活性しか確認されておらず、従って、*in vivo*においてもがんの血行性転移との関連しか確認されていなかった。

【0018】

30

一方、抗体医薬の研究開発においては、ヒト体内における免疫原性も問題となる。マウスやラットなどのげっ歯類で作製されるモノクローナル抗体は、ヒト体内では免疫原性を示し、中和抗体の出現による効果の減弱やアレルギー反応の原因となり得る。これを回避するため、当初げっ歯類で作製されたモノクローナル抗体を、ヒトに対する抗原性の低いキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体にする技術が開発されている。

【0019】

しかしながら、キメラ抗体やヒト化抗体の製造方法には、任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在しない。他種から得られた抗体を基にキメラ抗体を作製しても、結合活性、エフェクター活性のいずれも失われる場合がある。また、マウスやラットなどのげっ歯類で作製されるモノクローナル抗体をキメラ抗体やヒト化抗体にした場合、同等の活性を得られ、且つ抗原性の低いものが得られるとは限らない。

40

【0020】

上述のとおり、N Z - 1 抗体については、これまでラットで作製したモノクローナル抗体のみが報告され、当該抗体がポドプラニンとC L E C - 2 の結合を阻害して中和する活性のみが知られていた。また、N Z - 1 抗体のアミノ酸配列、C D R のアミノ酸配列やこれをコードする遺伝子配列は明らかとなっておらず、具体的にキメラ抗体等が設計された例もなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0021】

50

- 【非特許文献 1】Tsuruo T., Yamori T. et al., Cancer Res. 43, 5437-5442, 1983.
 【非特許文献 2】Toyoshima M., Nakajima M. et al., Cancer Res. 55, 767-773, 1995.
 【非特許文献 3】Kato Y., Fujita N. et al., J. Biol. Chem. 278, 51599-51605, 2003

【非特許文献 4】Kaneko MK., Kato Y. et al., Gene 378C:52-57, 2006.

【非特許文献 5】Kaneko M., Kato Y. et al., J. Biol. Chem. 279, 38838-38843, 2004

【非特許文献 6】Kato Y., Kaneko MK. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 349:1301-1307, 2006

【非特許文献 7】Kaneko MK., Kato Y. et al., FEBS Lett. 581, 331-336, 2007. 10

【非特許文献 8】Suzuki-Inoue K., Kato Y. et al., J. Biol. Chem. 282, 25993-26001, 2007.

【非特許文献 9】Kato Y., Kaneko MK. et al., Cancer Sci. 99, 54-61, 2008.

【非特許文献 10】Ogasawara S., et al., Hybridoma, 27(4):259-267, 2008.

【非特許文献 11】Sato M. et al., Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 18, 129-136, 2006.

【非特許文献 12】Kato Y., Sasagawa I. et al., Oncogene 23, 8552-8556, 2004.

【非特許文献 13】Kato Y., Kaneko M. et al., Tumor Biol. 26,195-200, 2005.

【非特許文献 14】Mishima K., Kato Y. et al., Acta Neuropathol.111(5):483-488, 2006a 20

【非特許文献 15】Mishima K., Kato Y. et al., Acta Neuropathol.111(6):563-568. 2006b

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

本発明は、結合活性や中和活性に加えてエフェクター活性も高く、且つヒトやマウスにおいて抗原性の低い抗ポドプラニン抗体等を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0023】

上記課題を解決するために、本発明者らが研究を重ねた結果、結合活性や中和活性しか確認されていなかったラットNZ-1抗体が、ポドプラニン陽性腫瘍細胞においてADC活性及びCDC活性も示すこと；ラットNZ-1抗体は、マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖抑制効果を示すこと；ラットNZ-1抗体の相補性決定領域（以下、「CDR」と表記する場合もある。）を用いたマウスキメラ抗体もヒトポドプラニンに結合すること；マウスキメラ抗体は、ポドプラニン陽性腫瘍細胞においてADC活性及びCDC活性を示すこと；ラットNZ-1抗体のCDRを用いたヒトキメラ抗体もヒトポドプラニンに結合すること；ヒトキメラ抗体は、ラットNZ-1抗体及びマウスキメラ抗体に比較して著しく高い細胞障害活性を有すること等を確認し、本発明を完成するに至った。

【0024】

即ち、本発明は、

〔1〕配列番号：1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをエピトープとする抗ポドプラニン抗体（但し、配列番号：2に示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号：3に示すアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むラットNZ-1抗体を除く）；

〔2〕以下のa)～f)に示すポリペプチドの少なくとも1つを含む、上記〔1〕に記載の抗体：

a) 配列番号：6に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

b) 配列番号：7に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；

c) 配列番号：8に示すアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；

d) 配列番号：9に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

e) 配列番号：10に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；及び、

f) 配列番号：11に示すアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；

〔3〕以下のa')～f')に示すポリペプチドの少なくとも1つを含む、上記〔1〕に記載の抗体；

a') 配列番号：6に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、又は、配列番号：6に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

b') 配列番号：7に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、又は、配列番号：7に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；

c') 配列番号：8に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、又は、配列番号：8に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；

d') 配列番号：9に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、又は、配列番号：9に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

e') 配列番号：10に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、又は、配列番号：10に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；及び、

f') 配列番号：11に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、又は、配列番号11に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；

〔4〕以下のポリペプチドを含む、上記〔1〕に記載の抗体；

i) 配列番号：18に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域(VH)、配列番号：18に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域(VH)、又は、配列番号：18に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域(VH)；及び

ii) 配列番号：19に示す軽鎖可変領域(VL)、配列番号：19に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域(VL)、又は、配列番号：19に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域(VL)；

〔5〕以下のポリペプチドをさらに含む、上記〔4〕に記載の抗体；

iii) 配列番号：20に示すアミノ酸配列からなる重鎖定常領域1(CH1)、配列番号：20に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖定常領域1(CH1)、又は、配列番号：20に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖定常領域1(CH1)；及び

iv) 配列番号：21に示すアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域(CL)、配列番号：21に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域(CL)、又は、配列番号：21に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域(CL)；

〔6〕ヒトFc領域又はマウスFc領域を含む、上記〔1〕から〔5〕のいずれか1項に記載の抗体；

〔7〕配列番号：23に示すアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号：23に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖、又は、配列番号：23に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有する重鎖と、

配列番号：3に示すアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号：3に示すアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖、又は、配列番号：3に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有する軽鎖と、

10

20

30

40

50

を含む上記〔 6 〕に記載の抗体；

〔 8 〕配列番号： 37 に示すアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号： 37 に示すアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖、又は、配列番号： 37 に示すアミノ酸配列に対して 60 % 以上の同一性を有する重鎖と、

配列番号： 39 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号： 39 に示すアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖、又は、配列番号： 39 に示すアミノ酸配列に対して 60 % 以上の同一性を有する軽鎖と、を含む上記〔 6 〕に記載の抗体；

〔 9 〕Fc 領域に 1 以上の N - 結合型糖鎖が結合し、該 N - 結合型糖鎖の還元末端の N - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない、上記〔 1 〕から〔 8 〕のいずれか 1 項に記載の抗体；

〔 10 〕抗がん活性を有する物質を結合させた、上記〔 1 〕から〔 9 〕のいずれか 1 項に記載の抗体；

〔 11 〕上記〔 1 〕から〔 9 〕のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする DNA ；

〔 12 〕上記〔 11 〕に記載の DNA を含むベクター；

〔 13 〕上記〔 12 〕に記載のベクターを含む形質転換体；

〔 14 〕上記〔 12 〕に記載のベクターを含み、GDP - フコースの合成に關与する酵素の活性、又は - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼの活性が低下又は欠失した細胞からなる形質転換体；

〔 15 〕上記〔 14 〕に記載の形質転換体を培養する工程と、

得られた培養物から抗ポドプラニン抗体を精製する工程と、を含む上記〔 9 〕に記載の抗体を含む抗体組成物の製造方法；

〔 16 〕上記〔 12 〕に記載のベクターを含むトランスジェニック昆虫；

〔 17 〕上記〔 16 〕に記載のトランスジェニック昆虫又はその分泌物から抗ポドプラニン抗体を抽出する工程を含む、上記〔 9 〕に記載の抗体を含む抗体組成物の製造方法；

〔 18 〕以下のいずれかの抗体を有効成分として含む医薬組成物；

(A) 上記〔 1 〕から〔 9 〕のいずれか 1 項に記載の抗体；及び

(B) 配列番号： 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号： 3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖と、を含むラット NZ - 1 抗体；

〔 19 〕抗体依存性細胞障害活性及び/又は補体依存性細胞障害活性を有する、上記〔 18 〕に記載の医薬組成物；

〔 20 〕抗腫瘍活性及び/又は腫瘍増殖抑制活性を有する、上記〔 18 〕又は〔 19 〕に記載の医薬組成物；

〔 21 〕ポドプラニンを発現する腫瘍、血栓症及び動脈硬化症からなる群の少なくとも一の疾患の治療剤である、上記〔 18 〕から〔 20 〕のいずれか 1 項に記載の医薬組成物；

〔 22 〕前記ポドプラニンを発現する腫瘍が、脳腫瘍、中皮腫、精巣腫瘍(セミノーマ)及び扁平上皮がんからなる少なくとも一の腫瘍である、上記〔 21 〕に記載の医薬組成物；

〔 23 〕以下のいずれかの抗体を投与することを含む、ポドプラニンを発現する腫瘍、血栓症及び動脈硬化症からなる群の少なくとも一の疾患の治療方法；

(A) 上記〔 1 〕から〔 9 〕のいずれか 1 項に記載の抗体；及び

(B) 配列番号： 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号： 3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖と、を含む抗体；

〔 24 〕以下のいずれかのポリペプチド；

1) 配列番号： 6 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；

2) 配列番号： 7 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；

3) 配列番号： 8 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；

4) 配列番号： 9 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；

5) 配列番号： 10 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；

10

20

30

40

50

6) 配列番号：11に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；及び

7) 配列番号：6～11に示すアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号：6～11に示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、配列番号：1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識するペプチド、
に関する。

【発明の効果】

【0025】

本発明によれば、ADCC活性やCDC活性等のエフェクター活性を有する抗ポドブラニン抗体を得ることができる。エフェクター活性を有する抗ポドブラニン抗体は、がんの血行性転移の抑制のみでなく、ポドブラニンを高発現する腫瘍細胞の増殖を特異的に抑制することができる。従って、ポドブラニンの発現が見られる脳腫瘍、中皮腫、精巣腫瘍、卵巣がん、及び各種扁平上皮がん（口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、食道がん、肺癌、皮膚がん、子宮頸がん）等の治療に効果的に用いられる。

また、本発明に係るヒトキメラ抗体は、著しく高いエフェクター活性を有し、且つ、ヒトに対する抗原性も低いと考えられるため、安全で高い効果を示す医薬品として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1A】図1Aは、中皮腫細胞（H2052細胞）におけるNZ-1抗体によるADCC活性の測定結果を示す。ラットNZ-1抗体によるADCC活性が確認された。

【図1B】図1Bは、中皮腫細胞（H226細胞）におけるNZ-1抗体によるADCC活性の測定結果を示す。ラットNZ-1抗体によるADCC活性が確認された。

【図1C】図1Cは、中皮腫細胞（MSTO-211H細胞）におけるNZ-1抗体によるADCC活性の測定結果を示す。ラットNZ-1抗体によるADCC活性は確認されなかった。

【図2A】図2Aは、中皮腫細胞（H2052細胞）におけるポドブラニンの発現をフローサイトメトリーにより確認した結果を示す。ポドブラニンとラットNZ-1抗体の結合が見られ、ポドブラニンが発現していることが確認された。

【図2B】図2Bは、中皮腫細胞（H226細胞）におけるポドブラニンの発現をフローサイトメトリーにより確認した結果を示す。ポドブラニンとラットNZ-1抗体の結合が見られ、ポドブラニンが発現していることが確認された。

【図2C】図2Cは、中皮腫細胞（MSTO-211H細胞）におけるポドブラニンの発現をフローサイトメトリーにより確認した結果を示す。ポドブラニンの発現は見られなかった。

【図3】図3は、ラットNZ-1抗体による腫瘍増殖抑制効果を調べた結果を示す。CHO/podoplaninを皮下に移植したマウスにラットNZ-1抗体を投与したところ、コントロール群に比較して、腫瘍の成長が有意に抑制された。

【図4】図4は、ラットNZ-1抗体を用いて動脈硬化病変におけるポドブラニンを検出した結果を示す。進行病変及びマクロファージ浸出性早期病変にポドブラニンが高発現していることが確認された。

【図5】図5は、ラットNZ-1抗体及びマウスキメラ型NZ-1抗体をSDS-PAGEにて泳動した結果を示す。

【図6】図6は、ラットNZ-1抗体及びヒトキメラ型NZ-1抗体をSDS-PAGEにて泳動した結果を示す。

【図7】図7は、ポドブラニンに対するラットNZ-1抗体、マウスキメラ型NZ-1抗体、及びヒトキメラ型NZ-1抗体の反応性をフローサイトメトリーで確認した結果を示す。いずれの抗体もヒトポドブラニンを発現するヒト膠芽腫細胞LN319または中皮腫細胞H226とよく反応することが確認された。

10

20

30

40

50

【図 8 A】図 8 A は、H 2 2 6 細胞におけるラット N Z - 1 抗体による C D C 活性の測定結果を示す。ラット N Z - 1 抗体が C D C 活性を有することが確認された。

【図 8 B】図 8 B は、H 2 2 6 細胞におけるマウスキメラ型 N Z - 1 抗体による C D C 活性の測定結果を示す。マウスキメラ型 N Z - 1 抗体も C D C 活性を有することが確認された。

【図 9】図 9 は、H 2 2 6 細胞におけるラット N Z - 1 抗体、マウスキメラ型 N Z - 1 抗体、及びヒトキメラ型 N Z - 1 抗体による A D C C 活性の測定結果を示す。ヒトキメラ型 N Z - 1 抗体は、ラット N Z - 1 抗体及びマウスキメラ型 N Z - 1 抗体に比較して、著しく高い A D C C 活性を示した。

【図 1 0】図 1 0 は、L N 3 1 9 細胞におけるラット N Z - 1 抗体、マウスキメラ型 N Z - 1 抗体、及びヒトキメラ型 N Z - 1 抗体による A D C C 活性の測定結果を示す。ヒトキメラ型 N Z - 1 抗体は、ラット N Z - 1 抗体及びマウスキメラ型 N Z - 1 抗体に比較して、著しく高い A D C C 活性を示した。

10

【図 1 1】図 1 1 は、H 2 2 6 細胞におけるラット N Z - 1 抗体、マウスキメラ型 N Z - 1 抗体、及びヒトキメラ型 N Z - 1 抗体による C D C 活性の測定結果を示す。ヒトキメラ型 N Z - 1 抗体は、ラット N Z - 1 抗体及びマウスキメラ型 N Z - 1 抗体に比較して、著しく高い C D C 活性を示した。

【図 1 2】図 1 2 は、L N 3 1 9 細胞におけるラット N Z - 1 抗体、マウスキメラ型 N Z - 1 抗体、及びヒトキメラ型 N Z - 1 抗体による C D C 活性の測定結果を示す。ヒトキメラ型 N Z - 1 抗体は、ラット N Z - 1 抗体及びマウスキメラ型 N Z - 1 抗体に比較して、著しく高い C D C 活性を示した。

20

【図 1 3】図 1 3 は、血小板凝集とがんの転移の関係を示す概念図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 7 】

(抗ポドプラニン抗体)

本発明は、配列番号： 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをエピトープとする抗ポドプラニン抗体（但し、配列番号： 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号： 3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むラット N Z - 1 抗体を除く。以下、「本発明の抗ポドプラニン抗体」ということがある）を提供する。

本発明の抗ポドプラニン抗体は新規な抗体であり、ポドプラニンと C L E C - 2 との結合を阻害するのみでなく、A D C C 活性や C D C 活性等の高いエフェクター活性を有し、腫瘍増殖抑制能を有するものである（後述）。

30

【 0 0 2 8 】

これまでも、配列番号： 2 に示すアミノ酸配列からなる重鎖と配列番号： 3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むラット N Z - 1 抗体がポドプラニンと C L E C - 2 の結合を阻害し、その結果、血行性転移を抑制しうることは知られていた。しかしながら、結合阻害活性を有する抗体が同時に高いエフェクター活性を有することはむしろ稀であり、本発明の抗ポドプラニン抗体が、ポドプラニンと C L E C - 2 の結合阻害活性のみならず、エフェクター活性を示すことは、当業者が予測し得ないことであった。

【 0 0 2 9 】

40

本明細書において、「配列番号： 1 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド」とは、ラット N Z - 1 抗体が認識する、ポドプラニン上の最小エピトープである（非特許文献 1 0）。

【 0 0 3 0 】

本発明の抗ポドプラニン抗体は、以下の（ 1 ）～（ 3 ）に示す重鎖相補性決定領域（重鎖 C D R 1 ~ 重鎖 C D R 3 ）、及び（ 4 ）～（ 6 ）に示す軽鎖相補性決定領域（軽鎖 C D R 1 ~ 軽鎖 C D R 3 ）の少なくとも一つを含むことが好ましい。これらの重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R は、本発明者らが、今般、ラット N Z - 1 抗体に基づいて初めて決定したものである。

（ 1 ）配列番号： 6 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1、配列番号： 6 に示すアミ

50

ノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1、又は、配列番号：6 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1

(2) 配列番号：7 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2、配列番号：7 に示すアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2、又は、配列番号：7 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2

(3) 配列番号：8 に示すアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3、配列番号：8 に示すアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3、又は、配列番号：8 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3

10

(4) 配列番号：9 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、配列番号：9 に示すアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、又は、配列番号：9 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1

(5) 配列番号：10 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、配列番号：10 に示すアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、又は、配列番号：10 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2

(6) 配列番号：11 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3、配列番号：11 に示すアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3、又は、配列番号：11 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3

20

【0031】

本発明の抗ポドプラニン抗体は、本発明の効果を奏する限り、上記重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R をいくつ含むものであってもよいが、好ましくは 3 つ以上、より好ましくは 5 つ以上、最も好ましくは 6 つ含む。

【0032】

本発明の抗ポドプラニン抗体は、上記重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R のうち、以下の組み合わせを有するものが好ましく用いられる。

30

- a) 配列番号：6 に示すアミノ酸配列からなる C D R 1；
- b) 配列番号：7 に示すアミノ酸配列からなる C D R 2；
- c) 配列番号：8 に示すアミノ酸配列からなる C D R 3；
- d) 配列番号：9 に示すアミノ酸配列からなる C D R 1；
- e) 配列番号：10 に示すアミノ酸配列からなる C D R 2；及び、
- f) 配列番号：11 に示すアミノ酸配列からなる C D R 3。

【0033】

本明細書において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸のみならずアミノ酸変異体及び誘導體といったような非天然アミノ酸を含む。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本明細書におけるアミノ酸として、例えば、天然タンパク原性 L - アミノ酸；D - アミノ酸；アミノ酸変異体及び誘導體などの化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 - アラニン、オルニチンなどの天然非タンパク原性アミノ酸；及びアミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられることを理解するであろう。非天然アミノ酸の例として、 - メチルアミノ酸（ - メチルアラニンなど）、D - アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（2 - アミノ - ヒスチジン、 - ヒドロキシ - ヒスチジン、ホモヒスチジン、 - フルオロメチル - ヒスチジン及び - メチル - ヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）及び側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）が挙げられる。

40

【0034】

50

本明細書において「ポリペプチド」とは、アミノ酸がペプチド結合によって連なった分子を意味し、天然又は人工のタンパク質、タンパク質断片を含む。

【0035】

本明細書において、「1から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する」という場合、欠失、置換等されるアミノ酸の個数は、結果として得られるポリペプチドがCDRとしての機能を保持する限り特に限定されないが、1～4個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個程度であるか、あるいは全体の長さの20%以内、好ましくは10%以内である。置換又は付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸又はアミノ酸アナログであり得、好ましくは天然のアミノ酸である。欠失、置換又は付加の位置は、CDRとしての機能が保持される限り、もとのポリペプチドのどこであってもよい。

10

【0036】

本明細書において、「配列番号：Xに示すアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有する」とは、二つのポリペプチドのアミノ酸配列の一致が最大になるように整列させたときに、共通するアミノ酸残基数の、配列番号：Xに示す全アミノ酸数に対する割合が60%以上であることを意味する。本発明のCDRは、配列番号：6～11に示すアミノ酸配列に対して60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも含む。かかるポリペプチドも、CDRとしての機能を保持するものである。

【0037】

配列番号：6～11のいずれかに示されるアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDRや、配列番号：6～11のいずれかに示されるアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDRは、部位特異的変異導入法、ランダム変異導入法、チェーンシャフリング法、CDRウォーキング法などの公知の方法を用いて作製され得る。これらの方法によれば、ファージディスプレイ法によってCDRに種々の変異を有する抗体又は抗体断片をファージ表面に提示させ、抗原を使用してスクリーニングすることにより、より親和性が成熟したCDRを得られることが当業者によく知られている（例えば、Wu et al., PNAS, 95:6037-6042(1998); Schier, R. et al., J. Mol. Biol. 263:551-567(1996); Schier, R. et al., J. Mol. Biol. 255:28-43(1996); Yang, W.P. et al., J. Mol. Biol., 254:392-403(1995)。)。

20

30

【0038】

本発明の抗体は、組み換え抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体等であってもよい。

また、本発明の抗ポドプラニン抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEのいずれのアイソタイプであってもよいが、好ましくはIgGである。

【0039】

本発明の抗ポドプラニン抗体は、配列番号：1に示すアミノ酸配列からなるエピトープを認識する限り、マウスキメラ抗体、ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体のほか、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv断片等の低分子抗体も含むが、これらに限定されない。

40

【0040】

本明細書において「キメラ抗体」あるいは「キメラ型抗体」とは、異なる種に由来する抗体の断片が連結されてなる抗体を意味する。

本発明の抗ポドプラニン抗体として好ましいキメラ抗体は、マウスキメラ抗体又はヒトキメラ抗体であり、前者は、配列番号：1に示すアミノ酸配列からなるエピトープを認識する可変領域とマウスに由来するFc領域を含み、後者は、同エピトープとヒトに由来するFc領域を含む。配列番号：1に示すアミノ酸配列からなるエピトープを認識する可変領域には、上記重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3が含まれることが好ましく、その他の領域、すなわち重鎖フレームワーク領域(FR)1～4及び、軽鎖FR1～4は、いずれの種に由来するものであってもよい。

50

【 0 0 4 1 】

本発明のマウスキメラ抗体としては、例えば、

- (1) ラット N Z - 1 抗体の F a b 領域とマウス抗体の F c 領域を含むもの；
- (2) ラット N Z - 1 抗体の V H 及び V L 領域と、マウス抗体の C H 1、C L、ヒンジ領域及び C H 2、C H 3 を含むもの；
- (3) 上記重鎖 C D R 1 ~ 3 及び軽鎖 C D R 1 ~ 3 を有し、重鎖及び軽鎖のそれぞれ 4 つのフレームワーク領域 (F R) を含むその他のすべての領域がマウス抗体に由来するもの、等が挙げられる。

また、本発明のマウスキメラ抗体は、一般に A D C C 活性が強いといわれるマウス I g G 2 a サブクラスとのキメラ抗体であることが好ましい。

10

【 0 0 4 2 】

本発明のマウスキメラ抗体としては、ラット N Z - 1 抗体の F a b 領域と、マウス抗体の F c 領域を含むものが好ましい。特に配列番号：23 に示すアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号：23 に示すアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖、又は、配列番号：23 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有する重鎖と、配列番号：3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号：3 に示すアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖、又は、配列番号：3 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有する軽鎖と、を含むマウスキメラ抗体が好ましい。

中でも、配列番号：23 に示すアミノ酸配列からなる重鎖と配列番号：3 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むマウスキメラ抗体が好ましい。

20

当該マウスキメラ抗体は、マウス F c として、I g G 2 a のサブクラスを使用しており、実施例に示すとおりポドプラニン陽性ヒト腫瘍細胞において A D C C 活性及び C D C 活性を示すことが観察された。

【 0 0 4 3 】

本発明のヒトキメラ抗体としては、例えば、

- (1) ラット N Z - 1 抗体の F a b 領域とヒト抗体の F c 領域を含むもの；
- (2) ラット N Z - 1 抗体の V H 及び V L 領域と、ヒト抗体の C H 1、C L、ヒンジ領域及び C H 2、C H 3 を含むもの、が挙げられる。

また、本発明のヒトキメラ抗体は、一般に A D C C 活性が強いといわれるヒト I g G 1 サブクラスとのキメラ抗体であることが好ましい。

30

【 0 0 4 4 】

本発明のヒトキメラ抗体としては、ラット N Z - 1 抗体の V H 及び V L 領域と、ヒト抗体の C H 1、C L、ヒンジ領域及び C H 2、C H 3 を含むものが好ましい。

特に配列番号：37 に示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号：37 に示すアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる重鎖、又は、配列番号：37 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有する重鎖と、配列番号：39 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号：39 に示すアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を有するアミノ酸配列からなる軽鎖、又は、配列番号：39 に示すアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有する軽鎖と、を含むマウスキメラ抗体が好ましい。

40

中でも、配列番号：37 に示すアミノ酸配列からなる重鎖と配列番号：39 に示すアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むヒトキメラ抗体が好ましい。

当該ヒトキメラ抗体は、ヒト I g G 1 サブクラスとのキメラ抗体であり、実施例に示すとおりポドプラニン陽性ヒト腫瘍細胞において、ラット N Z - 1 抗体やマウスキメラ抗体に比較して、著しく高い A D C C 活性及び C D C 活性を示すことが確認された。

【 0 0 4 5 】

本明細書において「ヒト化抗体」とは、非ヒト由来の抗体に特徴的なアミノ酸配列で、ヒト抗体の対応する位置を置換した抗体を意味し、例えば、上記重鎖 C D R 1 ~ 3 及び軽鎖 C D R 1 ~ 3 を有し、重鎖及び軽鎖のそれぞれ 4 つのフレームワーク領域 (F R) を含

50

むその他のすべての領域がヒト抗体に由来するもの等が挙げられる。かかる抗体は、CD R 移植抗体と呼ばれる場合もある。用語「ヒト化抗体」は、ヒトキメラ抗体を含む場合もある。

【0046】

本明細書において「低分子抗体」とは、抗体の断片又は抗体の断片に任意の分子を結合させたものであって、もとの抗体と同じエピトープを認識するものを意味する。具体的には、VL、VH、CL及びCH1領域からなるFab；2つのFabがヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結されているF(ab')₂；VL及びVHからなるFv；VL及びVHを人工のポリペプチドリンカーで連結した一本鎖抗体であるscFv；diabody型、scDb型、tandem scFv型、ロイシンジッパー型などの二重特異性抗体等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

本発明の抗ポドプラニン抗体として好ましい低分子抗体は、上記重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3を含む低分子抗体である。

【0047】

本明細書における「抗体」には、糖鎖付加等の修飾が加えられたものも含まれる。かかる抗体としては、例えば、Fc領域に1以上のN-結合型糖鎖が結合し、該N-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない抗体が挙げられる。

例えばIgG抗体のFc領域には、N-結合型糖鎖の結合部位が2ヶ所存在し、この部位に複合型糖鎖が結合している。N-結合型糖鎖とは、Asn-X-Ser/Thr配列のAsnに結合する糖鎖をいい、共通した構造Man₃GlcNAc₂Asnを有する。非還元末端の2つのマンノース(Man)に結合する糖鎖の種類により、高マンノース型、混成型、及び複合型等に分類される。

20

N-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)にはフコースが結合しうが、このフコースが結合していない場合、結合している場合に比較してADCC活性が著しく上昇することが知られている。このことは例えば、国際公開第2002/031140号パンフレットに記載されており、その開示は全体として参照により本明細書に組み込まれる。

ADCC活性が著しく向上することにより、抗体を医薬として用いる場合に投与量を少なくすることができるので、副作用を軽減させることが可能であると共に、治療費も低減させることができる。

30

【0048】

本発明はまた、上述した本発明の抗ポドプラニン抗体に抗がん活性を有する物質を結合させたものも含む。

本明細書において、「抗がん活性を有する物質」とは、腫瘍サイズの低下(遅延又は停止)、腫瘍の転移の阻害、腫瘍増殖の阻害(遅延又は停止)、及びがんに関連する一つ又は複数の症状の緩和、の少なくとも1つを生じさせる物質を意味する。具体的には、毒素、抗がん剤、ラジオアイソトープを挙げることができるがこれらに限定されない。

【0049】

抗がん活性を有する毒素としては、例えば、緑膿菌外毒素(PE)A又はその細胞障害性フラグメント(例えばPE38)、ジフテリア毒素、リシンA等が挙げられる。抗がん活性を有する毒素は、抗ポドプラニン抗体と共に毒素が取り込まれる細胞、即ちポドプラニンを発現している癌細胞のみに毒性を発揮するので、周囲の細胞に悪影響を与えず、特異的に効果を得られるという利点がある。

40

【0050】

抗がん剤としては、例えば、アドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ピンクリスチン、エピルピシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、アクラシノマイシン、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミド、プレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、タモキシフェン、デキサメタゾン等の低分子化合物や、免疫担当細胞を活性化する

50

サイトカイン（例えば、ヒトインターロイキン2、ヒト顆粒球マクrophージコロニー刺激因子、ヒトマクrophージコロニー刺激因子、ヒトインターロイキン12）等のタンパク質が挙げられる。

【0051】

抗がん活性を有するラジオアイソトープとしては、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{90}Y 等が挙げられる。ラジオアイソトープは、抗ポドプラニン抗体が結合する細胞、即ちポドプラニンを発現している細胞の周囲の細胞にも毒性を発揮する。一般に、腫瘍細胞は均一ではなく、すべての腫瘍細胞がポドプラニンを発現しているわけではないので、周囲のポドプラニン陰性の腫瘍細胞を殺すためにラジオアイソトープは有用である。なお、ラジオアイソトープを結合させる場合、抗ポドプラニン抗体はF a bやs c F vなどの低分子抗体であることが好ましい。

10

【0052】

上記抗がん活性を有する物質は、公知の方法によって抗ポドプラニン抗体に直接結合させることができる。また、例えばリポソーム等の担体に封入して抗ポドプラニン抗体に結合させてもよい。

上記抗がん活性を有する物質が蛋白質やポリペプチドの場合は、本発明の抗ポドプラニン抗体をコードするDNAと抗がん活性を有する物質をコードするDNAを連結し、適当な発現ベクターに挿入することにより、抗がん活性を有する物質と抗ポドプラニン抗体との融合タンパク質として発現させてもよい。

【0053】

（抗ポドプラニン抗体をコードするDNA）

また、本発明は、上述した本発明の抗ポドプラニン抗体をコードするDNAを含む。かかるDNAは、当業者が公知の方法に従って塩基配列を決定することができ、また公知の方法で調製することができる。

20

本発明の抗ポドプラニン抗体が、上述の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3を含むものである場合、本発明の抗ポドプラニン抗体をコードするDNAは、配列番号：12～14にそれぞれ示す塩基配列からなる重鎖CDR1～3をコードするDNA及び、配列番号：15～17にそれぞれ示す塩基配列からなる軽鎖CDR1～3をコードするDNAを含む。

【0054】

例えば、本発明の抗ポドプラニン抗体が、配列番号：23に示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号：3に示すアミノ酸配列からなる軽鎖とからなるマウスキメラ抗体である場合について説明する。

30

当該マウスキメラ抗体のVHとCH1、VLとCLは、ラットNZ-1抗体に由来するものである。これらをコードするDNAは、例えば、ラットNZ-1抗体を産生するハイブリドーマから標準的な手法により全RNAを調製し、市販のキットを用いてNZ-1抗体をコードするmRNAを調製した後、当該mRNAから逆転写酵素を用いてVH、CH1、VL及びCL領域のcDNAを合成し、PCR法により増幅して得ることができる。一方、ヒンジ領域、CH2及びCH3はマウスに由来し、これらをコードするDNAも同様の方法で得ることができる。

40

【0055】

次に、VLをコードするDNAとCLをコードするDNAとを作動的に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子を得ることができる。また、VH、CH1、ヒンジ領域、CH2及びCH3をコードするDNAを作動的に連結することにより、完全長重鎖遺伝子を得ることができるので、これらを併せて、マウスキメラ抗体をコードするDNAを得られることになる。

配列番号：23に示すアミノ酸配列からなる重鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号：24に、配列番号：3に示すアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号：5に示す。

【0056】

50

また、本発明の抗ポドブラニン抗体が、s c F vである場合、これをコードするDNAは、VH及びVLをコードするDNAを、リンカーをコードするペプチドをコードするDNAと作動的に連結することによって得ることができる。

【0057】

また、本発明の抗ポドブラニン抗体が、ヒト化抗体である場合、これをコードするDNAは、上述の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3と、ヒト抗体のフレームワーク領域を連結するように設計したDNAを、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成した後、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結することによって得ることができる。

【0058】

(ベクター)

本発明は、本発明の抗ポドブラニン抗体をコードするDNAを含むベクターを包含する。発現ベクターは、使用する宿主細胞にあわせて適宜選択することができ、例えば、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、カリフラワーマザイクウイルスやタバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソームなどが挙げられる。これらの発現ベクターには、公知の方法(制限酵素を利用する方法等)で、本発明の抗ポドブラニン抗体をコードするDNAを挿入することができる。

【0059】

また、本発明のベクターは、さらに抗体遺伝子の発現を調節するプロモーター、複製起点、選択マーカー遺伝子等を含むことができる。プロモーター及び複製起点は、宿主細胞とベクターの種類によって適宜選択することができる。

【0060】

(形質転換体)

本発明は、本発明のベクターを含む形質転換体を包含する。形質転換体は、本発明のベクターを適切な宿主細胞にトランスフェクトすることによって得ることができる。宿主細胞としては、例えば、哺乳類細胞(CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、HeLa細胞、Vero細胞等)、昆虫細胞、植物細胞、真菌細胞(サッカロミセス属、アスペルギルス属等)といった真核細胞や、大腸菌(E. coli)、枯草菌などの原核細胞を用いることができる。

【0061】

(本発明の抗ポドブラニン抗体の作製方法)

本発明の抗ポドブラニン抗体の作製方法は限定されないが、例えば、上述の本発明の形質転換体を、適当な条件で培養して抗体を発現させ、公知の方法に従って単離精製することができる。具体的には、プロテインA等を用いたアフィニティカラム、その他のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜組み合わせることによって抗体の単離、精製を行うことができる。

また、本発明の抗ポドブラニン抗体が低分子化抗体である場合、当該低分子抗体をコードするDNAを用いて上記方法で発現させることもでき、また、抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理して作製することもできる。

【0062】

本発明の抗体は、作製方法や精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、形態などが異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、本発明の抗体と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体を、大腸菌等の原核細胞で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明は、かかる抗体も包含する。

【0063】

還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないN-結合型糖鎖を有する抗体は、公知の方法又はそれに準ずる方法に従って製造することができる。かかる抗体の製造方法は、例えば、国際公開第2002/031140号パンフレット、特開20

10

20

30

40

50

09 - 225781号公報に記載されており、その開示は全体として参照により本明細書に組み込まれる。

具体的には、例えば、本発明に係る抗ポドプラニン抗体をコードするDNAを含むベクターを用いて、GDP - フコースの合成に關与する酵素の活性、又は - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼの活性が低下又は欠失した細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養した後、目的とする抗ポドプラニン抗体を精製することによって得ることができる。

GDP - フコースの合成に關与する酵素としては、例えば、GDP - mannose 4, 6 - dehydratase (GMP)、GDP - keto - 6 - deoxymanose 3, 5 - epimerase, 4 - reductase (Fx)、GDP - beta - L - fucose pyrophosphorylase (GFPP) が挙げられる。

10

ここで、細胞は特に限定されないが、哺乳動物細胞が好ましく、例えば上記酵素活性を低下又は欠失されたCHO細胞を用いることができる。

上記方法によって得られる抗体組成物は、還元末端のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合している抗体を含む場合もあるが、フコースが結合している抗体の割合は、抗体全体の20重量%以下、好ましくは10重量%以下、さらに好ましくは5重量%以下、最も好ましくは3重量%以下である。

【0064】

また、還元末端のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合していないN - 結合型糖鎖を有する抗体は、本発明に係る抗ポドプラニン抗体をコードするDNAを含むベクターを昆虫卵に導入し、孵化させて昆虫を成長させ、必要に応じて交配を行ってトランスジェニック昆虫を作製し、当該トランスジェニック昆虫又はその分泌物から抗ポドプラニン抗体を抽出することによっても得ることができる。昆虫としてはカイコを用いることができ、その場合、繭から抗体を抽出することができる。

20

この方法によって得られる抗体組成物も、還元末端のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合している抗体を含む場合もあるが、フコースが結合している抗体の割合は、抗体全体の20重量%以下、好ましくは10重量%以下、さらに好ましくは5重量%以下、最も好ましくは3重量%以下である。

【0065】

30

(本発明の抗体の活性)

本発明者らは、本発明の抗ポドプラニン抗体、及び、配列番号：2に示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号：3に示すアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むラットNZ - 1抗体(以下、併せて「本発明の抗体」という。)が、ポドプラニンとCLEC - 2の結合阻害活性だけでなく、ADCC活性やCDC活性等のエフェクター活性を有すること、また腫瘍増殖抑制活性を有することを見出した。これらの活性は、以下の方法で測定することができる。

【0066】

(1) 結合活性

抗体の結合活性は公知の方法、例えば、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)、蛍光抗体法、FACS法等で、測定することができる。

40

(2) ADCC活性

ADCC活性とは、標的細胞の細胞表面抗原に本発明の抗体が結合した際、そのFc部分にFc受容体保有細胞(エフェクター細胞)がFc受容体を介して結合し、標的細胞に障害を与える活性を意味する。

ADCC活性は、ポドプラニンを発現している標的細胞とエフェクター細胞と本発明の抗体を混合し、ADCCの程度を測定することによって知ることができる。エフェクター細胞としては、例えば、マウス脾細胞、ヒト末梢血や骨髄から分離した単球核を利用することができる。標的細胞としては、例えばポドプラニン陽性中皮腫細胞やポドプラニン陽

50

性膠芽腫細胞を用いることができる。標的細胞をあらかじめ⁵ ¹ Cr等で標識し、これに本発明の抗体を加えてインキュベーションし、その後標的細胞に対して適切な比のエフェクター細胞を加えてインキュベーションを行う。インキュベーション後、上清を採取し、上清中の上記標識をカウントすることにより、測定することが可能である。

(3) CDC 活性

CDC 活性とは、補体系による細胞障害活性を意味する。

CDC 活性は、ADCC 活性の試験において、エフェクター細胞に代えて補体を用いることにより測定することができる。

(4) 腫瘍増殖抑制活性

腫瘍増殖抑制活性は、腫瘍モデル動物を利用して測定することができる。例えば、マウスの皮下に腫瘍を移植し、本発明の抗体を投与する。非投与群と投与群における腫瘍組織の体積を比較することにより、腫瘍増殖抑制効果を測定することができる。

なお、本発明の腫瘍増殖抑制活性は、個々の細胞の増殖を抑制する結果生じるものであっても、細胞死を誘導する結果生じるものであってもよい。

【0067】

(医薬組成物)

本発明者らは、本発明の抗体が、従来ラットNZ-1抗体について知られていたポドプラニンとCLEC-2との結合阻害活性に加え、ADCC 活性、CDC 活性等のエフェクター活性及び腫瘍増殖抑制活性を有することを見出した。従って、本発明の抗体は、ポドプラニン抗体を発現するがんの治療に有効である。本発明の医薬組成物は、本発明の抗体、および薬学的に許容できる担体や添加物を含む。

【0068】

担体及び添加物の例として、水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、界面活性剤等が挙げられるがこれらに限定されない。

【0069】

本発明の医薬組成物は、様々な形態、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤などとすることができる。好ましい態様は、注射剤であり、非経口（例えば、静脈内、経皮、腹腔内、筋内）で投与することが好ましい。

【0070】

本発明の医薬組成物は、ポドプラニンが関連する疾患、例えば、腫瘍、血栓症、動脈硬化症等の治療に有効である。

上述のとおり、ポドプラニンはCLEC-2に結合することにより血小板凝集を起こすことが示唆されている。また、ポドプラニンの血小板上受容体であるCLEC-2が血栓症/動脈硬化症に関連すること、具体的には、CLEC-2欠損血小板は*in vitro*及び*in vivo*のいずれにおいても凝集能に劣ること、及び、CLEC-2欠損は出血時間を延長させ、閉塞性動脈血栓形成を防ぐことが報告されている(May, F. et al., Blood prepublished online July 29 2009; doi:10.1182/blood-2009-05-222273)。

さらに本明細書の実施例に示すとおり、動脈硬化病変においてポドプラニンが高発現していることも見出された。以上の事実から、本発明の医薬組成物が血栓症や動脈硬化症の治療に有効であることが強く示唆される。

一方、ポドプラニンが関連する腫瘍としては、脳腫瘍、中皮腫、精巣腫瘍、卵巣がん、及び扁平上皮がん等が挙げられる。ここで、扁平上皮がんには、口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、食道がん、肺癌、皮膚がん、子宮頸がんが含まれるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0071】

本発明は、本発明の抗体を治療有効量投与することを含むポドプラニンが関連する疾患の治療方法も包含する。

本明細書において、治療有効量とは、治療する疾患の一つ又は複数の症状が、それによりある程度緩和される作用物質の量を意味する。抗がん剤の場合、腫瘍サイズの低下；腫瘍の転移の阻害（遅延又は停止）；腫瘍増殖の阻害（遅延又は停止）、及びがんに関連する一つ又は複数の症状の緩和、の少なくとも一つを示す量を意味する。

具体的には、本発明の抗体の投与量は、例えば、0.025～50mg/kg、好ましくは0.1～50mg/kgであり、より好ましくは0.1～25mg/kg、さらに好ましくは0.1～10mg/kg又は0.1～3mg/kgとすることができるが、これ

10

【0072】

（マーカー、診断薬）

上述のとおり、ポドプラニンは特定の腫瘍細胞において高発現している。従って、本発明の抗体は、がん、特に脳腫瘍、中皮腫、精巣腫瘍、卵巣がん、及び各種扁平上皮がん（口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、食道がん、肺癌、皮膚がん、子宮頸がん）などポドプラニンが高発現するがんの診断に有用である。

また、実施例に示すとおり、ラットNZ-1抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、動脈硬化病変においてポドプラニンが高発現していることが確認された。従って、本発明の抗ポドプラニン抗体は、動脈硬化の診断にも有用である。

20

動脈硬化病変については、早期病変のうちマクロファージ浸出性の病変においてポドプラニンの高発現が観察された。マクロファージ浸出性病変は進行病変になりやすいことが知られていることから、ポドプラニンを検出することによる診断方法によって、進行病変になりやすい動脈硬化の早期発見が期待される。

以上より、本発明は、本発明の抗体を含むがん又は動脈硬化の診断薬、がん又は動脈硬化の診断のための抗体の使用、本発明の抗体を用いるがん又は動脈硬化の診断方法をも包含する。

【実施例】

【0073】

1. ラットNZ-1抗体のアミノ酸配列及びラットNZ-1抗体遺伝子の塩基配列の決定

30

NZ-1ハイブリドーマ細胞（非特許文献6を参照） 1×10^6 からQIAGEN RNeasy mini kitを使用してトータルRNAを抽出した。

トータルRNA 1 μ gからSuperScript III First-Strand Syntheses kitを使用してcDNA合成を行った。以下の実験にcDNAを鋳型として使用した。

H鎖の増幅に以下のプライマーを使用した。

S1 tcctcacc atg gac ttc agg （配列番号：25）

AS1 tca ttt acc agg aga gtg gg （配列番号：26）

PCR反応にはQIAGEN HotStar Taqを使用した。温度条件は、最初に95 15分、次に94 30秒、50 30秒、72 1分を35サイクル、最後に72 10分とした。

40

増幅したPCR産物はQIAGEN PCR purification kitにて精製し、pcDNA3-topo cloning kitにてサブクローニングし、ベクタープライマーから塩基配列の決定を行った。

L鎖の増幅に以下のプライマーを使用した。

BamHI-S1 cca ggatcc acc atg aca tgg act cta ct （配列番号：27）

EcoRI-AS1 ggt gaattc cta gac aca ttc tgc agg ag （配列番号：28）

PCR反応にはQIAGEN HotStar Taqを使用した。温度条件は、最初に95 15分、次に94 30秒、53 30秒、72 1分を35サイクル、最後に72 10分とした。

50

増幅したPCR産物はQIAGEN PCR purification kitにて精製し、制限酵素BamHIとEcoRIにて37で1時間処理した。制限酵素処理したPCR産物をWizard SV Gel & PCR Clean up systemsにて精製し、同じく酵素処理したベクターpcDNA3.1/Zeo-cinもしくはpcDNA3(G418)にサブクローニングし、ベクタープライマーから塩基配列の確認を行った。H鎖をコードするDNAの塩基配列は配列番号：4に、L鎖をコードするDNAの塩基配列は配列番号：5に示すとおりであった。

塩基配列からアミノ酸配列を予測した。H鎖アミノ酸配列は配列番号：2に、L鎖アミノ酸配列は配列番号：3に示すとおりであった。

【0074】

10

2. CDRの決定

決定した塩基配列より以下のURLのホームページ(IMG T/V-QUEST Search page)に提供されているイムノグロブリンの配列予測ソフトにてCDRの部位を特定した。

http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanlg

重鎖CDR1~3及び軽鎖CDR1~3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：6~11に示されるように特定された。

【0075】

3. ポドブラニン陽性細胞におけるラットNZ-1抗体によるADCC活性の測定

ラット脾細胞の10%FBS-RPMI1640浮遊液(グルタミンを含む)を作成し、赤血球を溶血後、脾細胞が 5×10^5 個/well又は 1×10^6 個/wellになるように、丸底96-well plateに加えた。

20

腫瘍細胞として中皮腫細胞のH2052細胞、H226細胞、及びMSTO-211H細胞を用いた。腫瘍細胞は $0.1 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ にてラベルし、2回洗浄後、 1×10^4 個/wellでラット脾細胞と混合した。

さらに、コントロール群にはラットIgGを、NZ-1抗体投与群にはラットNZ-1抗体を、それぞれ最終濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した。以上の実験で、Effector/Target比は、50あるいは100となり、最終溶液量は $200 \mu\text{l/well}$ となる。実験はtriplicateで行った。37の CO_2 インキュベーターにて6時間培養後、上清を $100 \mu\text{l}$ 回収し、カウンターにて放射活性をカウントした(下記E値)。

30

上記コントロール群及びNZ-1抗体投与群とは別に、腫瘍細胞をmediumのみで培養したwellの活性をspontaneous releaseとし、1%SDSで培養したwellの活性をmaximum releaseとした。細胞障害活性(%)は、以下の式にて計算した。

$$\% \text{ Specific lysis (Cytotoxicity)} = (E - S) / (M - S) \times 100$$

E: the release in the test sample (cpm in the supernatant from target cells incubated with effector cells and test antibody)

S: the spontaneous release (cpm in the supernatant from target cells incubated with medium alone)

40

M: the maximum release (cpm released from target cells lysed with 1% sodium dodecyl sulfate)

結果を図1A~Cに示す。

一方、上記中皮腫細胞におけるポドブラニンの発現をフローサイトメトリーにより確認した。具体的には、NZ-1抗体($10 \mu\text{g/ml}$)を4で30分反応させ、さらに抗ラットIgG-FITC抗体を4で30分反応させた。蛍光強度をFACSCalibur(BD)で測定した。

結果を図2A~Cに示す。実線がNZ-1抗体、塗りつぶしが二次抗体のみのコントロールのピークを示す。

図1及び図2に示されるとおり、ポドブラニンの陽性細胞においては、NZ-1抗体に

50

よるADCC活性が確認された。それに対し、ポドプラニンの陰性細胞においては、NZ-1抗体によるADCC活性が見られなかった。

【0076】

4. ラットNZ-1抗体による腫瘍増殖抑制効果

ポドプラニンを発現しているCHO細胞(CHO/podoplanin(非特許文献3を参照))をトリプシン処理して浮遊させ、PBSで洗浄後、HBSSに浮遊させ、 3.0×10^7 cells/mlに調整して、BALB/cヌードマウスの皮下に100 μ lずつ移植した。

1日後、NZ-1抗体投与群には5mg/mlのNZ-1抗体を、コントロール群には5mg/mlのラットIgGをそれぞれ200 μ l、alzet mini-osmotic pump(model 2002, DURECT)に封入し、マウスの腹腔内に埋め込み、0.5 μ l(2.5 μ g)/hourで2週間持続的に投与した(コントロール群; n=10, NZ-1群; n=9)。細胞移植20日後より腫瘍径を3日毎に計測した。

結果を図3に示す。皮下腫瘍形成率はコントロール群では9/10(90%)であったのに対しNZ-1抗体投与群では6/9(66.6%)であり、NZ-1抗体により腫瘍生着率が低下した。さらに、NZ-1抗体投与群は細胞移植50日以降コントロール群と比較して形成された皮下腫瘍が有意に小さかった。以上の結果から抗NZ-1抗体は皮下腫瘍の生着および増殖を抑制することが示された。

【0077】

5. ラットNZ-1抗体による動脈硬化病変の検出

動脈硬化病変の組織10mgをPBSで3回洗浄後、可溶化溶液(1%Triton in PBS; 50 μ g/ml aprotinin)で可溶化し、常法に従いタンパク定量を行った(非特許文献3を参照)。タンパク10 μ g(10 μ l)を10 μ lの2x sample bufferを加え、100 $^{\circ}$ Cで5分煮沸した。20 μ lを10% constant gelにapplyし、running buffer(25mM Tris-HCl(pH8.3), 192mM glycine, 0.1%SDS)を用いて、40mAで55分電気泳動した。

その後、PVDF膜に転写(30V、60分)し、blocking buffer(4%スキムミルク in PBS-0.05%Tween)で4、18時間ブロッキングした。その後、blocking bufferで1 μ g/mlに調整したNZ-1抗体および1/4000希釈した抗-actin抗体を、室温で50分反応させた。

washing buffer(0.05%Tween 20 in PBS)で洗った後、blocking bufferで1/1000に希釈したHRP-labeled anti-Rat IgG(GE社)およびHRP-labeled anti-mouse IgG(GE社)を45分室温で反応させた。washing bufferで洗った後、ECL Plus(GE社)で発色させ、scientific imaging filmに露光させた。

結果を図4に示す。マクロファージ浸出性の早期病変及び進行病変において、ポドプラニンが高発現していることが確認された。

【0078】

6. マウスキメラ型NZ-1抗体の作製

マウスキメラ型NZ-1抗体の作製のために、NZ-1のVH領域とCH1領域をコードするDNAをPCRで増幅し、マウスIgG2aのヒンジ領域、CH2及びCH3領域をコードするDNAを保持したpFUSE-mIgG2A-Fc1ベクターに組み込んだ(pFUSE-mIgG2A/NZ-1H)。

NZ-1のVH領域とCH1領域をコードするDNAはpcDNA3/NZ-1Hプラスミドを鋳型として、以下のプライマーにより増幅した。

EcoRI-NZ-1-Fwd cca gaattc tcc tca cca tgg act (配列番号: 29)

NZ-1-CH1-Rev-BgIII tgg agatct cctggcacaattttcttgt (配列番号: 30)

10

20

30

40

50

NZ - 1のL鎖をコードするDNAは、塩基配列決定の際に作成したpcDNA3 (G418) / NZ - 1Lを使用した。

pFUSE - mIgG2A / NZ - 1HとpcDNA3 (G418) / NZ - 1L (Zeocin)それぞれ2μgを混合し、Lipofectamin kitの方法に従って、CHO細胞1×10⁵ (6ウェルプレートの1ウェルに相当)に形質導入した。24時間後からZeocin 500μg/ml、G418 1mg/ml入りの培地で形質導入細胞の選択をした。LN319細胞もしくはポドプラニン発現CHO細胞に対して、選択細胞の培養上清の反応性をフローサイトメトリーにて確認した。

キメラ抗体の高発現株を、無血清培地 (インビトロジェン社)を用いて培養し、培養上清を回収した。培養上清をプロテインGカラム (ピアス社)に通し、マウスキメラ型NZ - 1抗体を精製した。マウスキメラ型NZ - 1抗体は、配列番号: 23で示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号: 3に示すアミノ酸配列からなる軽鎖で構成されている。重鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号: 24に、軽鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号: 5に示す。

精製したNZ - 1抗体およびマウスキメラ型NZ - 1抗体2μgをSDS - PAGEにて泳動し、CBB染色を行った。結果を図5に示す。

【0079】

7. ヒトキメラ型NZ - 1抗体の作製

ヒトキメラ型NZ - 1抗体を作製するために、NZ - 1のVH領域をコードするDNAをPCRで増幅し、ヒトIgG1のCH1、ヒンジ領域、CH2、CH3領域をコードするDNAを保持したpcDNA3.3ベクターに組み込んだ (pcDNA3.3 - hIgG1 / NZ - 1H)。NZ - 1のVH領域はpcDNA3 / NZ - 1Hプラスミドを鋳型として、以下のプライマーにより増幅した。

NZ-1VH-Fprimer: TCCTCACCATGGACTTCAGG (配列番号: 31)

NZ-1VH-Rprimer: TTCAGCTGAGGAGACTGTGA (配列番号: 32)

NZ - 1のL鎖は、NZ - 1のVL領域をコードするDNAをPCRで増幅し、ヒトIgGの鎖のCL領域をコードするDNAを保持したpcDNA3.1ベクターに組み込んだ (pcDNA3.1 - hIgCL / NZ - 1L)。NZ - 1のVL領域をコードするDNAは、pcDNA3 / NZ - 1Lプラスミドを鋳型として、以下のプライマーにより増幅した。

NZ-1VL-Fprimer: accATGACATGGACTCTACT (配列番号: 33)

NZ-1VL-Rprimer: CTTGGGCTGACCTAGGACA (配列番号: 34)

pcDNA3.3 - hIgG1 / NZ - 1H (G418) / pcDNA3.1 - hIgCL / NZ - 1L (Zeocin)それぞれ2μgを混合し、Lipofectamin kitの方法に従って、CHO細胞1×10⁵ (6ウェルプレートの1ウェルに相当)に形質導入した。24時間後からZeocin 500μg/ml、G418 1mg/ml入りの培地で形質導入細胞の選択をした。H226、LN319細胞もしくはポドプラニン発現CHO細胞に対して、選択細胞の培養上清の反応性をフローサイトメトリーにて確認した。

ヒトキメラ型抗体の高発現株を、無血清培地 (インビトロジェン社)を用いて培養し、培養上清を回収した。培養上清をプロテインGカラム (ピアス社)に通し、ヒトキメラ型NZ - 1抗体を精製した。ヒトキメラ型NZ - 1抗体は、配列番号: 37で示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号: 39で示すアミノ酸配列からなる軽鎖で構成されている。重鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号: 38に、軽鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号: 40に示す。重鎖は、ラットNZ - 1抗体のVH領域と、ヒトIgG1に由来するCH1、ヒンジ領域、CH2、CH3からなる。軽鎖は、ラットNZ - 1抗体のVL領域と、ヒトIgG1に由来するCLとからなる。

精製したNZ - 1抗体およびヒトキメラ型NZ - 1抗体2μgをSDS - PAGEにて泳動し、CBB染色を行った。結果を図6に示す。

【0080】

8. ポドブラニンに対するNZ-1抗体、マウスキメラ型NZ-1抗体、及びヒトキメラ型NZ-1抗体の反応性

ヒトキメラ型NZ-1抗体がポドブラニンに対して反応を示すことを確認した。まず、ヒトポドブラニンを発現したヒト悪性中皮腫細胞(H226)、ヒト膠芽腫細胞(LN319)に、NZ-1抗体、マウスキメラ型NZ-1抗体、ヒトキメラ型NZ-1抗体(10 µg/ml)を4度で30分反応させ、さらに抗ラットIgG-FITC抗体、抗マウスIgG-FITC抗体、抗ヒトIgG-FITC抗体を4度で30分それぞれ反応させた。蛍光強度をFACSCalibur(BD)で測定した。

結果を図7に示す。図に示す通り、NZ-1抗体、マウスキメラ型NZ-1抗体、及びヒトキメラ型NZ-1抗体は、ヒトポドブラニンを発現したヒト悪性中皮腫細胞(H226)、ヒト膠芽腫細胞(LN319)に対し、いずれも良く反応した。ネガティブコントロールとして、それぞれの二次抗体のみを用いた。

【0081】

9. ラットNZ-1抗体及びマウスキメラ型NZ-1抗体のCDC活性の測定(6時間及び24時間培養後)

腫瘍細胞(H226細胞)を0.1 µCiのNa⁵¹CrO₄にてラベルし、2回洗浄後、1×10⁴個/wellで丸底96-well plateに加えた。ラットNZ-1抗体又はマウスキメラ型NZ-1(正常ラット抗体、正常マウス抗体がそれぞれのコントロール抗体)を最終濃度が1 µg/mlとなるように添加し、そこにウサギ補体を最終的に4倍希釈となるように添加した。

最終溶液量は200 µl/wellとした。37 °CのCO₂インキュベーターにて6時間又は24時間培養後、上清を100 µl回収し、ガンマカウンターにて放射活性をカウントした。上記コントロール群、NZ-1抗体投与群、マウスキメラ型NZ-1抗体投与群とは別に、腫瘍細胞をmediumのみで培養したwellの活性をspontaneous releaseとし、1% SDSで培養したwellの活性をmaximum releaseとした。細胞障害活性(%)は、以下の式にて計算した。

% Specific lysis (Cytotoxicity) = (E-S)/(M-S) × 100

E: the release in the test sample (cpm in the supernatant from target cells incubated with effector cells and test antibody)

S: the spontaneous release (cpm in the supernatant from target cells incubated with medium alone)

M: the maximum release (cpm released from target cells lysed with 1% sodium dodecyl sulfate)

結果を図8A及びBに示す。

6時間培養後、ラットNZ-1抗体及びマウスキメラ型NZ-1抗体のいずれも、ポドブラニン陽性ヒト腫瘍細胞に対してCDC活性を有することが示された。24時間培養後、CDC活性はさらに上昇した。コントロールに対する細胞障害活性の上昇率は、ラットNZ-1抗体に比較して、マウスキメラ型NZ-1抗体で若干低くなる傾向があった。

【0082】

10. ラットNZ-1抗体、マウスキメラ型NZ-1抗体及びヒトキメラ型NZ-1抗体のADCC活性の測定

比重遠心法にて分離した健常人末梢血単核球(MNC)の浮遊液を作成し、1×10⁶個/wellになるようにMNCを、丸底96-well plateに加えた。ヒト悪性中皮腫細胞(H226)、ヒト膠芽腫細胞(LN319)は0.1 µCiのNa⁵¹CrO₄にてラベルし、2回洗浄後、1×10⁴個/wellでMNCと混合した。さらに、コントロールのラットIgGおよびヒトIgG、NZ-1、マウスキメラ型抗体、ヒトキメラ型抗体を最終濃度が1 µg/mlとなるように添加した。以上の実験で、Effector/Target比は、100となり、最終溶液量は200 µl/wellとなる。実験はtriplicateで行った。37 °CのCO₂インキュベーターにて6時間培養後、上清を100 µl回収し、ガンマカウンターにて放射活性をカウントした。ラベル下腫

瘍細胞をmediumのみで培養したwellの活性をspontaneous releaseとし、1% SDSで培養したwellの活性をmaximum releaseとした。細胞障害活性(%)は、以下の式にて計算した。

$$\% \text{ Specific lysis} = (E - S) / (M - S) \times 100$$

E: the release in the test sample (cpm in the supernatant from target cells incubated with effector cells and test antibody)

S: the spontaneous release (cpm in the supernatant from target cells incubated with medium alone)

M: the maximum release (cpm released from target cells lysed with 1% sodium dodecyl sulfate)

10

結果を図9及び10に示す。

ヒトエフェクター細胞を用いた場合、マウスキメラ型NZ-1抗体及びヒトキメラ型NZ-1抗体が、ポドプラニン陽性ヒト腫瘍細胞に対してADCC活性を有することが示された。特にヒトキメラ型NZ-1抗体は、ラットNZ-1抗体及びマウスキメラ型NZ-1抗体と比較して、著しく高いADCC活性を示すことが確認された。マウスキメラ型NZ-1抗体は、NZ-1抗体と同等のADCC活性しか確認できなかったため、ヒトキメラ型NZ-1抗体でこのように活性が顕著に高くなることは当業者が予測し得ないことであった。

【0083】

11. ラットNZ-1抗体、マウスキメラ型NZ-1抗体及びヒトキメラ型NZ-1抗体のCDCC活性の測定

20

ヒト悪性中皮腫細胞(H226)、ヒト膠芽腫細胞(LN319)を0.1 µCiの Na_5CrO_4 にてラベルし、2回洗浄後、 1×10^4 個/wellで丸底96-well plateに加えた。コントロールのラットIgGおよびヒトIgG、NZ-1、マウスキメラ型NZ-1抗体、ヒトキメラ型NZ-1抗体を最終濃度が1 µg/mlとなるように添加し、そこにウサギ補体を最終的に4倍希釈となるように添加した。最終溶液量は200 µl/wellとした。37 °CのCO₂インキュベーターにて6時間培養後、上清を100 µl回収し、カウンターにて放射活性をカウントした。腫瘍細胞をmediumのみで培養したwellの活性をspontaneous releaseとし、1% SDSで培養したwellの活性をmaximum releaseとした。細胞障害活性(%)は、以下の式にて計算した。

30

$$\% \text{ Specific lysis} = (E - S) / (M - S) \times 100$$

E: the release in the test sample (cpm in the supernatant from target cells incubated with effector cells and test antibody)

S: the spontaneous release (cpm in the supernatant from target cells incubated with medium alone)

M: the maximum release (cpm released from target cells lysed with 1% sodium dodecyl sulfate)

結果を図11及び図12に示す。

ラットNZ-1抗体、マウスキメラ型NZ-1抗体、ヒトキメラ型抗体のいずれも、ポドプラニン陽性ヒト腫瘍細胞に対してCDCC活性を有することが示された。特にヒトキメラ型NZ-1抗体は、ラットNZ-1抗体及びマウスキメラ型NZ-1抗体と比較して、著しく高いCDCC活性を示すことが確認された。マウスキメラ型NZ-1抗体は、NZ-1抗体と同等の細胞障害活性しか確認できなかったため、ヒトキメラ型抗体で活性がこのように顕著に高くなることは当業者が予測し得ないことであった。

40

【配列表フリーテキスト】

【0084】

配列番号：1は、ラットNZ-1抗体のエピトープである。

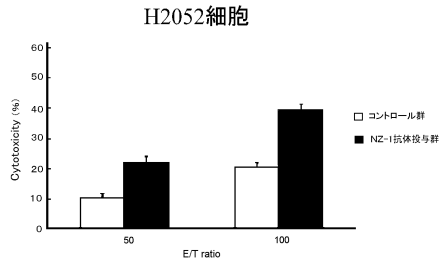
配列番号：2は、ラットNZ-1抗体H鎖のアミノ酸配列である。

配列番号：3は、ラットNZ-1抗体L鎖のアミノ酸配列である。

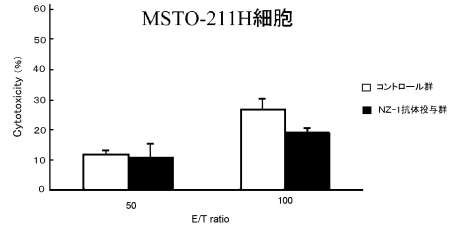
50

- 配列番号：4は、ラットNZ-1抗体H鎖をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：5は、ラットNZ-1抗体L鎖をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：6は、ラットNZ-1抗体H鎖CDR1のアミノ酸配列である。
- 配列番号：7は、ラットNZ-1抗体H鎖CDR2のアミノ酸配列である。
- 配列番号：8は、ラットNZ-1抗体H鎖CDR3のアミノ酸配列である。
- 配列番号：9は、ラットNZ-1抗体L鎖CDR1のアミノ酸配列である。
- 配列番号：10は、ラットNZ-1抗体L鎖CDR2のアミノ酸配列である。
- 配列番号：11は、ラットNZ-1抗体L鎖CDR3のアミノ酸配列である。
- 配列番号：12は、ラットNZ-1抗体H鎖CDR1をコードするDNAの塩基配列である。 10
- 配列番号：13は、ラットNZ-1抗体H鎖CDR2をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：14は、ラットNZ-1抗体H鎖CDR3をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：15は、ラットNZ-1抗体L鎖CDR1をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：16は、ラットNZ-1抗体L鎖CDR2をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：17は、ラットNZ-1抗体L鎖CDR3をコードするDNAの塩基配列である。 20
- 配列番号：18は、ラットNZ-1抗体H鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列である。
- 配列番号：19は、ラットNZ-1抗体L鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列である。
- 配列番号：20は、ラットNZ-1抗体H鎖定常領域1(CH1)のアミノ酸配列である。
- 配列番号：21は、ラットNZ-1抗体L鎖定常領域(CL)のアミノ酸配列である。
- 配列番号：22は、マウス抗体のFc領域のアミノ酸配列である。
- 配列番号：23は、マウスキメラ型NZ-1抗体H鎖のアミノ酸配列である。
- 配列番号：24は、マウスキメラ型NZ-1抗体H鎖をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：25は、ラットNZ-1抗体H鎖増幅用プライマーである。 30
- 配列番号：26は、ラットNZ-1抗体H鎖増幅用プライマーである。
- 配列番号：27は、ラットNZ-1抗体L鎖増幅用プライマーである。
- 配列番号：28は、ラットNZ-1抗体L鎖増幅用プライマーである。
- 配列番号：29は、ラットNZ-1抗体VH/CH1増幅用プライマーである。
- 配列番号：30は、ラットNZ-1抗体VH/CH1増幅用プライマーである。
- 配列番号：31は、ラットNZ-1抗体のVH領域増幅用プライマーである。
- 配列番号：32は、ラットNZ-1抗体のVH領域増幅用プライマーである。
- 配列番号：33は、ラットNZ-1抗体のVL領域増幅用プライマーである。
- 配列番号：34は、ラットNZ-1抗体のVL領域増幅用プライマーである。
- 配列番号：35は、ヒトIgG1のCH1、ヒンジ領域、CH2及びCH3のアミノ酸配列である。 40
- 配列番号：36は、ヒトIgG1のCLのアミノ酸配列である。
- 配列番号：37は、ヒトキメラ型NZ-1抗体のH鎖のアミノ酸配列である。
- 配列番号：38は、ヒトキメラ型NZ-1抗体のH鎖をコードするDNAの塩基配列である。
- 配列番号：39は、ヒトキメラ型NZ-1抗体のL鎖のアミノ酸配列である。
- 配列番号：40は、ヒトキメラ型NZ-1抗体のL鎖をコードするDNAの塩基配列である。

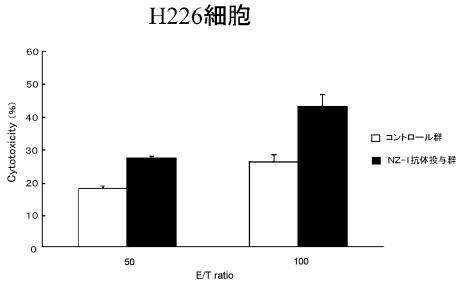
【図 1 A】



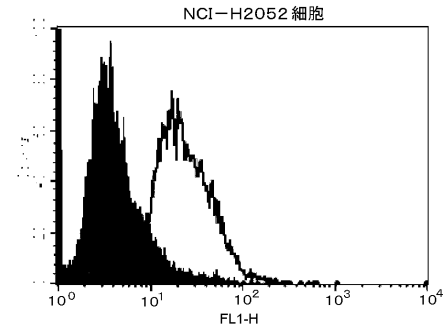
【図 1 C】



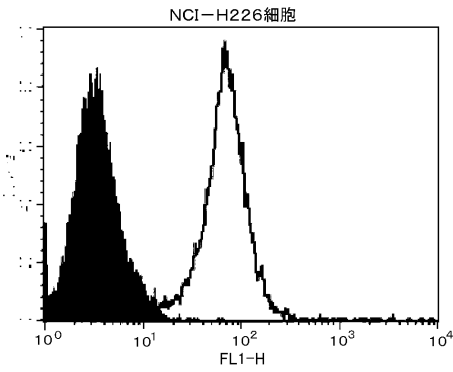
【図 1 B】



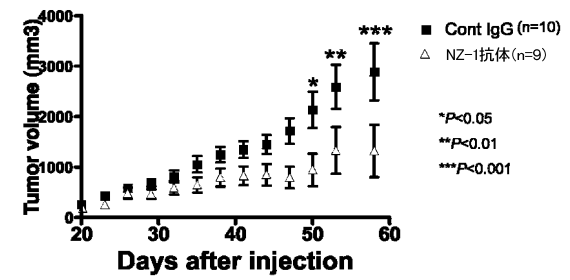
【図 2 A】



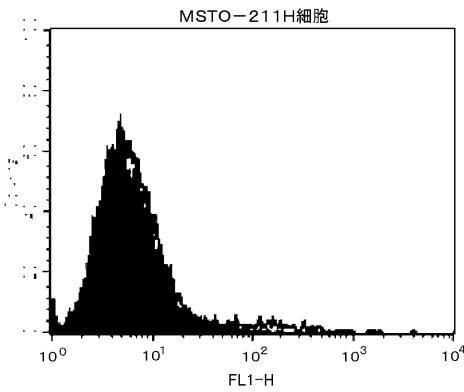
【図 2 B】



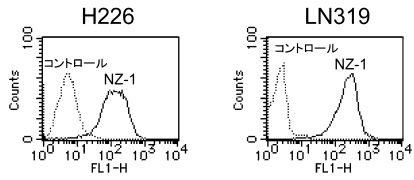
【図 3】



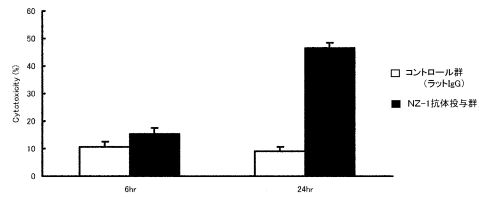
【図 2 C】



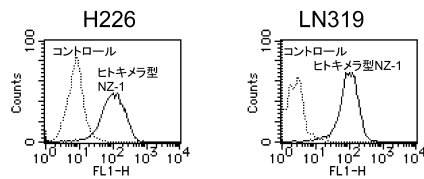
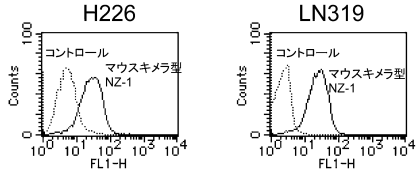
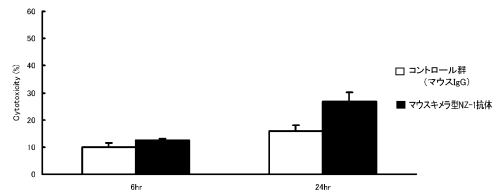
【 図 7 】



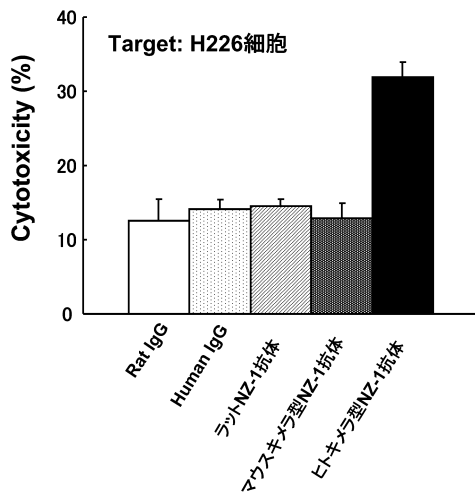
【 図 8 A 】



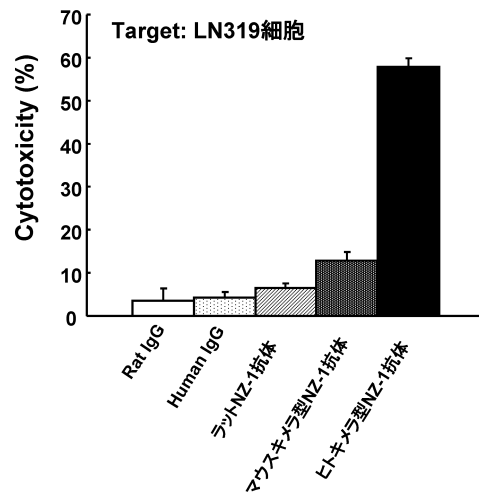
【 図 8 B 】



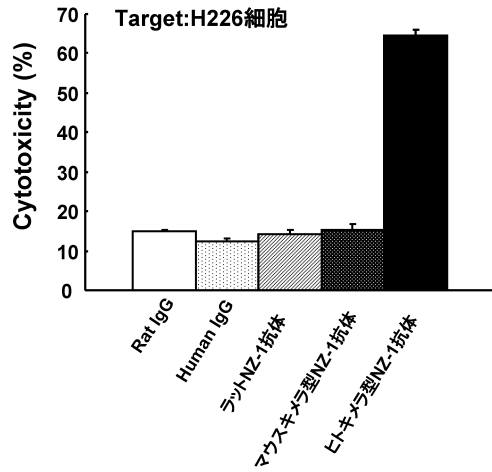
【 図 9 】



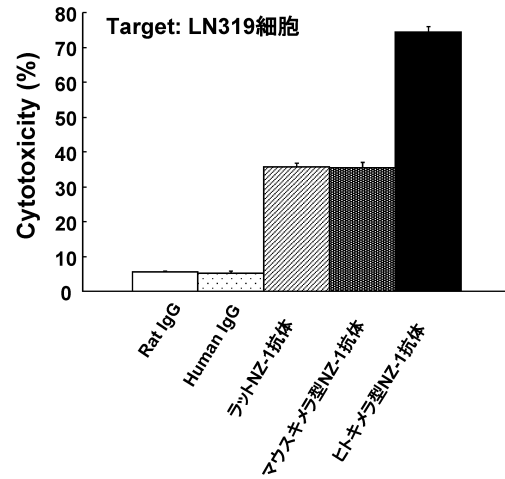
【 図 10 】



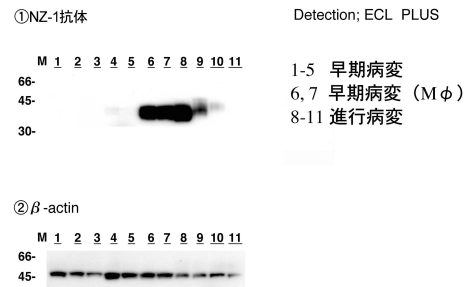
【 図 1 1 】



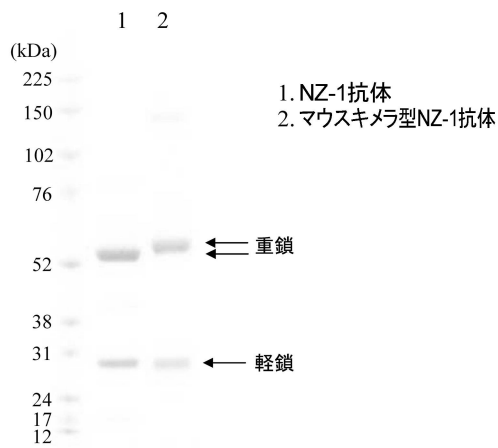
【 図 1 2 】



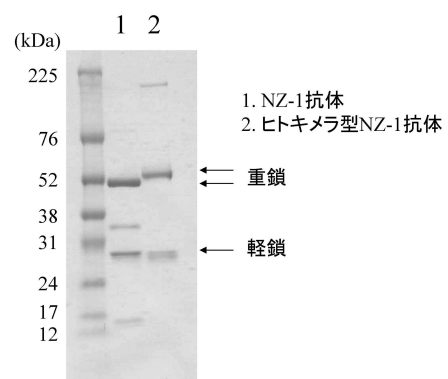
【 図 4 】



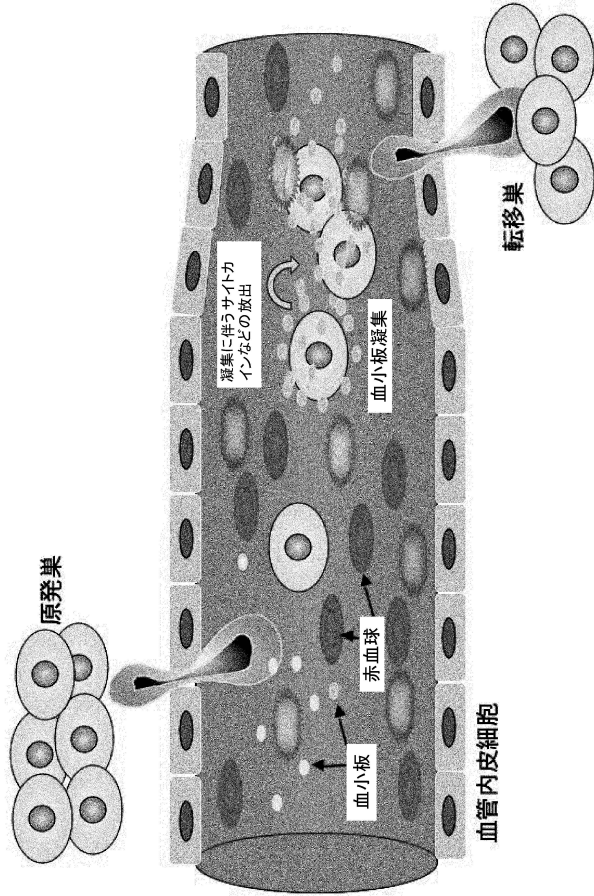
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 1 3 】



【 配列表 】

[0006077745000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/10 1 0 1
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
C 0 7 K	16/36	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K	16/36
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
			C 1 2 N	5/10

(72)発明者 加藤 美華
山形県山形市桜町2-35-1402

(72)発明者 西岡 安彦
徳島県徳島市鮎喰町2丁目14-18

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 瀬下 浩一

審判官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第01/23431(WO,A1)
国際公開第2009/028663(WO,A1)
特開2009-142288(JP,A)
遺伝子医学MOOK, 2008年, No.11, pp.165-171
Cancer Sci., 2008年, Vol.99, No.1, pp.54-61
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006年, Vol.349, No.4, pp.1301-1307
Trends Glycosci. Glycotechnol., 2006年, Vol.18, No.100, pp.129-136