

明 細 書

発明の名称：抗ポドプラニン抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗ポドプラニン抗体に関する。詳細には、ヒト化抗体若しくはマウスーヒトキメラ抗体である抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片に関する。

背景技術

[0002] 血小板は、凝集してがん細胞膜を覆うことで、血流のせん断応力に対する抵抗性や免疫細胞からの攻撃回避を促進し、転移がん細胞の生存を促進するとともに、腫瘍塊の形成と塞栓形成を促進し、さらには、腫瘍増殖、上皮間葉転換（EMT）、血管新生を促進するなどの機構で転移巣の形成を助長することが報告されている（非特許文献1、2）。

一方で、がん細胞上には、血小板凝集を誘導するタンパク質であるポドプラニンが同定されており、ポドプラニンは、そのPLAGドメイン、好ましくはPLAG4ドメインを介して血小板上のレセプターであるCLEC-2と結合することが報告されている（非特許文献1～4）。

ポドプラニンは、中皮腫、脳腫瘍、精巣腫瘍、カポジ肉腫、リンパ管腫、海綿状血管腫、血管肉腫、肺扁平上皮がん、卵巣がん未分化胚細胞腫、神経膠腫、胚細胞腫瘍、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、骨軟部腫瘍（原発性骨腫瘍（骨肉腫、軟骨肉腫）、軟部肉腫）、食道がんなどのがんを高発現しており、がん細胞の浸潤能や転移能を亢進することも報告されている（非特許文献5～17）。

したがって、がん細胞上のポドプラニンと血小板上のCLEC-2との結合を阻害することで、腫瘍塊の形成や塞栓の形成が抑制され、さらには、腫瘍増殖、上皮間葉転換（EMT）、血管新生の抑制による転移巣の形成を抑制でき、がん関連の血栓症を予防できることが示唆されている（非特許文献1、4）。
静脈血栓症では血管壁においてポドプラニンの発現が促進されることが知ら

れており、血栓の存在は炎症を惹起することも報告されていることから、血栓の予防により炎症の予防が期待できる（非特許文献4、18）。さらには、上記がんの浸潤や転移を抑制できることが期待される。

[0003] このような状況下、がん細胞上のポドプラニンと血小板上のCLEC-2との結合を阻害する新たな治療薬の開発が進められている。その一つに、PLA4ドメインを標的にした抗ヒトポドプラニン抗体であるPG4D2抗体（IgG2aサブクラス）が樹立されている（非特許文献1、特許文献1）。当該抗体は、平衡解離定数（ K_D ）が0.3 nM以下という結合活性が非常に強い抗体であり、また、当該抗体には、ポドプラニン陽性腫瘍細胞依存的な血小板凝集や転移の発生頻度を抑制する活性も認められている。

しかし、当該PG4D2抗体はマウスに免疫して得られたマウスPG4D2抗体であり、ヒト化抗体及びマウスーヒトキメラ抗体は確立されていない。マウス抗体はヒトのインビボでの半減期が比較的短い。また、マウス抗体はヒトに対して免疫原性が高く、そのためにヒトにおける治療的価値が限定される。マウス抗体は長期間または何回も投与すると、患者に望ましくないアレルギー性反応のリスクをもたらすような免疫応答を引き起こすことが危惧される。したがって、当該技術分野ではヒト化抗体またはマウスーヒトキメラ抗体の必要性が存在する。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開2017/010463号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：医学のあゆみ、265(1), 60-65 (2018)

非特許文献2：日本血栓止血学会誌、27(1), 3-10 (2016)

非特許文献3：日本血栓止血学会誌、27(1), 11-17 (2016)

非特許文献4：日本血栓止血学会誌、28(4), 518-526 (2017)

非特許文献5：「30 骨肉腫に対する高感度抗ポドプラニン抗体の樹立」、[平成31年1月21日検索]、インターネット<URL : <https://www.jstag>

e.jst.go.jp/article/jsmtmr/30/0/30_70/_pdf>

非特許文献6 : Histopathology, Apr;46(4):396-402 (2005)

非特許文献7 : Hum. Pathol., Apr;36(4):372-80 (2005)

非特許文献8 : Tumour Biol., Jul-Aug;26(4):195-200 (2005)

非特許文献9 : Am. J. Pathol., Mar;166(3):913-21 (2005)

非特許文献10 : Acta Neuropathol., May;111(5):483-8 (2006)

非特許文献11 : Cancer Cell, Apr;9(4):261-72 (2006)

非特許文献12 : Acta Neuropathol., Jan;113(1):87-94 (2007)

非特許文献13 : Int. J. Cancer, Jun 1;134(11):2605-14 (2014)

非特許文献14 : Pathol. Int., Mar;60(3):193-202 (2010)

非特許文献15 : Oncol. Rep., Mar;25(3):599-607 (2011)

非特許文献16 : Am. J. Pathol., Aug;179(2):1041-9 (2011)

非特許文献17 : Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., Jun;34(3):154-61 (2015)

非特許文献18 : Blood, Apr 6;129(14):1896-1898 (2017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、ヒト化抗体若しくはマウスーヒトキメラ抗体である抗ポドプラン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは鋭意検討した結果、所定の配列を用いてマウスPG4D2抗体をヒト化又はマウスーヒトキメラ化することにより前記課題が解決できることを見出し、本発明を完成させた。

本発明は以下に示すとおりである。

- [0008] 本発明は、下記のアミノ酸配列を含む、単離された、ヒト化抗体若しくはマウスーヒトキメラ抗体である抗ポドプラン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片である。

ただし、下記重鎖のCDR1～CDR3及び軽鎖のCDR1～CDR3の

アミノ酸配列は、それぞれ、下記配列番号 1～6 で表されるアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

重鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 1 のアミノ酸配列であり、
重鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 2 のアミノ酸配列であり、
重鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 3 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 4 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 5 のアミノ酸配列であり、及
び

軽鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 6 のアミノ酸配列である。

[0009] 前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片は、ヒト化抗体であり、可変領域が下記 (I) 又は (II) のアミノ酸配列を含むことを好ましい態様としている。

ただし、下記 (I) において、下記重鎖の F R 1～F R 4 及び軽鎖の F R 1～F R 4 のアミノ酸配列は、それぞれ、下記配列番号 7～14 で表されるアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよく、

下記 (II) において、下記重鎖の F R 1～F R 4 及び軽鎖の F R 1～F R 4 のアミノ酸配列は、それぞれ、下記配列番号 7、15、16、10～14 で表されるアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

(I) :

重鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 1 のアミノ酸配列であり、
重鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 2 のアミノ酸配列であり、
重鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 3 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 4 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 5 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 6 のアミノ酸配列であり、
重鎖の F R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 7 のアミノ酸配列であり、
重鎖の F R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 8 のアミノ酸配列であり、

重鎖のF R 3のアミノ酸配列が、配列番号9のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 4のアミノ酸配列が、配列番号10のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 1のアミノ酸配列が、配列番号11のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 2のアミノ酸配列が、配列番号12のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 3のアミノ酸配列が、配列番号13のアミノ酸配列であり、及
び

軽鎖のF R 4のアミノ酸配列が、配列番号14のアミノ酸配列である；

(I I) :

重鎖のC D R 1のアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列であり、
重鎖のC D R 2のアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、
重鎖のC D R 3のアミノ酸配列が、配列番号3のアミノ酸配列であり、
軽鎖のC D R 1のアミノ酸配列が、配列番号4のアミノ酸配列であり、
軽鎖のC D R 2のアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列であり、
軽鎖のC D R 3のアミノ酸配列が、配列番号6のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 1のアミノ酸配列が、配列番号7のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 2のアミノ酸配列が、配列番号15のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 3のアミノ酸配列が、配列番号16のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 4のアミノ酸配列が、配列番号10のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 1のアミノ酸配列が、配列番号11のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 2のアミノ酸配列が、配列番号12のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 3のアミノ酸配列が、配列番号13のアミノ酸配列であり、及
び

軽鎖のF R 4のアミノ酸配列が、配列番号14のアミノ酸配列である。

[0010] 前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片は、マウス
ーヒトキメラ抗体であり、可変領域が下記のアミノ酸配列を含むことを好ま
しい態様としている。

ただし、下記重鎖のF R 1～F R 4及び軽鎖のF R 1～F R 4のアミノ酸
配列は、それぞれ、下記配列番号17～24で表されるアミノ酸配列と90

%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

重鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列であり、
重鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、
重鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号3のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号4のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号6のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR1のアミノ酸配列が、配列番号17のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR2のアミノ酸配列が、配列番号18のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR3のアミノ酸配列が、配列番号19のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR4のアミノ酸配列が、配列番号20のアミノ酸配列であり、
軽鎖のFR1のアミノ酸配列が、配列番号21のアミノ酸配列であり、
軽鎖のFR2のアミノ酸配列が、配列番号22のアミノ酸配列であり、
軽鎖のFR3のアミノ酸配列が、配列番号23のアミノ酸配列であり、及
び

軽鎖のFR4のアミノ酸配列が、配列番号24のアミノ酸配列である。

[0011] 前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片は、前記抗ポドプラニン抗体がヒトIgG抗体の定常領域を含むことを好ましい態様としている。

[0012] また、本発明は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含む、ポドプラニンとCLEC-2との結合阻害剤を提供する。

[0013] また、本発明は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含む、医薬組成物を提供する。

前記医薬組成物は、がん細胞の増殖又は転移の抑制のためのものであることを好ましい態様としている。

また、前記医薬組成物は、血小板凝集抑制、抗血栓、又は抗炎症のためのものであることを好ましい態様としている。

また、前記医薬組成物は、前記がん細胞が、ポドプラニン陽性の腫瘍細胞

であることを好ましい態様としている。

[0014] また、本発明は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片のタンパク質部分をコードするDNAを提供する。

また、本発明は、前記DNAを含む、組換えベクターを提供する。

また、本発明は、前記DNA又は前記組換えベクターを含む、宿主細胞を提供する。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、ヒト化抗体若しくはマウスーヒトキメラ抗体である抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を提供することができる。当該抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片は、がん細胞上のポドプラニンと血小板上のCLEC-2との結合を阻害する作用を有するため、例えば、がん細胞の増殖若しくは転移の抑制、血小板凝集抑制、抗血栓、又は抗炎症のための医薬組成物として有用である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明の実施例における、マウスPG4D2抗体によるin vitroでの血小板凝集抑制効果を示すグラフ。

[図2]本発明の実施例における、ヒト化抗体K 4 によるin vitroでの血小板凝集抑制効果を示すグラフ。

[図3]本発明の実施例における、ヒト化抗体K 5 によるin vitroでの血小板凝集抑制効果を示すグラフ。

[図4]本発明の実施例における、ヒト化抗体K 4 又はK 5 による肺への血行性転移抑制効果を示すグラフ。

[図5]本発明の実施例における、ヒト化抗体K 4 又はK 5 による抗腫瘍効果を示すグラフ。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。

尚、本明細書における抗体のアミノ酸配列は、K a b a t 定義によるものである。

[0018] 本発明は、下記のアミノ酸配列を含む、単離された、ヒト化抗体（完全ヒト抗体を含む。）若しくはマウスーヒトキメラ抗体である抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片である。

重鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列であり、
重鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、
重鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号3のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号4のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列であり、及び

軽鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号6のアミノ酸配列である。

[0019] 前記重鎖のCDR1～CDR3及び軽鎖のCDR1～CDR3のアミノ酸配列は、それぞれ、前記配列番号1～6で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

すなわち、前記重鎖のCDR1～CDR3及び軽鎖のCDR1～CDR3のアミノ酸配列は、それらが構成する抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片の抗原結合活性が、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片と実質的に同じである限り、それぞれ、前記配列番号1～6で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

また、前記重鎖のCDR1～CDR3及び軽鎖のCDR1～CDR3のアミノ酸配列は、それらが構成する抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片が、ポドプラニンと血小板上に存在するCLEC-2との結合を阻害する活性を有する限り、それぞれ、前記配列番号1～6で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

所定のアミノ酸配列と所定の同一性を有するアミノ酸配列とは、該所定のアミノ酸配列において置換、欠失、挿入、又は付加がなされたことによるものである。

- [0020] 該置換は保存的置換が好ましい。「保存的置換」とは、ペプチドの活性を実質的に改変しないように、アミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置換えることである。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合等が挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸の例として、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。
- [0021] 本発明の「単離された」とは、生体内に存在するものではないことを意味する。例えば、ある個体で産生され、該個体内に存在する状態の抗体は含まれない。
- [0022] 本発明の「ヒト化抗体」は、可変領域が公知のマウスPG4D2抗体由来の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域とからなり、定常領域がヒト抗体由来の定常領域からなる抗体である。前記ヒト抗体のサブタイプは、本発明の効果が発揮される限り特に制限されないが、好ましくはIgGであり、より好ましくはIgG4である。定常領域のアミノ酸配列としては、例えば、該IgG4抗体の定常領域のアミノ酸配列であり、その重鎖のアミノ酸配列として配列番号25のアミノ酸配列、軽鎖のアミノ酸配列として配列番号26のアミノ酸配列が挙げられる。尚、本発明の「ヒト化抗体」は、「完全ヒト抗体」であってもよい。
- [0023] 本発明の「マウスーヒトキメラ抗体」は、可変領域が公知のマウスPG4D2抗体由来の可変領域であり、定常領域がヒト抗体由来の定常領域である。前記ヒト抗体のサブタイプは、本発明の効果が発揮される限り特に制限されないが、好ましくはIgGであり、より好ましくはIgG4である。定常領域の

アミノ酸配列としては、例えば、該 IgG4 抗体の定常領域のアミノ酸配列であり、上記と同じ、重鎖のアミノ酸配列として配列番号 25 のアミノ酸配列、軽鎖のアミノ酸配列として配列番号 26 のアミノ酸配列が挙げられる。

[0024] 本発明において「抗原結合領域を含む抗体断片」とは、抗体の一部を含むタンパク質であり、抗原に結合できるものをいう。抗体断片の例としては、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、ジスルフィド結合 Fv 、一本鎖抗体 (scFv)、およびこれらの重合体等が挙げられる。当該抗体断片は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の非ペプチド性ポリマー、放射性物質、毒素、低分子化合物、サイトカイン、成長因子、アルブミン、酵素、他の抗体などの機能分子を化学的または遺伝子工学的に結合してもよい。

[0025] 前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片は、本発明の効果が発揮される限り、ヒト化抗体であることが好ましく、可変領域が下記 (I) 又は (II) のアミノ酸配列を含むことが好ましい。

(I) :

重鎖の CDR1 のアミノ酸配列が、配列番号 1 のアミノ酸配列であり、
重鎖の CDR2 のアミノ酸配列が、配列番号 2 のアミノ酸配列であり、
重鎖の CDR3 のアミノ酸配列が、配列番号 3 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の CDR1 のアミノ酸配列が、配列番号 4 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の CDR2 のアミノ酸配列が、配列番号 5 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の CDR3 のアミノ酸配列が、配列番号 6 のアミノ酸配列であり、
重鎖の FR1 のアミノ酸配列が、配列番号 7 のアミノ酸配列であり、
重鎖の FR2 のアミノ酸配列が、配列番号 8 のアミノ酸配列であり、
重鎖の FR3 のアミノ酸配列が、配列番号 9 のアミノ酸配列であり、
重鎖の FR4 のアミノ酸配列が、配列番号 10 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の FR1 のアミノ酸配列が、配列番号 11 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の FR2 のアミノ酸配列が、配列番号 12 のアミノ酸配列であり、
軽鎖の FR3 のアミノ酸配列が、配列番号 13 のアミノ酸配列であり、及

び

軽鎖のF R 4のアミノ酸配列が、配列番号14のアミノ酸配列である；

(I I) :

重鎖のC D R 1のアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列であり、
重鎖のC D R 2のアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、
重鎖のC D R 3のアミノ酸配列が、配列番号3のアミノ酸配列であり、
軽鎖のC D R 1のアミノ酸配列が、配列番号4のアミノ酸配列であり、
軽鎖のC D R 2のアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列であり、
軽鎖のC D R 3のアミノ酸配列が、配列番号6のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 1のアミノ酸配列が、配列番号7のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 2のアミノ酸配列が、配列番号15のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 3のアミノ酸配列が、配列番号16のアミノ酸配列であり、
重鎖のF R 4のアミノ酸配列が、配列番号10のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 1のアミノ酸配列が、配列番号11のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 2のアミノ酸配列が、配列番号12のアミノ酸配列であり、
軽鎖のF R 3のアミノ酸配列が、配列番号13のアミノ酸配列であり、及

び

軽鎖のF R 4のアミノ酸配列が、配列番号14のアミノ酸配列である。

[0026] 前記(I)において、前記重鎖のF R 1～F R 4及び軽鎖のF R 1～F R 4のアミノ酸配列は、それぞれ、前記配列番号7～14で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよく、前記(I I)において、前記重鎖のF R 1～F R 4及び軽鎖のF R 1～F R 4のアミノ酸配列は、それぞれ、前記配列番号7、15、16、10～14で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。その詳細は既述した内容と同様である。

[0027] また、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片は、既述の通り、本発明の効果が発揮される限り、マウスーヒトキメラ抗体であ

ることも好ましく、可変領域が下記のアミノ酸配列を含むことも好ましい。

重鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列であり、
重鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、
重鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号3のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号4のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列であり、
軽鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号6のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR1のアミノ酸配列が、配列番号17のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR2のアミノ酸配列が、配列番号18のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR3のアミノ酸配列が、配列番号19のアミノ酸配列であり、
重鎖のFR4のアミノ酸配列が、配列番号20のアミノ酸配列であり、
軽鎖のFR1のアミノ酸配列が、配列番号21のアミノ酸配列であり、
軽鎖のFR2のアミノ酸配列が、配列番号22のアミノ酸配列であり、
軽鎖のFR3のアミノ酸配列が、配列番号23のアミノ酸配列であり、及び

軽鎖のFR4のアミノ酸配列が、配列番号24のアミノ酸配列である。

[0028] 前記重鎖のFR1～FR4及び軽鎖のFR1～FR4のアミノ酸配列は、それぞれ、前記配列番号17～24で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。その詳細は既述した内容と同様である。

[0029] 本発明の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片は、該構造を構成するアミノ酸配列に基づいて公知の遺伝子工学的手法を用いて製造することができる。

また、その製造においては、得られた前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を回収する工程を含んでもよい。当該回収工程は、精製工程、濃縮工程等であってよい。当該精製工程では、公知の精製技術を用いることができ、本発明の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片が均一になるまで精製してもよい。

[0030] 本発明の抗ポドプラニン抗体は、マルチスペシフィック抗体、機能改変抗体、及びコンジュゲート抗体を含む。その製造方法としては、公知の方法が挙げられる。

[0031] 本発明の他の態様は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含む、ポドプラニンとCLEC-2との結合阻害剤（以下、「本態様の結合阻害剤」などと称することがある。）である。

尚、本態様の結合阻害剤は結合阻害用組成物であってもよい。また、本態様の結合阻害剤及び結合阻害用組成物は、混合物であってよく、その成分は均一でも不均一でもよい。

[0032] 本態様の結合阻害剤は、ポドプラニンとCLEC-2との結合を阻害する作用を有しているため、ポドプラニンとCLEC-2との結合が阻害されることにより得られる効果を有する。

[0033] 本態様の結合阻害剤は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片のうち一種を含有してもよく、複数種を含有してもよい。

本態様の結合阻害剤全量に対する前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片の含有量は、ポドプラニンとCLEC-2との結合が阻害される限り特に限定されないが、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片の総量として、通常0.5 mg/mL以上、好ましくは1 mg/mL以上、より好ましくは10 mg/mL以上であり、また、通常500 mg/mL以下、好ましくは200 mg/mL以下、より好ましくは100 mg/mL以下である。

本態様の結合阻害剤のその他の詳細は、後述する「前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含む医薬組成物」についての記載を援用する。

[0034] 本発明の他の態様は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含む医薬組成物（以下、「本態様の医薬組成物」などと称することがある。）である。

本態様の医薬組成物は、ポドプラニンとCLEC-2との結合を阻害する作用を有しているため、ポドプラニンとCLEC-2との結合が阻害される

ことにより得られる効果を有する。例えば、がん細胞の増殖若しくは転移の抑制効果、血小板凝集抑制効果、抗血栓効果、抗炎症効果等が挙げられる。

したがって、本態様の医薬組成物は、がん細胞の増殖若しくは転移の抑制のため、血小板凝集抑制のため、抗血栓のため、又は抗炎症のための医薬組成物などとして利用することができる。

[0035] 前記がん細胞は、好ましくは、ポドプラニン陽性の腫瘍細胞である。ポドプラニン陽性の腫瘍細胞とは、例えば、中皮腫、脳腫瘍、精巣腫瘍、カポジ肉腫、リンパ管腫、海綿状血管腫、血管肉腫、肺扁平上皮がん、卵巣がん未分化胚細胞腫、神経膠腫、胚細胞腫瘍、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、骨軟部腫瘍（原発性骨腫瘍（骨肉腫、軟骨肉腫）、軟部肉腫）、食道がんの細胞等が挙げられる。

[0036] したがって、本態様の医薬組成物は、がん細胞の増殖若しくは転移の抑制、血小板凝集抑制、抗血栓、抗炎症等によって予防又は治療され得る疾患の予防又は治療に使用することができる。「治療」は、改善を含む。該疾患としては、例えば、中皮腫、脳腫瘍、精巣腫瘍、カポジ肉腫、リンパ管腫、海綿状血管腫、血管肉腫、肺扁平上皮がん、卵巣がん未分化胚細胞腫、神経膠腫、胚細胞腫瘍、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、骨軟部腫瘍（原発性骨腫瘍（骨肉腫、軟骨肉腫）、軟部肉腫）、食道がん等が挙げられる。

[0037] 本態様の医薬組成物は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含有する。すなわち、本態様の医薬組成物は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片のうち一種を含有してもよく、複数種を含有してもよい。

[0038] 本態様の医薬組成物の投与形態は特に制限されず、経口投与又は非経口投与で投与することができる。非経口投与としては、例えば、静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与、脳内投与、脊髄内投与、その他局所投与が挙げられる。

[0039] 経口投与および非経口投与のための剤型およびその調製方法は当業者に周知であり、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を

、薬学的に許容される担体等と配合することにより医薬組成物を製造することができる。

[0040] 非経口投与のための剤型は、注射用製剤、外用剤、坐剤吸入剤、眼剤、眼軟膏剤、点鼻剤、点耳剤、リポソーム剤等が挙げられる。

注射用製剤としては、例えば、点滴注射剤、静脈注射剤、筋肉注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、脳内投与製剤、脊髄内投与製剤等が挙げられる。

外用剤としては、例えば、軟膏剤、パップ剤、ローション剤等が挙げられる。

特に、中枢神経組織に直接作用させたい場合は浸透圧ポンプの医療用マイクロポンプを利用して持続的に注入することもできるし、フィブリン糊などと混合し徐放製剤としたうえで患部組織に留置することもできる。

このうち、例えば、注射用製剤は、通常、抗体を注射用蒸留水に溶解して調製するが、必要に応じて溶解補助剤、緩衝剤、pH調整剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、安定化剤等を添加することができる。また、用事調製用の凍結乾燥製剤とすることもできる。

[0041] 経口投与のための剤型は、固体または液体の剤型、具体的には錠剤、被覆錠剤、丸剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、注射剤、トローチ剤等が挙げられる。

[0042] 本態様の医薬組成物は、治療上有効な他の薬剤を更に含有していてもよく、また、必要に応じて、殺菌剤、消炎剤、ビタミン類、アミノ酸等の成分を配合することもできる。

[0043] 薬理学的に許容される担体としては、例えば固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤及び崩壊剤、あるいは液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤及び無痛化剤等が挙げられる。更に必要に応じ、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量で用いることもできる。

[0044] 本態様の医薬組成物の投与量は、例えば、投与経路、疾患の種類、症状の程度、患者の年齢、性別、体重、疾患の重篤度、薬物動態および毒物学的特

徴等の薬理学的知見、薬物送達系の利用の有無、並びに他の薬物の組合せの一部として投与されるか、など様々な因子を元に、医師により決定される。

[0045] 本態様の医薬組成物は、経口または非経口で投与することができる。非経口投与である場合には、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔注入、内皮投与、局所投与、鼻内投与、肺内投与および直腸内投与などで投与することができるが、これらに限定されるものではない。投与量は、特に制限されないが、通常、1日あたり約 $0.01\mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $1000\text{mg}/\text{kg}$ であり、好ましくは1日あたり約 $0.01\text{mg}/\text{kg}$ から約 $100\text{mg}/\text{kg}$ であり、さらに好ましくは1日あたり約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ から約 $20\text{mg}/\text{kg}$ である。医薬組成物は、毎日、週に1回、月に1～4回または年に1～7回などの間隔で投与することができるが、これらに限定されるものではない。

[0046] 本態様の医薬組成物は、単独で投与してもよいし、他の医薬組成物又は医薬、例えば、皮腫、脳腫瘍、精巣腫瘍、カポジ肉腫、リンパ管腫、海綿状血管腫、血管肉腫、肺扁平上皮がん、卵巣がん未分化胚細胞腫、神経膠腫、胚細胞腫瘍、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、骨軟部腫瘍（原発性骨腫瘍（骨肉腫、軟骨肉腫）、軟部肉腫））、食道がんの予防若しくは治療のための医薬組成物又は医薬等と併用してもよい。

[0047] また、本発明は下記の態様を含む。

〔1〕ポドプラニンとCLEC-2との結合阻害剤又はポドプラニンとCLEC-2との結合を阻害するための組成物を製造するための、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片の使用。

〔2〕ポドプラニンとCLEC-2との結合阻害によって予防又は治療され得る疾患の予防又は治療における使用のための、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片。

〔3〕前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片の予防的又は治療的有效量を、予防又は治療を必要とするヒト又は患者に投与することを含む、ポドプラニンとCLEC-2との結合阻害によって予防又は治療され得る疾患の予防方法又は治療方法。

〔４〕ポドプラニンとＣＬＥＣ－２との結合阻害のための、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片の使用。

〔５〕ポドプラニンとＣＬＥＣ－２との結合阻害に用いられる、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片。

〔６〕（ｉ）前記抗ポドプラニン抗体若しくはその抗原結合領域を含む抗体断片、（ｉｉ）ポドプラニンとＣＬＥＣ－２との結合阻害剤、又は（ｉｉｉ）ポドプラニンとＣＬＥＣ－２との結合を阻害するための組成物をヒトに投与する段階を含む、ポドプラニンとＣＬＥＣ－２との結合を阻害する方法。

[0048] 本発明の他の態様は、前記抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片のタンパク質部分をコードするＤＮＡである。前記抗ポドプラニン抗体のタンパク質部分をコードするＤＮＡの塩基配列は、当該タンパク質のアミノ酸配列に基づいて当業者であれば容易に設計できる。具体例としては、実施例に記載したヌクレオチド配列（配列番号２７～５２）が挙げられる。

また、本態様のＤＮＡには、シグナルペプチドをコードする配列やコザック配列を付加してもよい。

本態様のＤＮＡは、公知の遺伝子工学的手法を用いて製造することができる。

[0049] 本発明の他の態様は、前記ＤＮＡを含む、組換えベクターである。

本態様の組換えベクターとしては、公知のベクターであってよく、プラスミドベクター、ウイルスベクターを挙げることができる。大腸菌のような原核細胞において発現可能なベクターであってもよいが、真核細胞において発現可能なベクターが好ましく、哺乳動物由来の細胞において発現可能なベクターがより好ましい。

[0050] 本発明の他の態様は、前記ＤＮＡ又は前記組換えベクターを含む、宿主細胞（形質転換体）である。

本態様の宿主細胞は、前記ＤＮＡ又は前記組換えベクターが導入され、形質転換するものである。本態様の宿主細胞としては、公知の細胞であってよ

く、例えば、大腸菌、枯草菌のような原核細胞であってもよいが、真核細胞が好ましく、哺乳動物由来の細胞がより好ましい。

- [0051] 前記宿主細胞としては、例えば、CHO細胞（その系統としてCHO-S細胞等）等が挙げられ、当該細胞で発現するベクターとしては、例えば、Freedom（登録商標）pCHO 1.0（Thermo Fisher Scientific）等が挙げられる。

実施例

- [0052] 以下に実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

- [0053] 〔実施例 1〕

（抗ポドプラニン抗体であるヒト化抗体のアミノ酸配列の決定）

マウスPG4D2抗体を改変してヒト化抗体を作製するために、抗体データベースであるIMGT及びAbysis databaseを用いて、Kabatナンバリングにより、マウスPG4D2抗体の重鎖及び軽鎖の各CDR及び各FR領域を決定した。次に、IMGTデータベースを用いて、重鎖及び軽鎖のFR領域の配列から、当該アミノ酸配列と同一性の高いヒト生殖細胞系列（germline, GL）のFR領域をそれぞれ選定した。FRシャッフリングの手法を用いて、FR1～4のそれぞれに対して最もアミノ酸同一性の高いFR配列を選定し、FR1～4の組合せを決定した。重鎖及び軽鎖それぞれについて、選定したヒト生殖細胞系列のFR領域にマウスPG4D2抗体の相補性決定領域を移植し、ヒト化抗体の候補配列を設計した。さらに、所定のアミノ酸残基が全て完全に保存されているか；FR領域の等電点（pI）が著しく高くないか；選定したGLのFR配列の使用頻度が著しく低くないか；化学修飾部位を有しないか；マウスPG4D2抗体と比較して保存されていないアミノ酸残基について、アミノ酸側鎖の疎水性、体積及び物理化学的性質の3つの観点から、2つ以上性質の異なる残基を有するか；アミノ酸配列の同一性が大きいかな等の検討に基づいて、2種類のヒト化抗体K 4、K 5のアミノ酸配列を決定した。すなわち、ヒト化抗体K 4、K 5は、マウスPG4D2抗体の重鎖及び軽鎖の各FR領域のアミノ酸配列を単純に置換して得られたものではない。

[0054] 〔製造例 1〕 抗ポドプラニン抗体であるヒト化抗体の製造

製造したヒト化抗体 K 4、K 5 の各アミノ酸配列を下記に示す。

ヒト化抗体 K 4 のアミノ酸配列は、可変領域は、重鎖の C D R 1 : 配列番号 1 のアミノ酸配列、重鎖の C D R 2 : 配列番号 2 のアミノ酸配列、重鎖の C D R 3 : 配列番号 3 のアミノ酸配列、軽鎖の C D R 1 : 配列番号 4 のアミノ酸配列、軽鎖の C D R 2 : 配列番号 5 のアミノ酸配列、軽鎖の C D R 3 : 配列番号 6 のアミノ酸配列、重鎖の F R 1 : 配列番号 7 のアミノ酸配列、重鎖の F R 2 : 配列番号 8 のアミノ酸配列、重鎖の F R 3 : 配列番号 9 のアミノ酸配列、重鎖の F R 4 : 配列番号 10 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 1 : 配列番号 11 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 2 : 配列番号 12 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 3 : 配列番号 13 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 4 : 配列番号 14 のアミノ酸配列であり、定常領域は、ヒト I g G 4 抗体のアミノ酸配列であり、その重鎖のアミノ酸配列は配列番号 25 のアミノ酸配列であり、その軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 26 のアミノ酸配列である。

[0055] ヒト化抗体 K 5 のアミノ酸配列は、可変領域は、重鎖の C D R 1 : 配列番号 1 のアミノ酸配列、重鎖の C D R 2 : 配列番号 2 のアミノ酸配列、重鎖の C D R 3 : 配列番号 3 のアミノ酸配列、軽鎖の C D R 1 : 配列番号 4 のアミノ酸配列、軽鎖の C D R 2 : 配列番号 5 のアミノ酸配列、軽鎖の C D R 3 : 配列番号 6 のアミノ酸配列、重鎖の F R 1 : 配列番号 7 のアミノ酸配列、重鎖の F R 2 : 配列番号 15 のアミノ酸配列、重鎖の F R 3 : 配列番号 16 のアミノ酸配列、重鎖の F R 4 : 配列番号 10 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 1 : 配列番号 11 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 2 : 配列番号 12 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 3 : 配列番号 13 のアミノ酸配列、軽鎖の F R 4 : 配列番号 14 のアミノ酸配列であり、定常領域は、上記ヒト化抗体 K 4 の定常領域のアミノ酸配列と同一である。

[0056] また、上記の各アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列として、下記配列のヌクレオチド配列を用いた。

配列番号 1 ～ 16 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列として、

それぞれ、配列番号 27～42 のヌクレオチド配列を用いた。

配列番号 25（重鎖の定常領域）のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列として、配列番号 43 のヌクレオチド配列、及び

配列番号 26（軽鎖の定常領域）のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列として配列番号 44 のヌクレオチド配列を用いた。

[0057] CHO細胞（Thermo Fisher Scientific）での発現のために、発現ベクターとしてFreedom（登録商標）pCHO 1.0（Thermo Fisher Scientific）を採用した。

[0058] ヒト化抗体K4及びK5を発現するCHO細胞のそれぞれを融解後、拡大培養し、攪拌型細胞培養槽で10 Lスケールのフェドバッチ培養を行った。培養条件は、攪拌速度100 rpm、培養温度37 °C、pH 7.0とし、6～8日間培養後、培養液を回収した。

回収した培養液を精製し、ヒト化抗体K4及びK5を得た。尚、回収した培養液の上清は、後述する実施例2、実施例3の測定に用いた。

[0059] 「製造例2」抗ポドプラニン抗体であるマウスーヒトキメラ抗体の製造

マウスーヒトキメラ抗体chPG4D2の各アミノ酸配列を下記に示す。

マウスーヒトキメラ抗体chPG4D2のアミノ酸配列は、可変領域は、重鎖のCDR1：配列番号1のアミノ酸配列、重鎖のCDR2：配列番号2のアミノ酸配列、重鎖のCDR3：配列番号3のアミノ酸配列、軽鎖のCDR1：配列番号4のアミノ酸配列、軽鎖のCDR2：配列番号5のアミノ酸配列、軽鎖のCDR3：配列番号6のアミノ酸配列、重鎖のFR1：配列番号17のアミノ酸配列、重鎖のFR2：配列番号18のアミノ酸配列、重鎖のFR3：配列番号19のアミノ酸配列、重鎖のFR4：配列番号20のアミノ酸配列、軽鎖のFR1：配列番号21のアミノ酸配列、軽鎖のFR2：配列番号22のアミノ酸配列、軽鎖のFR3：配列番号23のアミノ酸配列、軽鎖のFR4：配列番号24のアミノ酸配列であり、定常領域は、上記ヒト化抗体K4の定常領域のアミノ酸配列と同一である。

[0060] マウスーヒトキメラ抗体chPG4D2は、上記配列番号1～6及び17～24の

各アミノ酸配列及び上記ヒト化抗体K 1 の定常領域の各アミノ酸配列をコードする各ヌクレオチドを設計すれば、製造例 1 と同様にして製造できることは、当業者であれば容易に理解できる。

このとき、上記の各アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列として、例えば、下記配列のヌクレオチド配列を用いることができる。

配列番号 1 ～ 6、 1 7 ～ 2 4 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列として、それぞれ、配列番号 2 7 ～ 3 2、 4 5 ～ 5 2 のヌクレオチド配列を用いることができる。

尚、定常領域のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、製造例 1 に記載したものと同一のものを用いることができる。

[0061] CHO細胞 (Thermo Fisher Scientific) での発現のために、発現ベクターとしてFreedom (登録商標) pCHO 1.0 (Thermo Fisher Scientific)を採用した。

[0062] マウスーヒトキメラ抗体chPG4D2を発現するCHO細胞を融解後、拡大培養し、攪拌型細胞培養槽で5 Lスケールのバッチ培養を行った。培養条件は、攪拌速度100 rpm、培養温度37 °C、pH 7.0とし、7日間培養後、培養液を回収した。

回収した培養液を精製し、マウスーヒトキメラ抗体chPG4D2を得た。尚、回収した培養液の上清は、後述する実施例 2、実施例 3 の測定に用いた。

[0063] [実施例 2] 各抗体のポドプラニン結合活性

製造例 1 及び製造例 2 で回収した培養液の上清を用いて、ポドプラニンPLAG4ドメインに対する結合活性を、特許文献 1 に記載のELISA法に準ずる方法により測定した。抗原ペプチドとしてヒトポドプラニンPLAG4ドメインペプチド (WT-hPLAG4 (Genscript, 788349-1)) を固相化し、検出には、Goat Anti-Human IgG Fc (Biotin) preadsorbed (Abcam, ab98618)と、Streptavidin β -Gal conjugate (ロシュ・ダイアグノスティック、11112481001) とを用いた。

結果を表 1 に示す。尚、結合活性 (抗体力価) は、マウスーヒトキメラ抗体chPG4D2の場合を100 %として表した。

[0064] [表1]

表 1

抗体	結合活性（抗体力価）（%）
ヒト化抗体 K 4	84.8-171.8
ヒト化抗体 K 5	90.0-111.5
マウスーヒトキメラ抗体 chPG4D2	100

[0065] [実施例 3] 各抗体のCLEC-2とポドプラニンとの結合阻害活性

製造例 1 及び製造例 2 で得られた各培養上清を用いて、CLEC-2とポドプラニンとの結合阻害活性を、特許文献 1 に記載のELISA法に準ずる方法により測定した。抗原ペプチドとしてRecombinant Human CLEC-2 (R&D, 1718-CL-050) を固相化し、これと結合するタンパク質としてRecombinant Human Podoplanin Fc Chimera (R&D, 3670-PL) を用い、検出には、Goat Anti-Human IgG Fc (Biotin) preadsorbed (Abcam, ab98618)と、Streptavidin- β -galactosidase conjugate (SIGMA, S3887, Roche, 11112481001)とを用いた。

尚、陽性対照として、マウスPG4D2抗体 (PG4D2) を用いた。マウスPG4D2抗体は、NITE P-02071 (PG4D2)のハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体である。

結果を表 2 に示す。

[0066] [表2]

表 2

抗体	IC ₅₀ (ng/mL)	阻害形式
ヒト化抗体 K 4	360	完全阻害
ヒト化抗体 K 5	364	完全阻害
マウスーヒトキメラ抗体 chPG4D2	406	完全阻害
マウス PG4D2 抗体 (PG4D2)	371 $\pm$ 14 (mean $\pm$ SD)	完全阻害

[0067] [実施例 4] 各抗体のin vitroでの血小板凝集抑制効果

血小板凝集を引き起こさない細胞株であるCHO細胞にヒトポドプラニン遺伝子を導入すれば、血小板凝集を引き起こすようになることが知られている (J. Biol. Chem., Dec 19;278(51):51599-605 (2003))。

ヒトポドプラニン陽性の骨肉腫細胞株SJSA-1 (ATCC CRL-2098)をヒト全血

に添加し、誘導される血小板凝集を各抗体が抑制するかを全血血小板凝集測定装置WBA CARNA（タイヨウ）を用いて解析した。骨肉腫細胞株SJSA-1（ATCC CRL-2098）は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（住所：123 01 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, United States of America）から入手することができる。

尚、ヒト化抗体K 4 及びK 5 を用いた系における陰性対照として、ヒトIgG 4抗体（CrownBio, C0004）を用いた。

また、このin vitro解析系は、細胞が誘導した凝集塊を含む全血をマイクロメッシュフィルター越しに吸引し、凝集塊による目詰まりで上昇した吸引圧力を測定することで凝集率を算出するものである。

陽性対照としてマウスPG4D2抗体（PG4D2）を用いた。また、マウスPG4D2抗体を用いた系における陰性対照として、マウスIgG2a抗体（Sigma, M9144）を用いた。

結果を図1～図3に示す。ヒト化抗体K 4 及びK 5 は、陽性対照と同様に濃度依存的に血小板凝集を抑制した。

[0068] 「実施例5」各抗体の肺への血行性転移抑制効果

ヒトポドプラニン陽性の骨肉腫細胞株SJSA-1（ATCC CRL-2098）を、重度複合免疫不全マウスSCID-Beige（CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-J}/CrJCrJ）（日本チャールスリバー、雌性、6週齢）の尾静脈より注射し、20日後に肺表面に形成された転移結節数を計測するという血行性転移モデルを用い、各抗体の血行性転移抑制効果を解析した。

SJSA-1細胞注射の前日にコントロール抗体（ヒトIgG4抗体（CrownBio））、ヒト化抗体K 4 又はK 5 を、尾静脈経路で各群6匹のマウスに投与し、ポドプラニン依存的な実験的肺転移に与える影響を検討した。

結果を図4に示す。ヒト化抗体K 4 又はK 5 を事前に投与することにより、SJSA-1細胞株の肺転移が顕著に抑制された。

[0069] 「実施例6」各抗体の抗腫瘍効果

ヒトポドプラニン陽性の 5×10^6 個の骨肉腫細胞株SJSA-1（ATCC CRL-2098）を

、重度複合免疫不全マウスSCID-Beige (CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-J}/CrlCrlj) (日本チャールスリバー、雌性、5週齢)の皮下に移植してゼノグラフトマウスを作製し、ヒト化抗体K4、K5のin vivoにおける抗腫瘍効果を評価した。

K4投与群、K5投与群には、各々ヒト化抗体K4、K5を移植第1日から週2回(第1日、第4日、第8日、第11日、第15日)、5 mg/kgで投与した。週2回、腫瘍サイズ($1/2 \text{長径} \times (\text{短径})^2$)と体重の測定を行った(n=6)。エンドポイント(20日経過後)にて、写真撮影と、摘出した腫瘍の重量測定を行った。

尚、陰性対照として、ヒトIgG4抗体(Sino Biological, HG4K)を用いた。

結果(移植後の日数と腫瘍サイズの平均との関係)を図5に示す(Kruskal-Wallis検定により、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。K4投与群、K5投与群において、腫瘍増殖抑制効果が認められた。尚、この試験時におけるマウスの有意な体重減少はいずれにおいても認められなかった。

請求の範囲

[請求項1] 下記のアミノ酸配列を含む、単離された、ヒト化抗体若しくはマウスーヒトキメラ抗体である抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片。

ただし、下記重鎖のCDR1～CDR3及び軽鎖のCDR1～CDR3のアミノ酸配列は、それぞれ、下記配列番号1～6で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

重鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列であり、

重鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、

重鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号3のアミノ酸配列であり、

軽鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号4のアミノ酸配列であり、

軽鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列であり、及び

軽鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号6のアミノ酸配列である。

[請求項2] ヒト化抗体であり、可変領域が下記(Ⅰ)又は(Ⅱ)のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片。

ただし、下記(Ⅰ)において、下記重鎖のFR1～FR4及び軽鎖のFR1～FR4のアミノ酸配列は、それぞれ、下記配列番号7～14で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよく、

下記(Ⅱ)において、下記重鎖のFR1～FR4及び軽鎖のFR

1～FR4のアミノ酸配列は、それぞれ、下記配列番号7、15、16、10～14で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

(I) :

重鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸配列であり、

重鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、

重鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号3のアミノ酸配列であり、

軽鎖のCDR1のアミノ酸配列が、配列番号4のアミノ酸配列であり、

軽鎖のCDR2のアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列であり、

軽鎖のCDR3のアミノ酸配列が、配列番号6のアミノ酸配列であり、

重鎖のFR1のアミノ酸配列が、配列番号7のアミノ酸配列であり、

重鎖のFR2のアミノ酸配列が、配列番号8のアミノ酸配列であり、

重鎖のFR3のアミノ酸配列が、配列番号9のアミノ酸配列であり、

重鎖のFR4のアミノ酸配列が、配列番号10のアミノ酸配列であり、

軽鎖のFR1のアミノ酸配列が、配列番号11のアミノ酸配列であり、

軽鎖のFR2のアミノ酸配列が、配列番号12のアミノ酸配列であり、

軽鎖の F R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 1 3 のアミノ酸配列であり、及び

軽鎖の F R 4 のアミノ酸配列が、配列番号 1 4 のアミノ酸配列である；

(I I) :

重鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 1 のアミノ酸配列であり、

重鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 2 のアミノ酸配列であり、

重鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 3 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 4 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 5 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 6 のアミノ酸配列であり、

重鎖の F R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 7 のアミノ酸配列であり、

重鎖の F R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 1 5 のアミノ酸配列であり、

重鎖の F R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 1 6 のアミノ酸配列であり、

重鎖の F R 4 のアミノ酸配列が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の F R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 1 1 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の F R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 1 2 のアミノ酸配列であ

り、

軽鎖の F R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 1 3 のアミノ酸配列であり、及び

軽鎖の F R 4 のアミノ酸配列が、配列番号 1 4 のアミノ酸配列である。

[請求項3]

マウスーヒトキメラ抗体であり、可変領域が下記のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片。

ただし、下記重鎖の F R 1 ～ F R 4 及び軽鎖の F R 1 ～ F R 4 のアミノ酸配列は、それぞれ、下記配列番号 1 7 ～ 2 4 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

重鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 1 のアミノ酸配列であり、

重鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 2 のアミノ酸配列であり、

重鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 3 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の C D R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 4 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の C D R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 5 のアミノ酸配列であり、

軽鎖の C D R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 6 のアミノ酸配列であり、

重鎖の F R 1 のアミノ酸配列が、配列番号 1 7 のアミノ酸配列であり、

重鎖の F R 2 のアミノ酸配列が、配列番号 1 8 のアミノ酸配列であり、

重鎖の F R 3 のアミノ酸配列が、配列番号 1 9 のアミノ酸配列であ

り、

重鎖のFR4のアミノ酸配列が、配列番号20のアミノ酸配列であ

り、

軽鎖のFR1のアミノ酸配列が、配列番号21のアミノ酸配列であ

り、

軽鎖のFR2のアミノ酸配列が、配列番号22のアミノ酸配列であ

り、

軽鎖のFR3のアミノ酸配列が、配列番号23のアミノ酸配列であ

り、及び

軽鎖のFR4のアミノ酸配列が、配列番号24のアミノ酸配列である。

[請求項4] 前記抗ポドプラニン抗体がヒトIgG抗体の定常領域を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含む、ポドプラニンとCLEC-2との結合阻害剤。

[請求項6] 請求項1～4のいずれか1項に記載の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片を含む、医薬組成物。

[請求項7] がん細胞の増殖又は転移の抑制のための、請求項6に記載の医薬組成物。

[請求項8] 血小板凝集抑制、抗血栓、又は抗炎症のための、請求項6に記載の医薬組成物。

[請求項9] 前記がん細胞が、ポドプラニン陽性の腫瘍細胞である、請求項7に記載の医薬組成物。

[請求項10] 請求項1～4のいずれか1項に記載の抗ポドプラニン抗体又はその抗原結合領域を含む抗体断片のタンパク質部分をコードするDNA。

[請求項11] 請求項10に記載のDNAを含む、組換えベクター。

[請求項12] 請求項10に記載のDNA又は請求項11に記載の組換えベクターを含む、宿主細胞。