

明 細 書

発明の名称：抗CD147抗体

技術分野

[0001] 本発明は、優れた抗腫瘍効果を示す抗CD147抗体、該抗CD147抗体の製造方法及び該抗CD147抗体を含む抗腫瘍剤等に関する。

背景技術

[0002] 癌治療法、治療薬の進展によって、不治の病とされてきた癌が、治療可能であり、根治することがわかってきた。特に優れた薬物安定性と特異性を示す抗体医薬として開発されたCTLA4抗体、PD1抗体は、T細胞をはじめとする免疫細胞の活性化によって、メラノーマや一部の固形癌に高い奏功率、場合によっては治癒をもたらし、癌患者にとっての福音となっている。これらの治療薬が、難治性の固形癌の多くを対象としての治療が試みられているが、膵臓癌や肝臓癌等では、大部分の癌が薬剤に感受性を示さず、手術による摘出や従来抗腫瘍剤を基本とした治療でも高率に再発が認められ、切に根治をもたらす治療法、治療薬が求められている。

[0003] CD147は、イムノグロブリン様ドメインを2～3有する1回膜貫通蛋白質であり、CD147同士の相互作用、CD44、Integrinファミリー分子、CD98、VEGFR、CypA/B、MCT1/3/4といった増殖、浸潤、炎症に関与する細胞外や細胞膜表面の分子と相互作用することで、下流シグナル関連分子、FAK、MEK、Erk、JAK/STAT、AKT、MAPKファミリー分子を活性化させ、MMPをはじめとするプロテアーゼ産生、癌の増殖、転移、浸潤を促すことが知られている。また前出の肝臓癌や膵臓癌の患者において、CD147の発現が高いと生存期間が短く予後不良となることが報告されており、癌の治療標的分子の一つとして考えられている。

[0004] CD147を標的とした抗体としては、ABX-CBL、Licartinが臨床で実際にヒトに投与された。ABX-CBLは、CD147とシク

ロフィリンAとの結合を阻害し、T細胞の活性を抑制するだけでなく、血中の補体依存的にCD147陽性のT細胞をはじめとする正常細胞に対し殺細胞活性を示す。GVHDを対象疾患として臨床試験が進められたが、薬効が不十分であり、重篤な筋肉の痛みが観察され、薬としての承認には至っていない（特許文献1、非特許文献1）。

[0005] Licartinは、HA b18抗体のFab' 2部分に放射性同位元素iodine I 131を付加した生物製剤であり、中国で肝臓癌を適応癌種として、承認されている（非特許文献2、非特許文献3）。Licartinは、免疫細胞や補体を活性化させる抗体のFc部分を欠いており、免疫介在性の毒性は報告がないが、臨床での肝臓癌を根治したという報告はない。

[0006] また、他のCD147を標的とした抗体としては、血管新生、VEGF産生マトリックスメタロプロテアーゼ等のCD147に関連する生物活性を遮断する、抗CD147モノクローナル抗体（特許文献2）、T細胞の活性化を阻害する抗CD147モノクローナル抗体（非特許文献4）、及びADCC活性及びCDC活性を有することを特徴とするCD147分子に特異的に結合する抗体（特許文献3）が知られている。しかし、エフェクター機能を有さずかつ抗腫瘍効果を示すCD147抗体は知られていない。また、CD147を介した細胞シグナル伝達系の活性化と抗腫瘍効果の関連については知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO1999/045031

特許文献2：WO2010/036460

特許文献3：WO2017/061602

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Deeg H, et al., J. Blood., 2052-2058, 2001

非特許文献2: Chen Z, et al., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 435-444, 2006

非特許文献3: Xu J, et al., Hepatology, 269-276, 2007

非特許文献4: Koch C, et al., International Immunology, 777-786, 1999

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明の課題は、新規な薬理作用を有し、安全性に優れ、かつ、高い抗腫瘍効果を有する新規抗CD147抗体、該抗体を含む医薬品、及び、当該抗体又は医薬品を用いた腫瘍の治療方法等を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意検討し、CD147を介した関連シグナル分子の活性化が抗腫瘍効果に関連することを初めて見出した。そして、本発明者らは、CD147を活性化し、高い抗腫瘍効果を示すCD147特異的抗体の取得に成功した。本発明の抗体は、エフェクター機能に依存せずに高い抗腫瘍効果を示すという特徴を有する。また、これまでにエフェクター機能に依存して抗腫瘍効果を示す抗体は報告されているが、本発明の抗体は、T細胞及びPBMCに対して作用せず、かつ、エフェクター機能にも依存せずに高い抗腫瘍効果を示すという特徴を有し、医薬品としての安全性が期待される優れた抗体である。本発明の抗体は、肝臓癌細胞において、肝臓癌の標準治療薬のうちの1つとして使用されるソラフェニブよりも顕著に強い薬効を示す。本発明の抗体は、膵臓癌細胞において、膵臓癌の標準治療薬のうちの1つとして使用されるゲムシタビンよりも顕著に強い薬効を示す。また、本発明の抗体は、慢性骨髄性白血病細胞において、慢性骨髄性白血病の標準治療薬のうちの1つとして使用されるイマチニブよりも顕著に強い薬効を示す。本発明者らは、本発明のCD147抗体が、癌細胞に対しp38MAPKおよびSMADシグナル伝達系を活性化することを見出し

た。また、本発明者らは、本発明のCD147抗体が、SMAD4陽性細胞において優れた抗腫瘍効果を示すことを見出した。

[0011] 本願発明は以下の発明を包含する。

[1]

以下の(A)～(F)からなる群から選択される少なくともいずれか1つの抗体と、ヒトCD147への結合に対し競合し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

(A) 配列番号71に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号69に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(B) 配列番号51に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号49に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(C) 配列番号61に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号59に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(D) 配列番号81に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号79に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(E) 配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、及び

(F) 配列番号20に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体。

[2]

以下の(A)～(F)からなる群から選択される少なくともいずれか1つの抗体が結合するエピトープに結合し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

(A) 配列番号71に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号69に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(B) 配列番号51に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配

列番号 49 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、
(C) 配列番号 61 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 59 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、
(D) 配列番号 81 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 79 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、
(E) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、及び
(F) 配列番号 20 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 18 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体。

[3]

ADCC 活性が低下又は欠失した、[1] 又は [2] に記載のヒト CD147 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[4]

CDC 活性が低下又は欠失した、[1] ～ [3] のいずれか 1 項に記載のヒト CD147 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[5]

ADCP 活性が低下又は欠失した、[1] ～ [4] のいずれか 1 項に記載のヒト CD147 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[0012] [6]

配列番号 3 の 106 番目のアルギニン (Arg) から 165 番目のグリシン (Gly) の残基を含むエピトープに結合する、[1] ～ [5] のいずれか 1 項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[7]

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列中の、106 番目のアルギニン (Arg)、108 番目のリシン (Lys)、109 番目のアラニン (Ala)、110 番目のバリン (Val)、127 番目のリシン (Lys)、128 番目のセリン (Ser)、129 番目のグルタミン酸 (Glu)、130 番目のセリン (Ser)、131 番目のバリン (Val)、132 番目のプロリン

(P r o)、133番目のプロリン(P r o)、134番目のバリン(V a l)、164番目のグルタミン(G l n)及び165番目のグリシン(G l y)の各残基を含むエピトープに結合する、[1]～[6]のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[8]

重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号75に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号76に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号77に示されるアミノ酸配列からなること；及び軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号72に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号73に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号74に示されるアミノ酸配列からなること；を特徴とする、[1]～[7]のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[9]

配列番号143に記載のアミノ酸配列、又は、配列番号143の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含むエピトープに結合する、[1]～[5]のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[10]

重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号55に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号56に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号57に示されるアミノ酸配列からなること；及び軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号52に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号53に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3

は、配列番号 54 に示されるアミノ酸配列からなること；
を特徴とする、[1]～[5]又は9のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[0013] [11]

重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号65に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号66に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号67に示されるアミノ酸配列からなること；及び
軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号62に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号63に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号64に示されるアミノ酸配列からなること；
を特徴とする、[1]～[5]又は9のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[12]

重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号85に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号86に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号87に示されるアミノ酸配列からなること；及び
軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号82に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号83に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号84に示されるアミノ酸配列からなること；
を特徴とする、[1]～[5]又は9のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[13]

Fab、F(ab')₂、Fab'及びFvからなる群から選択される、
[1]～[12]のいずれか1項に記載の抗体の抗原結合断片。

[1 4]

s c F vであることを特徴とする、[1] ~ [1 2] のいずれか1項に記載の抗体。

[1 5]

キメラ抗体であることを特徴とする、[1] ~ [1 2] のいずれか1項に記載の抗体文は該抗体の抗原結合断片。

[0014] [1 6]

ヒト化されていることを特徴とする、[1] ~ [1 2] のいずれか1項に記載の抗体文は該抗体の抗原結合断片。

[1 7]

重鎖がヒト免疫グロブリンG 1 重鎖、ヒト免疫グロブリンG 2 重鎖又はヒト免疫グロブリンG 4 重鎖の定常領域を含み、軽鎖がヒト免疫グロブリンκ軽鎖の定常領域を含む、[1] ~ [1 6] のいずれか1項に記載の抗体。

[1 8]

重鎖がヒト免疫グロブリンG 4 重鎖の定常領域を含む、[1 7] に記載の抗体。

[1 9]

ヒト免疫グロブリンG 4 重鎖の定常領域において、E Uインデックスにより示される2 2 8番目のセリン (S e r) がプロリン (P r o) により置換された、[1 8] に記載の抗体。

[2 0]

ヒト免疫グロブリンG 4 重鎖の定常領域において、E Uインデックスにより示される2 3 4番目のフェニルアラニン (P h e) がアラニン (A l a) へ置換され、2 3 5番目のロイシン (L e u) がアラニン (A l a) に置換されている、[1 8] の抗体。

[0015] [2 1]

ヒト免疫グロブリンG 4 重鎖の定常領域において、E Uインデックスにより示される2 2 8番目のセリン (S e r) がプロリン (P r o) により置換

され、234番目のフェニルアラニン（P h e）がアラニン（A l a）へ置換され、235番目のロイシン（L e u）がアラニン（A l a）に置換されている、[18]の抗体。

[22]

重鎖がヒト免疫グロブリンG2重鎖の定常領域を含む、[17]に記載の抗体。

[23]

以下の（c）及び（d）を有し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

（c）以下の（c1）～（c4）からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

（c1）配列番号135に示されるアミノ酸配列の20～136番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

（c2）配列番号147に示されるアミノ酸配列の20～136番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

（c3）（c1）又は（c2）の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

（c4）（c1）～（c3）のいずれか1に記載の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

（d）以下の（d1）～（d5）からなる群から選択されるいずれか1に記載の軽鎖可変領域：

（d1）配列番号137に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

（d2）配列番号149に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(d 3) 配列番号 1 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(d 4) (d 1) ~ (d 3) のいずれか 1 に記載の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(d 5) (d 1) ~ (d 4) のいずれか 1 に記載の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[2 4]

配列番号 1 3 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 3 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、[2 3] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[0016] [2 5]

配列番号 1 3 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 3 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、[2 3] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[2 6]

配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 4 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、[2 3] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[2 7]

配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 4 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、[2 3] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[28]

配列番号147に示されるアミノ酸配列の20～136番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号151に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、[23]に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[29]

配列番号147に示されるアミノ酸配列の20～463番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号151に示されるアミノ酸配列の21～234番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、[23]に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[30]

以下の(a)及び(b)を有し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

(a) 以下の(a1)～(a4)からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

(a1) 配列番号123に示されるアミノ酸配列の20～140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(a2) 配列番号125に示されるアミノ酸配列の20～140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(a3) (a1)又は(a2)の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(a4) (a1)～(a3)のいずれか1に記載の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(b) 以下の(b1)～(b3)からなる群から選択されるいずれか1に記載の軽鎖可変領域：

(b 1) 配列番号 1 2 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(b 2) (b 1) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(b 3) (b 1) 又は (b 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[0017] [3 1]

配列番号 1 2 3 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域又は配列番号 1 2 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 2 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、[3 0] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[3 2]

配列番号 1 2 3 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖又は配列番号 1 2 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 2 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、[3 0] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[3 3]

以下の (e) 及び (f) を有し、かつ、C D 1 4 7 を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片：

(e) 以下の (e 1) ~ (e 4) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の重鎖可変領域：

(e 1) 配列番号 1 2 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(e 2) 配列番号 1 3 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(e 3) (e 1) 又は (e 2) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(e 4) (e 1) ~ (e 3) のいずれか 1 に記載の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(f) 以下の (f 1) ~ (f 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の軽鎖可変領域：

(f 1) 配列番号 1 3 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(f 2) (f 1) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(f 3) (f 1) 又は (f 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[3 4]

配列番号 1 2 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域又は配列番号 1 3 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 3 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、[3 3] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[3 5]

配列番号 1 2 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖又は配列番号 1 3 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 4 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 3 3 に示されるアミノ

酸配列の21～234番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、[33]に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[0018] [36]

以下の(g)及び(h)を有し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

(g)以下の(g1)～(g3)からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

(g1)配列番号139に示されるアミノ酸配列の20～138番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(g2)(g1)の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(g3)(g1)又は(g2)の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(h)以下の(h1)～(h3)からなる群から選択されるいずれか1に記載の軽鎖可変領域：

(h1)配列番号141に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(h2)(h1)の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(h3)(h1)又は(h2)の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[37]

配列番号139に示されるアミノ酸配列の20～138番目のアミノ酸残

基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ～ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、[3 6] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[3 8]

配列番号 1 3 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ～ 4 6 4 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ～ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、[3 6] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[3 9]

A D C C 活性が低下又は欠失した、[2 3] ～ [3 8] のいずれか 1 項に記載のヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[4 0]

C D C 活性が低下又は欠失した、[2 3] ～ [3 9] のいずれか 1 項に記載のヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[0019] [4 1]

A D C P 活性が低下又は欠失した、[2 3] ～ [4 0] のいずれか 1 項に記載のヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[4 2]

[1] ～ [4 1] のいずれか 1 項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

[4 3]

抗腫瘍剤である、[4 2] に記載の医薬組成物。

[4 4]

腫瘍が、C D 1 4 7 を発現する腫瘍である、[4 3] に記載の医薬組成物。

[4 5]

腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌、リンパ腫、甲状腺癌、皮膚癌、頭頸部癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、脳

腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、[43]又は[44]に記載の医薬組成物。

[0020] [46]

腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、[43]～[45]のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[47]

腫瘍がSMAD4陽性の腫瘍又はKLF5の発現が低下又は欠失した腫瘍である、[43]～[46]のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[48]

さらに別の抗腫瘍剤を含有する、[42]～[47]のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[49]

[1]～[41]のいずれか1項に記載の抗体若しくは該抗体の抗原結合性断片又は[42]～[48]のいずれか1項に記載の医薬組成物を患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[50]

腫瘍が、CD147を発現する腫瘍である、[49]に記載の治療方法。

[0021] [51]

腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌、リンパ腫、甲状腺癌、皮膚癌、頭頸部癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、脳腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リン

パ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、[49]又は[50]のいずれか1項に記載の治療方法。

[52]

腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、[49]～[51]に記載の治療方法。

[53]

腫瘍がSMAD4陽性の腫瘍又はKLF5の発現が低下又は欠失した腫瘍である、[49]～[52]のいずれか1項に記載の治療方法。

[54]

別の抗腫瘍剤と組み合わせて投与される、[49]～[53]のいずれか1項に記載の治療方法。

[55]

[1]～[41]のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチド。

[0022] [56]

以下の（j1）～（j3）からなる群から選択されるいずれか1に記載のポリヌクレオチドを含む[55]に記載のポリヌクレオチド：

（j1）配列番号75に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号76に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号77に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号72に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号73に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号74に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3をコードするポリヌクレオチド、

（j2）（j1）に記載のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一

性を有するポリヌクレオチド；及び

(j 3) (j 1) 又は (j 2) に記載のポリヌクレオチドにおいて 1 ～数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[57]

以下の (i 1) ～ (i 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドを含む [55] に記載のポリヌクレオチド：

(i 1) 配列番号 55 に記載のアミノ酸配列からなる CDRH1、配列番号 56 に記載のアミノ酸配列からなる CDRH2 及び配列番号 57 に記載のアミノ酸配列からなる CDRH3 をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号 52 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L1、配列番号 53 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L2 及び配列番号 54 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L3 をコードするポリヌクレオチド；

(i 2) (i 1) に記載のヌクレオチド配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；及び

(i 3) (i 1) 又は (i 2) に記載のポリヌクレオチドにおいて 1 ～数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[58]

以下の (k 1) ～ (k 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドを含む [55] に記載のポリヌクレオチド：

(k 1) 配列番号 65 に記載のアミノ酸配列からなる CDRH1、配列番号 66 に記載のアミノ酸配列からなる CDRH2 及び配列番号 67 に記載のアミノ酸配列からなる CDRH3 をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号 62 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L1、配列番号 63 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L2 及び配列番号 64 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L3 をコードするポリヌクレオチド、

(k 2) (k 1) に記載のヌクレオチド配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；及び

(k 3) (k 1) 又は (k 2) に記載のポリヌクレオチドにおいて 1 ～数個

のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[59]

以下の(m1)～(m3)からなる群から選択されるいずれか1に記載のポリヌクレオチドを含む[55]に記載のポリヌクレオチド：

(m1) 配列番号85に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号86に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号87に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号82に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号83に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号84に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3をコードするポリヌクレオチド、

(m2) (m1)に記載のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；及び

(m3) (m1)又は(m2)に記載のポリヌクレオチドにおいて1～数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[60]

[55]～[59]のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

[0023] [61]

[60]に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

[62]

[61]に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含む、[1]～[41]のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の製造方法。

[63]

CD147を介したシグナル伝達の活性化が、p38の活性化及び／又はSMAD4の活性化である、[1]～[41]のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[64]

p 3 8 M A P K の活性化及び／又は S M A D 4 の活性化が、p 3 8 M A P K の発現量の増加、p 3 8 M A P K のリン酸化、H S P 2 7 のリン酸化、C X C L 8 発現量の増加、r h o B 発現量の増加、K L F 5 m R N A の低下又は K L F 5 蛋白質発現量の低下である、[6 3] に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[6 5]

[6 3] 又は [6 4] に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片を投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[0024] [6 6]

癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中に含まれる S M A D 4 の発現又は K L F 5 の発現を検出し、S M A D 4 が検出された患者又は K L F 5 の発現低下若しくは欠失が検出された患者を、[1] ～ [4 1] のいずれか 1 項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は [4 2] ～ [4 8] のいずれか 1 項に記載の医薬組成物による癌の治療への応答性があると判定することを含む、癌の治療への応答性を予測する方法。

[6 7]

癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中における S M A D 4 の発現の有無又は K L F 5 の発現を検出し、S M A D 4 が検出された患者又は K L F 5 の発現低下若しくは欠失が検出された患者を、[1] ～ [4 1] のいずれか 1 項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は [4 2] ～ [4 8] のいずれか 1 項に記載の医薬組成物による癌の治療の対象者として選別することを含む、癌の治療の対象を選別する方法。

[6 8]

癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中に含まれる S M A D 4 の発現の有無又は K L F 5 の発現を検出し、S M A D 4 が検出された患者又は K L F 5 の発現低下若しくは欠失が検出された患者に対し、[1] ～ [4 1] のいずれか 1 項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は [4 2] ～ [4 8] のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を投与することを含む、

癌の治療方法。

[69]

[1] ~ [41] のいずれか1項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は [42] ~ [48] のいずれか1項に記載の医薬組成物による癌の治療への応答性を判定するためのキットであって、癌患者由来の生物学的試料中のSMA D 4の発現又はK L F 5の発現を検出する手段を少なくとも含む、キット。

[70]

[1] ~ [41] のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片と他の薬物がコンジュゲートした、抗体薬物複合体。

[0025] [71]

[1] ~ [41] のいずれか1項に記載の抗体の抗原結合断片と、C D 1 4 7以外の抗原に結合する抗原結合断片を含む、バイスペシフィック抗体。

発明の効果

[0026] 本発明の抗体は、C D 1 4 7を特異的に認識する抗体であって、C D 1 4 7を介した関連シグナル分子を活性化し、高い抗腫瘍活性を有することを特徴とする。C D 1 4 7は腫瘍細胞だけでなく血液細胞にも発現しているが、本発明の抗体は、T細胞及びP B M Cに対して作用せずかつエフェクター機能にも依存しないため、抗腫瘍剤としての開発において、安全性の懸念が少ないという利点を有する。また、本発明の抗体は、極めて高い抗腫瘍活性を示す。本発明の抗体は、肝臓癌細胞において、肝臓癌の標準治療薬のうちの1つとして使用されるソラフェニブよりも顕著に強い薬効を示す。本発明の抗体は、膵臓癌細胞において、膵臓癌の標準治療薬のうちの1つとして使用されるゲムシタビンよりも顕著に強い薬効を示す。また、本発明の抗体は、慢性骨髄性白血病細胞において、慢性骨髄性白血病の標準治療薬のうちの1つとして使用されるイマチニブよりも顕著に強い薬効を示す。

図面の簡単な説明

[0027] [図1] (a) ~ (c) : P A N C - 1 異種移植 (x e n o g r a f t) モデル

における腫瘍体積の変化。

[図2-1]ヒトCD147又はサルCD147に対する結合性。

[図2-2]ヒトCD147又はサルCD147に対する結合性。

[図2-3]ヒトCD147又はサルCD147に対する結合性。

[図3]ヒトCD147とカニクイザルCD147のアミノ酸配列の配列比較およびmu1～mu9の位置。

[図4-1]LN22R8の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、LN22R8軽鎖のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列。

[図4-2]LN22R8の重鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、LN22R8重鎖のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列。

[図5-1]2P10F2の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、2P10F2軽鎖のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列。

[図5-2]2P10F2の重鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、2P10F2重鎖のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列。

[図6]ヒトキメラ抗体のADCC活性。

[図7]ヒトキメラ抗体のCDC活性。

[図8]ヒトキメラ抗体のADCP活性。

[図9-1](a)～(d)：NOD-scidマウスを用いたM1A PaCa-2皮下移植モデルにおける各抗体の抗腫瘍効果。

[図9-2](e)～(g)：NOD-scidマウスを用いたM1A PaCa-2皮下移植モデルにおける各抗体の抗腫瘍効果。

[図10]NOGマウスを用いたM1A PaCa-2皮下移植モデルにおけるLN22R8chlgG4Pの抗腫瘍効果。

[0028] [図11](a)～(d)：NOD-scidマウスを用いたM1A PaCa

ー2皮下移植モデルにおけるr#84、r#101、r#110又はr#131の抗腫瘍効果。

[図12]2P10F2とr#84、r#101、r#110又はr#131との競合アッセイ。

[図13-1](a)～(d):M1A P a C aー2皮下移植モデルにおける各キメラ抗体の抗腫瘍効果。

[図13-2](e)～(h):M1A P a C aー2皮下移植モデルにおける各キメラ抗体の抗腫瘍効果。

[図13-3](i)～(l):M1A P a C aー2皮下移植モデルにおける各キメラ抗体の抗腫瘍効果。

[図13-4](m)及び(n):M1A P a C aー2皮下移植モデルにおける各キメラ抗体の抗腫瘍効果。

[図14](a)ヒト化抗体重鎖#84H1h及び(b)ヒト化抗体軽鎖#84L2hの各可変領域の設計。

[図15](a)ヒト化抗体重鎖#101H1h及び(b)ヒト化抗体軽鎖#101L2hの各可変領域の設計。

[図16](a)ヒト化抗体重鎖#110H1h、(b)ヒト化抗体重鎖#110H13h、(c)ヒト化抗体軽鎖#110L4h、(d)ヒト化抗体軽鎖#110L2h及び(e)ヒト化抗体軽鎖#110L12hの各可変領域の設計。

[図17](a)ヒト化抗体重鎖#131H2h及び(b)ヒト化抗体軽鎖#131L2hの各可変領域の設計。

[図18](a)～(d):M1A P a C aー2皮下移植モデルにおける各ヒト化抗体の抗腫瘍効果

[図19]抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体によるp38MAPKリン酸化。

[図20](a)及び(b):抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体によるHSP27のリン酸化。

[0029] [図21](a)～(c):抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体による腫瘍内p3

8MAPKリン酸化。

[図22] (a) ~ (c) : 抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体によるcxcI8及びrhoBの発現。

[図23] (a) ~ (c) : 抗ヒトCD147ラット抗体とそのヒトキメラ抗体化によるcxcI8及びrhoBの発現。

[図24] SMAD4陰性膵臓癌細胞BxPC-3を用いて抗CD147抗体及びゲムシタビンの抗腫瘍効果を評価した結果。

[図25] (a) ~ (c) : SMAD4を安定発現したBxPC-3を用いて抗CD147ヒトキメラ抗体の抗腫瘍効果を評価した結果。

[図26] (a) 及び (b) : SMAD4を発現させた膵臓癌細胞BxPC-3に抗CD147ヒトキメラ抗体を投与した場合のp38MAPKのリン酸化を評価した。

[図27] ゲムシタビン耐性膵臓癌腫瘍モデルにおける抗CD147ヒトキメラ抗体の抗腫瘍効果。

[図28] (a) HepG2細胞におけるCD147のフローサイトメーターによる発現確認。(b) 肝臓癌細胞におけるヒト化CD147抗体によるp38MAPK活性化。

[図29] (a) ~ (d) : 肝臓癌におけるCD147抗体のソラフェニブとの抗腫瘍効果の比較。

[図30] CD3, CD4陽性の細胞及びCD3, CD8陽性の細胞におけるCD147-APCの結合。

[0030] [図31] ヒト末梢血単核球の増殖を誘導した際の、抗ヒトCD147抗体の影響の評価。

[図32] ヒト末梢血リンパ球のサイトカイン産生に対する、抗ヒトCD147抗体の影響の評価。

[図33-1] rat-CD147-#84の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、rat-CD147-#84の軽鎖のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列。

[図33-2] *rat*_CD147_#84の重鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、*rat*_CD147_#84の重鎖のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列。

[図34-1] *rat*_CD147_#101の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、*rat*_CD147_#101の軽鎖のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列。

[図34-2] *rat*_CD147_#101の重鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、*rat*_CD147_#101の重鎖のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列。

[図35-1] *rat*_CD147_#110の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、*rat*_CD147_#110の軽鎖のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列。

[図35-2] *rat*_CD147_#110の重鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、*rat*_CD147_#110の重鎖のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列。

[図36-1] *rat*_CD147_#131の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、*rat*_CD147_#131の軽鎖のCDRL1、CDRL2及びCDRL3のアミノ酸配列。

[図36-2] *rat*_CD147_#131の重鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列、並びに、*rat*_CD147_#131の重鎖のCDRH1、CDRH2及びCDRH3のアミノ酸配列。

[図37-1] #84H1hlgG2のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図37-2] #84H1hlgG4Pのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図37-3] #84L2hのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図38-1] #101H1hlgG2のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図38-2] #101H1hlgG4Pのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図38-3] #101L2hのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図39-1] #110H1hlgG4Pのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図39-2] # 1 1 O H 1 3 h I g G 4 P のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図39-3] # 1 1 O L 4 h のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図39-4] # 1 1 O L 2 h のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図39-5] # 1 1 O L 1 2 h のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[図40-1] # 1 3 1 H 2 h I g G 2 のアミノ酸配列とヌクレオチド配列。

[図40-2] # 1 3 1 L 2 h のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。

[0031] [図41]非対称単位に含まれる2つの複合体を表したリボン図。CD 1 4 7 は黒色で、抗体の重鎖 (H C H A I N) および軽鎖 (L C H A I N) は灰色で示されている。

[図42]CD 1 4 7 と抗体の相互作用面。抗体近傍のCD 1 4 7 のアミノ酸はスティックモデルで表され、文字で標識されている。CD 1 4 7 のこれ以外の部位は黒色のリボンモデルで表されている。一方、CD 1 4 7 近傍の抗体のアミノ酸は細いラインモデルで表されており、それ以外の部位は灰色のリボンモデルで表されている。

[図43]胃癌モデルにおけるキメラおよびヒト化CD 1 4 7 抗体の抗腫瘍効果。

[図44]慢性骨髄性白血病 (CML) モデルにおけるヒト化CD 1 4 7 抗体の抗腫瘍効果。

[図45]大腸癌モデルにおけるヒト化CD 1 4 7 抗体の抗腫瘍効果。

[図46]腎臓癌モデルにおけるヒト化CD 1 4 7 抗体の抗腫瘍効果。

[図47]急性骨髄性白血病 (AML) モデルにおけるヒト化CD 1 4 7 抗体の抗腫瘍効果。

[図48]膵臓癌モデルにおけるヒト化CD 1 4 7 抗体の抗腫瘍効果。

[図49]競合ELISAの結果。

[図50] (a) M I A P a C a - 2 細胞及び (b) K L F 5 を発現させた M I A P a C a - 2 細胞を用いた、ヒト化CD 1 4 7 抗体の抗腫瘍効果の比較。

発明を実施するための形態

- [0032] 以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。
- [0033] (定義) 本明細書中、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いられ、それぞれ、特に限定されない限り、固形癌、非固形癌又はそれらの両方を意図する場合に用いられる。
- [0034] 本明細書中、「遺伝子」という語には、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのcRNAも含まれる。
- [0035] 本明細書中、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」は、核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。
- [0036] 本明細書中、「ポリペプチド」と「タンパク質」は区別せずに用いている。
- [0037] 本明細書中、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。
- [0038] 本明細書中、「CD147」は、CD147タンパク質と同じ意味で用いている。
- [0039] 本明細書中、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、diabody、線状抗体及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、F(ab')₂を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるFab'も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。
- [0040] 本明細書中、「エフェクター活性」とは、抗体依存性細胞傷害(Anti

body-Dependent-Cellular-Cytotoxicity、以下、ADCC) 活性、補体依存性細胞傷害 (Complement-dependent cytotoxicity、以下、CDC) 活性、または抗体依存性細胞貪食 (Antibody-dependent cellular phagocytosis、以下、ADCP) 活性のうちのいずれか1つ以上をいう。

[0041] 本明細書中、「エフェクター機能」とは、各「エフェクター活性」が発揮されることをいう。

[0042] 抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性は、エフェクター活性を持つ免疫細胞、抗体および⁵¹Cr 標識した標的細胞を接触させた場合に生じる細胞死を測定する⁵¹Cr リリースアッセイの方法で測定することができる。本発明のヒト CD147 抗体の ADCC 活性は、次のように測定される。評価するヒト CD147 抗体の ADCC 活性について、エフェクター細胞としてヒトの末梢血単核球 (PBMC)、ADCC 標的細胞として CD147 陽性のヒト癌細胞株 (例えば、膵臓癌株 MIA PaCa-2) を用いる。放射線同位体⁵¹Cr で標識した癌細胞と評価対象の抗体を 0.5 又は、5 μ g/ml の濃度で 4℃、30 分間処理した後、ヒトの末梢血から分離した PBMC を癌細胞の 20 倍の割合で加え、4 時間、37 度、5% CO₂ 存在下で培養する。上清中に放出された⁵¹Cr を TopCount NXT v2.53 を用いて測定し Total release 値を得る。⁵¹Cr で標識した癌細胞を Triton-100 で処理して放出された⁵¹Cr の測定値を Maximum release 値、PBMC を加えない抗体処理細胞から処理して放出された⁵¹Cr の測定値を Spontaneous release 値として、下記の式から、% specific release を算出する。陰性対照サンプルとして、ヒト IgG (hIgG, ChromPure Human IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories 社, Cat. 009-000-003) を用いる。測定は 3 重に実施し、平均値、標準偏差を算出する。

[0043] $\% \text{ specific release} = (\text{Total release} - \text{Spontaneous release}) / \text{Maximum release}$

補体依存性細胞傷害（CDC）活性は、血液に含まれる補体、抗体および標的細胞を接触させた場合に生じる細胞死を測定することで評価ができる。本発明のヒトCD147抗体のCDC活性は、次のように測定される。評価するヒトCD147抗体による補体依存的な殺細胞活性（CDC活性）を標的細胞としてヒト膵臓株MIA PaCa-2を用いて評価する。補体として市販のウサギ補体（Low Tox-M Rabbit Complement、CEDARLANE LABORATORIES LIMITED、Cat. CL3051）を用いる。CDC活性陰性の対照抗体としてヒトIgG（hIgG, ChromPure Human IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories社、Cat. 009-000-003）を用いる。評価する抗体及び陰性の対象抗体を、それぞれ、0、0.1、1又は、 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で1時間、 4°C で処理した後、ウサギ補体を終濃度7.5%となるように添加し、 37°C 、5%CO₂存在下で、3時間加温後、生細胞に含まれる細胞内ATPをCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（Promega社、Cat. G7572）を用いて測定した。CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて得られる発光シグナルについて、EnVision 2104 Multilabel Reader（Perkin Elmer社）を用いて定量する。測定は3重に実施し、平均値と標準偏差を算出する。無処理の細胞から得られた発光シグナルを100%として、抗体と補体依存的に減少した発光シグナルをCDC活性とする。

[0044] 抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性は、貪食作用を持つ免疫細胞、抗体および標的細胞を接触させることによって起こる貪食を2重蛍光標識法で測定

することができる。

[0045] 本発明のヒトCD147抗体のADCP活性は、次のように測定される。

ヒトIgG抗体はマウスのFc γ 受容体との相互作用を介して、抗体依存的な単球、マクロファージによる貪食作用(ADCP)を誘導することで、癌細胞への殺細胞活性を示すことが報告されている(Overdijk et al., Journal of Immunology, 1-9, 2012)。本発明のヒトキメラ抗体のADCP活性について、エフェクター細胞としてRAW264.7(ATCC, TIB-71)、ADCP標的細胞としてヒト膵臓株PANC-1又はMIA PaCa-2を用いて評価する。PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling(SIGMA, Cat. MINI67-1KIT)で標識したADCP標的細胞と評価する抗体と、20 μ g/mlの濃度の評価する抗体で4 $^{\circ}$ C、1時間処理した後、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling(SIGMA, Cat. PKH26GL-1KIT)で標識したRAW264.7細胞をADCP標的細胞の5倍添加し、3時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下で加温する。フローサイトメーター(BD社、CantoII)を用いて、貪食作用によりPKH67シグナル陽性に移行したPKH26陽性細胞の割合を測定する。陰性対照サンプルとして、ヒトIgG(hIgG, ChromPure Human IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories社, Cat. 009-000-003)を処理したサンプルについて同様に測定を実施する。測定は3重に実施し、平均値、標準偏差を算出する。

[0046] 本明細書中、「エフェクター活性を実質的に有さない」又は「エフェクター活性が低下又は欠失した」とは、当該抗体が、ADCC活性、CDC活性又はADCP活性のうちの少なくとも1つが、活性を示さないか、あるいは

、それらの機能が十分には発揮されないほど低い程度の活性であることをいう。「エフェクター活性を実質的に有さない」又は「エフェクター活性が低下又は欠失した」とは、例えば、上記の活性評価方法において、評価する抗体の活性がネガティブコントロールと同程度の活性であることをいう。

[0047] 本明細書中、「ADCC活性が低下又は欠失した」とは、評価する抗体が、ADCC活性を示さないか、あるいは、それらの機能が十分には発揮されないほど低い程度の活性であることをいう。「ADCC活性が低下又は欠失した」とは、例えば、上記の活性評価方法において、評価する抗体の活性がネガティブコントロールと同程度の活性であることをいう。

[0048] 本明細書中、「CDC活性が低下又は欠失した」とは、評価する抗体が、CDC活性を示さないか、あるいは、それらの機能が十分には発揮されないほど低い程度の活性であることをいう。「CDC活性が低下又は欠失した」とは、例えば、上記の活性評価方法において、評価する抗体の活性がネガティブコントロールと同程度の活性であることをいう。

[0049] 本明細書中、「ADCP活性が低下又は欠失した」とは、評価する抗体が、ADCP活性を示さないか、あるいは、それらの機能が十分には発揮されないほど低い程度の活性であることをいう。「ADCP活性が低下又は欠失した」とは、例えば、上記の活性評価方法において、評価する抗体の活性がネガティブコントロールと同程度の活性であることをいう。

[0050] 「ADCC活性が低下又は欠失した」、「CDC活性が低下又は欠失した」又は「ADCP活性が低下又は欠失した」とは、例えば、それぞれ、上記の活性評価方法において、評価する抗体の活性がネガティブコントロールと同程度の活性であることをいう。

[0051] 本明細書中、「CD147を介したシグナル伝達を活性化する」、「CD147を介した関連シグナル分子の活性化」、「CD147の活性化」又は「CD147を活性化」とは、CD147を介した細胞シグナル伝達系の活性化をいい、CD147の下流の関連シグナル分子のうちの少なくともいずれかを活性化させることをいう。CD147を介したシグナル伝達の活性化

とは、CD147シグナルの下流にある遺伝子の発現が亢進又は低下したり、タンパク質の発現が亢進又は低下したり、あるいは、タンパク質のリン酸化が亢進又は低下したりすることをいう。CD147の下流の関連シグナル分子としては、例えば、FAK、MEK、Erk、JAK/STAT、AKT又はMAPキナーゼ(MAPK)、あるいはこれらのさらに下流のシグナル分子の活性化が挙げられる。MAPKとしては、例えば、ERK1/2、JNK又はp38MAPKが挙げられ、より好ましくは、p38MAPKである。MAPKのさらに下流のシグナル分子としては、例えば、HSP27、cxcl8又はSMAD(例えば、SMAD2、SMAD3及び/又はSMAD4)が挙げられる。「CD147の活性化」としては、例えば、p38MAPKのmRNA発現量の増加、p38MAPKの蛋白質発現量の増加、p38MAPKのリン酸化、HSP27のリン酸化(例えば、HSP27のSer82のリン酸化又はHSP27のSer15のリン酸化)、cxcl8 mRNA発現量の増加、cxcl8蛋白質発現量の増加、SMADシグナル活性化を介したrhob mRNA発現量の増加又はrhob蛋白質発現量の増加、あるいは、KLF5 mRNAの低下又はKLF5蛋白質発現量の低下が挙げられる。

[0052] 本明細書中、「エпитープ」とは、特定の抗CD147抗体の結合するCD147の部分ペプチド又は部分立体構造を意味する。前記のCD147の部分ペプチドであるエпитープは免疫アッセイ法等当業者にはよく知られている方法によって、決定することができる。まず、抗原の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴヌクレオチド合成技術を用いることができる。例えば、CD147のC末端又はN末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、更に短いペプチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エпитープを決定することができる。また、複数の細胞外ドメインからなる膜タンパク質に結合する抗体が、複数の

ドメインからなる立体構造をエピトープとしている場合は、特定の細胞外ドメインのアミノ酸配列を改変することによって、立体構造を改変することによってどのドメインと結合するかを決定することができる。特定の抗体の結合する抗原の部分立体構造であるエピトープは、X線構造解析によって前記の抗体と隣接する抗原のアミノ酸残基を特定することによっても決定することができる。

[0053] 第一の抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に第二の抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体が共通のエピトープを有すると判定することができる。また、第一の抗体の抗原に対する結合に第二の抗体が交差競合する（すなわち、第二の抗体が第一の抗体と抗原の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、第一の抗体と第二の抗体の同一のエピトープに結合すると判定することができる。第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗腫瘍活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様の活性を有することが期待できる。

[0054] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所の相補性決定領域（C D R : C o m p l e m e n t a r i t y d e t e r m i n i n g r e g i o n）があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域（h y p e r v a r i a b l e d o m a i n）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からC D R H 1、C D R H 2、C D R H 3と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からC D R L 1、C D R L 2、C D R L 3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0055] 本明細書において、「1乃至数個」及び「1若しくは数個」なる記載がある場合の「数個」とは、2乃至10個を示している。好ましくは、10個以

下、より好ましくは、5若しくは6個以下、さらにより好ましくは、2若しくは3個である。

[0056] (CD147)

CD147は、イムノグロブリン様ドメインを2～3有する1回膜貫通蛋白質であり、CD147同士の相互作用、CD44、Integrinファミリー分子、CD98、VEGFR、CypA/B、MCT1/3/4といった増殖、浸潤、炎症に関与する細胞外や細胞膜表面の分子と相互作用することで、下流シグナル関連分子、FAK、MEK、Erk、JAK/STAT、AKT、MAPKファミリー分子を活性化させ、MMPをはじめとするプロテアーゼ産生、癌の増殖、転移、浸潤を促すことが知られている。

[0057] ヒトCD147は、3つのバリエーションが知られている。バリエーション1は、網膜特異的に発現し3つのイムノグロブリン様ドメイン（それぞれ、本明細書中、D0、D1及びD2という場合がある。）を有する1回膜貫通蛋白質であり、バリエーション2は、T細胞や様々な正常細胞で発現し、且つ、多様な癌組織で発現増加が報告されている2つのイムノグロブリン様ドメイン（D1、D2）を有する1回膜貫通蛋白質であり、バリエーション3は、1つのイムノグロブリン様ドメインを有する1回膜貫通蛋白質である。

[0058] ヒトCD147のバリエーション1のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NP_001719.2、NM_001728.3を参照することにより入手可能であり、本明細書中、アミノ酸配列は配列番号1、ヌクレオチド配列は配列番号2としても開示されている。バリエーション1の3つのイムノグロブリン様ドメインは、配列番号1でいうと、それぞれ、アミノ酸番号22～138（D0）、アミノ酸番号140～218（D1）及びアミノ酸番号223～323（D2）である（Redzic, J., J. Mol. Biol., 2011, 68-82）（Grass et al., Biosol. Rep, 2016, 1-16）。また、バリエーション1の膜貫通領域は、配列番号1でいうと、アミノ酸番号324～344である。

- [0059] ヒトCD147のバリエーション2のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NP_940991.1、NM_198589.2を参照することにより入手可能であり、本明細書中、アミノ酸配列は配列番号3、ヌクレオチド配列は配列番号4としても開示されている。バリエーション2の2つのイムノグロブリン様ドメイン(D1、D2)は、配列番号3でいうと、それぞれ、アミノ酸番号24～102(D1)及びアミノ酸番号107～207(D2)である。また、バリエーション2の膜貫通領域は、配列番号3でいうと、アミノ酸番号208～228である(Grasset al., Biosol. Rep, 2016, 1-16)。
- [0060] ヒトCD147のバリエーション3のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NP_940992.1、NM_198590.2を参照することにより入手可能である。また、ヒトCD147遺伝子は、市販元より入手することも可能である。
- [0061] カニクイサルCD147(本明細書中、サルCD147と記載する場合もある。)のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号XP_005587354.1、XM_005587297.1を参照することにより入手可能である。また、サルCD147遺伝子は、市販元より入手することも可能である。マウスCD147のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NP_001070652.1、NM_001077184.1を参照することにより入手可能である。また、マウスCD147遺伝子は、市販元より入手することも可能である。
- [0062] 本発明で用いるCD147は、*in vitro*にて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、CD147 cDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってCD147を発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。

[0063] CD147のcDNAは、例えば、CD147のcDNAを発現しているcDNAライブラリーを鋳型として、CD147のcDNAを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という）（Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49）を行なう、いわゆるPCR法により取得することができる。

[0064] なお、ヒト、サル又はマウスのCD147をコードするヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、CD147と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもCD147のcDNAに含まれる。さらに、ヒト、サル若しくはマウスCD147遺伝子座から転写されるスプライシングバリエーション又はこれにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ、CD147と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもCD147のcDNAに含まれる。

[0065] また、ヒト、サル又はマウスのCD147のアミノ酸配列、又はこれらの配列からシグナル配列が除かれたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、CD147と同等の生物活性を有する蛋白質もCD147に含まれる。さらに、ヒト、サル若しくはマウスCD147遺伝子座から転写されるスプライシングバリエーションにコードされるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、CD147と同等の生物活性を有する蛋白質もCD147に含まれる。

[0066] （抗CD147抗体の製造）

本発明のCD147に対する抗体は、非ヒト動物を目的抗原で免疫し、免疫成立後の動物からリンパ液、リンパ組織、血球試料又は骨髓由来の細胞を採取し、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 36

5-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) に従って、CD147 に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることができる。このような方法の具体的な例は、WO2009/48072 (2009年4月16日公開) 及びWO2010/117011 (2010年10月14日公開) に記載されている。このようにして得られたモノクローナル抗体の例としては、例えば、LN22R8、2P10F2、rat__CD147__#84、rat__CD147__#101、rat__CD147__#110又はrat__CD147__#131を挙げることができる。しかし、モノクローナル抗体を取得する方法は、既に確立された分野に該当し、前記の具体例に限定されるものではない。

[0067] 本発明の抗体には、上記CD147 に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト化 (Humanized) 抗体、ヒト抗体なども含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0068] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984) 参照)。LN22R8 由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号33の20乃至471番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、配列番号35の20乃至467番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖若しくは配列番号37の20乃至468番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号31の21乃至234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体が挙げられる。2P10F2 由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号43の20乃至466番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、配列表の配列番

号45の20乃至462番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖若しくは配列番号47の20乃至463番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号41の21乃至234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体が挙げられる。

[0069] r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号92の20乃至470番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、配列表の配列番号94の20乃至466番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、配列番号96の20乃至467番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、配列番号98の20乃至470番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖若しくは配列番号100の20乃至467番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び、配列番号90の21乃至234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体が挙げられる。

[0070] r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号104の20乃至463番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、配列表の配列番号106の20乃至464番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖若しくは配列番号108の20乃至464番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び、配列番号102の21乃至234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体が挙げられる。

[0071] r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号112の20乃至462番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、配列表の配列番号114の20乃至463番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖若しくは配列番号116の20乃至463番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び、配列番号110の21乃至234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体が挙げられる。

[0072] r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 由来のキメラ抗体の一例として、配列表の

配列番号120の20乃至464番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖若しくは配列番号122の20乃至465番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び、配列番号118の21乃至234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体が挙げられる。

[0073] ヒト化抗体としては、CDRのみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Nature（1986）321，p. 522－525参照）、CDR移植法によって、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第WO90/07861号パンフレット）を挙げることができる。

[0074] rat__CD147__#84抗体由来のヒト化抗体としては、rat__CD147__#84の6種全てのCDR配列を保持し、CD147に対する結合活性を有し、かつ、CD147を活性化する抗体である限り、本発明の抗体に含まれる。なお、rat__CD147__#84抗体の重鎖可変領域は、配列番号55に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号56に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号57に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3を保有している。また、rat__CD147__#84抗体の軽鎖可変領域は、配列番号52に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号53に示されるアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号54に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3を保有している。rat__CD147__#84抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列、CDRのアミノ酸配列は、図33-1及び図33-2にも記載されている。

[0075] rat__CD147__#101抗体由来のヒト化抗体としては、rat__CD147__#101の6種全てのCDR配列を保持し、CD147に対する結合活性を有し、かつ、CD147を活性化する抗体である限り、本発明の抗体に含まれる。なお、rat__CD147__#101抗体の重鎖可変領域は、配列番号65に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号

66に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号67に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3を保有している。また、rat__CD147__#101抗体の軽鎖可変領域は、配列番号62に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号63に示されるアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号64に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3を保有している。rat__CD147__#101抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列、CDRのアミノ酸配列は、図34-1及び図34-2にも記載されている。

[0076] rat__CD147__#110抗体由来のヒト化抗体としては、rat__CD147__#110の6種全てのCDR配列を保持し、CD147に対する結合活性を有し、かつ、CD147を活性化する抗体である限り、本発明の抗体に含まれる。なお、rat__CD147__#110抗体の重鎖可変領域は、配列番号75に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号76に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号77に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3を保有している。また、rat__CD147__#110抗体の軽鎖可変領域は、配列番号72に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号73に示されるアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号74に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3を保有している。rat__CD147__#110抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列、CDRのアミノ酸配列は、図35-1及び図35-2にも記載されている。

[0077] rat__CD147__#131抗体由来のヒト化抗体としては、rat__CD147__#131の6種全てのCDR配列を保持し、CD147に対する結合活性を有し、かつ、CD147を活性化する抗体である限り、本発明の抗体に含まれる。なお、rat__CD147__#131抗体の重鎖可変領域は、配列番号85に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号86に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号87に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3を保有している。また、rat__CD

147__#131 抗体の軽鎖可変領域は、配列番号82に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号83に示されるアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号84に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3を保有している。rat__CD147__#131 抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列、CDRのアミノ酸配列は、図36-1及び図36-2にも記載される。

[0078] また、さらに各CDR中の1乃至3個のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したCDR改変ヒト化抗体も、CD147に対する結合活性を有し、かつ、CD147を活性化する抗体である限り、本発明の抗体に含まれる。

rat__CD147__#84 抗体由来のヒト化抗体としては、以下の(a)及び(b)を有する、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片が挙げられる：

(a) 以下の(a1)乃至(a4)からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

(a1) 配列番号123に示されるアミノ酸配列の20乃至140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(a2) 配列番号125に示されるアミノ酸配列の20乃至140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(a3) (a1)又は(a2)の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(a4) (a1)乃至(a3)のいずれか1に記載の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(b) 以下の(b1)乃至(b3)からなる群から選択されるいずれか1に記載の軽鎖可変領域：

(b1) 配列番号127に示されるアミノ酸配列の21乃至128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(b 2) (b 1) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; 及び

(b 3) (b 1) 又は (b 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[0079] r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 抗体由来のヒト化抗体の好ましい例としては、配列番号 1 2 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 2 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体、又は、配列番号 1 2 3 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 2 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体が挙げられる。

[0080] r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 抗体由来のヒト化抗体のより好ましい例としては、配列番号 1 2 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 4 6 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖及び配列番号 1 2 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体、又は、配列番号 1 2 3 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 4 6 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖及び配列番号 1 2 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体が挙げられる。

[0081] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 0 1 抗体由来のヒト化抗体としては、以下の (e) 及び (f) を有する、ヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片が挙げられる :

(e) 以下の (e 1) 乃至 (e 4) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の重鎖可変領域 :

(e 1) 配列番号 1 2 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域 ;

(e 2) 配列番号 1 3 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(e 3) (e 1) 又は (e 2) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(e 4) (e 1) 乃至 (e 3) のいずれか 1 に記載の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(f) 以下の (f 1) 乃至 (f 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の軽鎖可変領域；

(f 1) 配列番号 1 3 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(f 2) (f 1) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(f 3) (f 1) 又は (f 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[0082] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 0 1 抗体由来のヒト化抗体の好ましい例としては、配列番号 1 2 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 3 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体、又は、配列番号 1 3 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 3 7 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 3 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体が挙げられる。

[0083] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 0 1 抗体由来のヒト化抗体のより好ましい例としては、配列番号 1 2 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 4 6 3 番目のア

ミノ酸残基からなる重鎖及び配列番号 1 3 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体、又は、配列番号 1 3 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 4 6 4 番目のアミノ酸残基からなる重鎖及び配列番号 1 3 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体が挙げられる。

[0084] rat__CD147__#110 抗体由来のヒト化抗体としては、以下の (c) 及び (d) を有する、ヒト CD147 抗体又は該抗体の抗原結合断片が挙げられる：

(c) 以下の (c 1) ~ (c 4) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の重鎖可変領域：

(c 1) 配列番号 1 3 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(c 2) 配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(c 3) (c 1) 又は (c 2) の配列において各 CDR 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(c 4) (c 1) ~ (c 3) のいずれか 1 に記載の配列における各 CDR 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(d) 以下の (d 1) ~ (d 5) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の軽鎖可変領域：

(d 1) 配列番号 1 3 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(d 2) 配列番号 1 4 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(d 3) 配列番号 1 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(d 4) (d 1) ~ (d 3) のいずれか 1 に記載の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 95% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(d 5) (d 1) ~ (d 4) のいずれか 1 に記載の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[0085] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 1 0 抗体由来のヒト化抗体の好ましい例としては、配列番号 1 3 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 3 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体；配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 4 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体；又は、配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体が挙げられる。

[0086] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 1 0 抗体由来のヒト化抗体のより好ましい例としては、配列番号 1 3 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖及び配列番号 1 3 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体；配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 4 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体；又は、配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体が挙げられる。

[0087] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 3 1 抗体由来のヒト化抗体としては、以下の (g) 及び (h) を有する、ヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片が

挙げられる：

(g) 以下の (g 1) ~ (g 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の重鎖可変領域：

(g 1) 配列番号 1 3 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 8 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(g 2) (g 1) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(g 3) (g 1) 又は (g 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(h) 以下の (h 1) ~ (h 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の軽鎖可変領域：

(h 1) 配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(h 2) (h 1) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(h 3) (h 1) 又は (h 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[0088] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 3 1 抗体由来のヒト化抗体の好ましい例としては、配列番号 1 3 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 3 8 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む抗体が挙げられる。

[0089] r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 3 1 抗体由来のヒト化抗体のより好ましい例としては、配列番号 1 3 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 4 6 4 番目のア

ミノ酸残基からなる重鎖及び配列番号141に示されるアミノ酸配列の21乃至234番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む抗体が挙げられる。

[0090] 上記のrat_CD147_#84抗体由来のヒト化抗体、rat_CD147_#101抗体由来のヒト化抗体、rat_CD147_#110抗体由来のヒト化抗体又はrat_CD147_#131抗体由来のヒト化抗体は、好ましくは、CD147を介したp38MAPKシグナル伝達及び／又はSMAD4のシグナル伝達を活性化する。

[0091] 本発明の抗体としては、さらに、ヒト抗体を挙げることができる。抗CD147ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗CD147ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p. 722-727等を参照。）によって取得することができる。

[0092] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりにヒト人工染色体（Human artificial chromosome, HAC）ベクターやマウス人工染色体（Mouse artificial chromosome, MAC）ベクターなどのベクターを介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製、及びこれらの動物同士を掛け合わせることに

り作り出すことができる。

[0093] また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは該cDNAを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる。ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0094] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431等参照。) も知られている。

[0095] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116) を用いることができる。抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる (WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388、Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433-455、Nature Biotech

n o l o g y (2 0 0 5) 2 3 (9) , p . 1 1 0 5 - 1 1 1 6) 。

- [0096] 本発明の提供する抗体と同じエピトープを有する抗体も本発明の抗体に含まれる。例えば、LN22R8、2P10F2、rat__CD147__#84、rat__CD147__#101、rat__CD147__#110又はrat__CD147__#131のうちの少なくともいずれか1つと同じエピトープを有する抗体が挙げられる。
- [0097] 本発明のLN22R8及び2P10F2は、図3のmu3で表されるエピトープ（ヒトCD147v1：DALPGQKTEFKVDSDDQ（配列番号143）、サルCD147：DTLPGQKTDFEVDSDDL（配列番号144））を認識した。本発明の抗体には、配列番号143又は配列番号144、あるいは配列番号143又は配列番号144の配列において1又は数個、好ましくは1～3個、より好ましくは1又は2個のアミノ酸が欠失、置換又は不可されたアミノ酸配列を含む配列を認識又は結合する抗体も、その範囲に含まれる。この抗体は、CD147を介したシグナル伝達を活性化することが好ましい。
- [0098] また、本発明の抗体には、rat__CD147__#110、好ましくは、ヒト化#110H1L4と同じエピトープを認識する抗体を含む。この抗体は、CD147を介したシグナル伝達を活性化することが好ましい。ヒト化#110H1L4のエピトープ解析の結果は、実施例17に示される。
- [0099] 好適な抗体は、当業者に周知の抗原に対する結合性を評価することで選抜することができる。抗体と抗原（CD147）との解離定数は表面プラズモン共鳴（SPR）を検出原理とするピアコアT200（GE Healthcare Bioscience社）を使用して測定することができる。例えば、リガンドとして固相化した抗原に対し、適当な濃度に設定した抗体をアナライトと反応させ、その結合及び解離を測定することにより、結合速度定数 k_{a1} 、解離速度定数 k_{d1} 及び解離定数（ KD ； $KD = k_{d1} / k_{a1}$ ）を得ることができる。
- [0100] CD147に対する結合性評価は、ピアコアT200の使用に限定されず

、表面プラズモン共鳴（SPR）を検出原理とする機器、結合平衡除外法（Kinetic Exclusion Assay）を検出原理とするKinExA（Sapidyne Instruments社）、バイオレイヤー干渉法（Bio-Layer Interferometry）を検出原理とするBLITZシステム（Pall社）あるいはELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法等によっても可能である。

[0101] 抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（DSC）は、蛋白の相対的構造安定性の良い指標となる熱変性中点（T_m）を素早く、また正確に測定することができる方法である。DSCを用いてT_m値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Loriburton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, p. 265-273）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0102] また、抗体の重鎖及び軽鎖の全長配列を適切なリンカーを用いて連結し、一本鎖イムノグロブリン（single chain immunoglobulin）を取得する方法も知られている（Lee, H-S, et. al., Molecular Immunology (1999) 36, p. 61-71; Shirrmann, T. et. al., mAbs (2010), 2, (1) p. 1-4）。このような一本鎖イムノグロブリンは二量体化することによって、本来は四量体である抗体と類似した構造と活性を保持す

ることが可能である。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、軽鎖配列を有さない抗体であってもよい。このような抗体は、単一ドメイン抗体 (single domain antibody: sdAb) 又はナノボディ (nanobody) と呼ばれており、実際にラクダ又はラマで観察され、抗原結合能が保持されていることが報告されている (Muyldemans S. et. al., Protein Eng. (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., Nature (1993) 363 (6428) 446-8)。上記の抗体は、本発明における抗体の抗原結合断片の一種と解釈することも可能である。

[0103] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節することによって、抗体依存性細胞障害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、WO99/54342、WO2000/61739、WO2002/31140等が知られているが、これらに限定されるものではない。

[0104] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

[0105] 抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げる事ができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650)、マウス線維芽細胞NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO細胞、ATCC CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlau

b, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p. 4126-4220) を挙げることができる。また、原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。以上の培養法においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。

[0106] 本発明の抗体のアイソタイプとしての制限はなく、例えば IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、IgM、IgA (IgA1, IgA2)、IgD あるいは IgE 等を挙げることができるが、好ましくは IgG 又は IgM、さらに好ましくは IgG が挙げられる。

[0107] ヒト IgG1 とは、5 種存在するヒト IgG サブクラスのなかで、補体結合を介した CDC 活性、抗体依存的な細胞障害活性といったエフェクター機能が非常に強く (Bruggemann et al., J. Exp. Med., 1351-1361, 1987)、治療用抗体で癌に高発現する分子を標的とする場合に、エフェクター機能を介した細胞障害による癌細胞の細胞死誘導を促すことで治療効果を示す IgG フォーマットとして利用される (トラスツズマブ、リツキシマブなど)。HLA-DR を標的としたヒト IgG1 抗体では、ヒト IgG1 に備わった抗体の CDC 活性に依存し、投与後のカニクイザルが死亡したことが報告されており、正常臓器でも発現している分子を標的とする抗体医薬では、エフェクター機能が重篤な副作用を引き起こす懸念がある (Tawara, T., J. Immunology, 2008, 2294-2298)。本発明の抗体のアイソタイプとして IgG1 を用いる場合は、IgG1 抗体は変異を有していてもよく、定常領域のアミノ酸残基の一部を置換することによって、エフェクター機能を調整することが可能である (WO88/007089、WO94/28027、WO94/29351 参照)。エフェクター機能を減弱さ

せたIgG1の変異体としては、IgG1 LALA (IgG1-L234A、L235A)、IgG1 LAGA (IgG1-L235A、G237A) 等が挙げられる。

[0108] ヒトIgG2とは、5種存在するヒトIgG サブクラスのなかで、補体結合を介したCDC活性、抗体依存的な細胞障害活性といったエフェクター機能が非常に弱く (Bruggemann et al., J. Exp. Med., 1351-1361, 1987)、治療用抗体で正常臓器に発現する分子を標的とする場合にエフェクター機能を介した細胞障害による毒性を回避するためのIgGフォーマットのの一つとして利用される (デノスマブ、エボロクマブ、プロダルマブ)。

[0109] ヒトIgG4とは、5種存在するヒトIgG サブクラスのなかで、補体結合を介したCDC活性、抗体依存的な細胞障害活性といったエフェクター機能が非常に弱く (Bruggemann et al., J. Exp. Med., 1351-1361, 1987)、治療用抗体で正常臓器に発現する分子を標的とする場合にエフェクター機能を介した細胞障害による毒性を回避するためのIgGフォーマットのの一つとして利用される (オプジーブ)。
本発明の抗体のアイソタイプとしてIgG4を用いる場合は、定常領域のアミノ酸残基の一部を置換することによって、IgG4特有の分割が抑制され、半減期を延長することが可能である (Molecular Immunology、30、1 105-108 (1993) 参照)。

[0110] 本発明の抗体のアイソタイプとしてIgG4を用いる場合、IgG4抗体は変異を有していてもよい。IgG4の変異体としては、EUインデックス (Proc Natl Acad Sci US A. 1969、63 (1)、78-85; Kabat et. al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition) により示される234位のフェニルアラニンのアラニンへの置換 (F234A) 及び235位のロイシンのアラニンへの置換 (L235A) が挙げられる (Parekh et

a l. , m A b s , 3 1 0 - 3 1 8 , 2 0 1 2) 。 このような抗体の変異を F A L A 変異と呼ぶ。 I g G 4 P F A L A は、 C H 2 ドメインに存在する F c γ R s (例えば、 F c γ R I 、 F c γ R I I 又は F c γ R I I I など) との相互作用に必要なアミノ酸残基 2 つをアラニンに置換することで、更にエフェクター機能を減弱させている。また、 I g G 4 は抗体重鎖間の S S 結合の形成が安定していないので、安定性を高めるために、抗体重鎖間の S S 結合の形成を促進させる変異を導入する。このような変異として、 E U インデックスにより示される 2 2 8 位のセリンのプロリンへの置換 (S 2 2 8 P) が挙げられる (A N G A L e t . a l . , M o l e c u l a r I m m u n o l o g y , 1 0 5 - 1 0 8 , 1 9 9 3) 。 この抗体の変異を P r o 変異と呼ぶ。 本発明の抗体の定常領域には、上記の F A L A 変異及び P r o 変異が同時に導入されていてもよい (V a f a e t . a l . , M e t h o d s , 6 5 , 1 1 4 - 1 2 6 , 2 0 1 4) 。 F A L A 変異を有する I g G 4 重鎖を「 I g G 4 F A L A 」タイプ重鎖と呼び、 P r o 変異を有する I g G 4 重鎖を「 I g G 4 P 」タイプ重鎖と呼び、 F A L A 変異及び P r o 変異の両方の変異を有する I g G 4 重鎖を「 I g G 4 P F A L A 」タイプ重鎖と呼ぶ。

[0111] 抗体重鎖定常領域は C H 1 、ヒンジ、 C H 2 及び C H 3 領域からなり、 C H 1 は、 E U インデックス 1 1 8 から 2 1 5 、ヒンジは E U インデックス 2 1 6 から 2 3 0 、 C H 2 は E U インデックス 2 3 1 から 3 4 0 、 C H 3 は E U インデックス 3 4 1 から 4 4 6 と定義される。 E U インデックスにより示される、 2 2 8 位のセリンから置換されたプロリン、 2 3 4 位のフェニルアラニンから置換されたアラニン及び 2 3 5 位のロイシンから置換されたアラニンは、それぞれ、ヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 重鎖 I g G 4 P F A L A のアミノ酸配列を示す配列番号 1 0 0 において第 2 4 8 番目のプロリン、第 2 5 4 番目のアラニン及び第 2 5 5 番目のアラニン、ヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 0 1 重鎖 I g G 4 P F A L A のアミノ酸配列を示す配列番号 1 0 8 において第 2 4 5 番目のプロリン、第 2 5 1 番目のアラニン

及び第252番目のアラニン、ヒトキメラ *rat*_CD147_#110 重鎖 IgG4PFALA のアミノ酸配列を示す配列番号108において第244番目のプロリン、第250番目のアラニン及び第251番目のアラニンに相当する。

[0112] 本発明の抗体の好ましいアイソタイプとしては、IgG1、IgG2、IgG4、IgG4P又は、IgG4PFALAが挙げられ、特に好ましくは、IgG2、IgG4P又は、IgG4PFALAが挙げられ、さらにより好ましくは、IgG2又はIgG4Pが挙げられる。

[0113] また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の抗原結合断片又はその修飾物であってもよい。抗体をパパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか、あるいは抗体遺伝子を遺伝子工学的手法によって改変し適当な培養細胞において発現させることによって、該抗体の断片を得ることができる。このような抗体断片のうちで、抗体全長分子の持つ機能の全て又は一部を保持している断片を抗体の抗原結合断片と呼ぶことができる。抗体の機能としては、抗原に関連するシグナル伝達の活性化を挙げることができる。

[0114] CD147は、赤血球をはじめとする血液細胞や生存に必須な正常臓器でも発現しているため (Spring, et al., Eur. J. Immunol., 1997, 891-897)、抗体に付随するエフェクター機能を利用した抗腫瘍効果は副作用のリスクが高いと考えられる。実際に赤血球は、抗体結合によって生じるエフェクター機能 (ADCC, CDC, ADCCP) に感受性があることが報告されており (Fleigel, W., Transfusion, 2015, S47-S58)、赤血球に対する抗体が体内で増加することで自己免疫性溶血性貧血となることが知られている (Gibson, J., Aust. N. Z. J. Med., 1988, 625-637)。本発明の抗体は、正常細胞にも発現するCD147を標的とした治療用抗体において、重篤な副作用の原因となるADCC活性、ADCCP活性又はCDC活性のいずれか、あるいは、すべてが低い又はほとんど検出されないことを特徴とする。

[0115] 本発明者らは、抗体のエフェクター機能によらず、CD147の細胞シグナル伝達を活性化することで抗腫瘍活性を示すヒトCD147抗体を初めて見出した。本発明における抗体が保持する機能は、CD147に対する結合活性及び／又はCD147を活性化する機能である。本発明の抗体は、好ましくはCD147を介する下流の関連シグナル分子、例えば、FAK、MEK、Erk、JAK/STAT、AKT又はMAPキナーゼ（MAPK）あるいはこれらのさらに下流の関連シグナル分子を活性化する。本発明の抗体は、より好ましくは、MAPK又はMAPKの下流の分子を活性化する。MAPKとして、好ましくは、p38MAPKが挙げられる。MAPKのさらに下流のシグナル分子としては、例えば、HSP27、cxcl8又はSMAD（例えば、SMAD2、SMAD3又はSMAD4、好ましくは、SMAD4）が挙げられる。「CD147の活性化」としては、例えば、p38MAPKのmRNA発現量の増加、p38MAPKの蛋白質発現量の増加、p38MAPKのリン酸化、HSP27のリン酸化（例えば、HSP27のSer82のリン酸化又はHSP27のSer15のリン酸化）、cxcl8 mRNA発現量の増加、cxcl8蛋白質発現量の増加又はSMADシグナル活性化を介したrhoB mRNA発現量の増加又はrhoB蛋白質発現量の増加が挙げられる。「CD147の活性化」として好ましくは、p38MAPKの蛋白質発現量の増加、p38MAPKのリン酸化、HSP27のリン酸化（例えば、HSP27のSer82のリン酸化又はHSP27のSer15のリン酸化）、cxcl8 mRNA発現量の増加又はSMADシグナル活性化を介したrhoB mRNA発現量の増加が挙げられる。

SMAD2又はSMAD3は、TGF β がTGF β 受容体（TGFBR1/2）に結合した際に、TGF β 受容体によってリン酸化され、SMAD4とヘテロ三量体を形成して、核内に移行し、染色体上のSMAD DNA結合配列（Smad binding element：SBE）を持つ転写調節領域に結合し、下流遺伝子のmRNA発現を正あるいは負に制御することが知られている（宮園、日老医誌、1999、162－166）。従って

、SMAD 4の活性化には、SMAD 2又はSMAD 3の存在が必要であると考えられる。SMAD 2、SMAD 3及びSMAD 4は、TGF β 依存的にKLF 5の発現量を負に制御している(David et al., Cell, 2016, 164(5), 1015-1030)。SMAD 4が失われている膵臓癌細胞では、KLF 5遺伝子のSMAD 2、SMAD 3及びSMAD 4による抑制シグナルが解除され、KLF 5蛋白質が発現する。SMAD 4が失われ、KLF 5が発現しているとTGF β 依存的な細胞死のシグナル(SOX 4依存的)が抑制されることが知られている(前出、David et al., Cell)。

[0116] 本発明者らは、本発明のヒトCD 147抗体が、p 38MAPKをリン酸化し(図21)、HSP 27をリン酸化し(図20)、cxcl 8の発現を増加させることを見出した(図22(b)及び図23(b))。従って、本発明の抗体投与前後で、これらの分子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子発現若しくは蛋白質発現、又はリン酸化の状態が変化するかどうかを確認することによって、本発明の抗体が、CD 147の活性化を介しているかどうかを確認することができる。

[0117] また、本発明者らは、本発明のヒトCD 147抗体は、SMAD 4の蛋白質が発現している膵臓癌モデルに対し薬効を示すこと(図25)；本発明のヒトCD 147抗体は、SMAD 4に遺伝子変異があり、SMAD 4を発現していないBxPC-3などの膵臓癌モデルでは、抗腫瘍効果は部分的(～30%程度)であったこと(図24)；並びに、本発明のヒトCD 147抗体を投与した後の腫瘍では、SMAD 2、SMAD 3及びSMAD 4の下流の分子(rhoB、図22(c)及び図23(c))が誘導されることを見出した。従って、本発明の抗体投与前後で、rhoBの遺伝子発現又は蛋白質発現が変化するかどうかを確認することによって、本発明の抗体が、CD 147の活性化を介しているかどうかを確認することができる。また、患者サンプルにおけるSMAD 4のゲノム配列、遺伝子発現又は蛋白質発現を当業者に周知の方法を用いて測定し、SMAD 4を発現している患者を本発明

の抗体を投与する対象患者として選択し、本発明の抗体を投与することができる。

- [0118] また、B x P C - 3 などの S M A D 4 陰性のモデルでは、K L F 5 の発現が高いことが知られている (D a v i d e t a l . , C e l l , 2 0 1 6 , 1 6 4 (5) , 1 0 1 5 - 1 0 3 0) 。本発明のヒト C D 1 4 7 抗体は、K L F 5 を発現させた M I A P a C a - 2 のモデルで、感受性が 9 1 % から 2 0 % に低下した (実施例 2 6) 。このことから、K L F 5 が発現することで、C D 1 4 7 抗体によって誘導される S M A D 2 、 S M A D 3 及び S M A D 4 依存的な細胞死のシグナルが抑制されると本発明者らは考える。肝癌、A L L 、リンパ腫、消化管間質腫瘍 (G I S T) 、皮膚癌、肉腫、A M L 又は、腎臓癌は K L F 5 の発現量が低く、本発明のヒト C D 1 4 7 抗体が効く患者が多いことが予想される。また、患者サンプルにおける K L F 5 の遺伝子発現又は蛋白質発現を当業者に周知の方法を用いて測定し、K L F 5 の発現が低下又は欠失している患者を本発明の抗体を投与する対象患者として選択し、本発明の抗体を投与することができる。この場合の K L F 5 発現の低下の程度は、当業者によって周知の方法及び適切な臨床試験の実施により決定され得、例えば、効果の得られた患者と効果の得られなかった患者における K L F 5 の発現量を比較して適切な閾値が設定される。
- [0119] 例えば、抗体の断片としては、F a b 、 F (a b ') ₂ 、 F v 、又は重鎖及び軽鎖の F v を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン F v (s c F v) 、 d i a b o d y (d i a b o d i e s) 、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体などを挙げることができる。また、F (a b ') ₂ を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片である F a b ' も抗体の断片に含まれる。
- [0120] さらに、本発明の抗体は少なくとも 2 種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。通常このような分子は 2 種類の抗原に結合するものであるが (即ち、二重特異性抗体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y)) 、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上 (例え

ば、3種類)の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。

[0121] 本発明の多特異性抗体は、全長からなる抗体、又はそのような抗体の断片(例えば、 $F(ab')_2$ 二重特異性抗体)でもよい。二重特異性抗体は2種類の抗体の重鎖と軽鎖(HL対)を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することによっても、作製することができる(Millstein et al., Nature (1983) 305, p. 537-539)。

[0122] 本発明の抗体は一本鎖抗体(scFvとも記載する)でもよい。一本鎖抗体は、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる(Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113 (Rosenberg及びMoore編、Springer Verlag, New York, p. 269-315 (1994)、Nature Biotechnology (2005), 23, p. 1126-1136)。また、2つのscFvをポリペプチドリinkerで結合させて作製されるBis-scFv断片を二重特異性抗体として使用することもできる。

[0123] 一本鎖抗体を作製する方法は当技術分野において周知である(例えば、米国特許第4,946,778号、米国特許第5,260,203号、米国特許第5,091,513号、米国特許第5,455,030号等を参照)。このscFvにおいて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリinkerを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988), 85, p. 5879-5883)。scFvにおける重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。可変領域を連結するポリペプチドリinkerとしては、例えば12~19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

- [0124] s c F v をコードする D N A は、前記抗体の重鎖又は重鎖可変領域をコードする D N A、及び軽鎖又は軽鎖可変領域をコードする D N A のうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードする D N A 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて P C R 法により増幅し、次いで、さらにポリペプチドリンカー部分をコードする D N A、及びその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせることで増幅することにより得られる。
- [0125] また、一旦 s c F v をコードする D N A が作製されると、それらを含む発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って s c F v を得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。
- [0126] 本発明の抗体は、多量化して抗原に対する親和性を高めたものであってもよい。多量化する抗体としては、1種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体を多量化する方法としては、I g G C H 3 ドメインと2つの s c F v との結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスターン-ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。
- [0127] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗 C D 1 4 7 抗体の混合物である、ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の一例としては、C D R が異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体としては、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、該培養物から精製された抗体を用いることができる（W O 2 0 0 4 / 0 6 1 1 0 4 参照）。
- [0128] 本発明の抗体は、上記の抗体の重鎖及び／又は軽鎖と比較して80%乃至99%との同一性（又は相同性）を有する抗体であってもよい。上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い相同性を示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の抗原結合能、C D 1 4 7 の活性化、好

ましくは、MAPKの活性化、MAPKの下流シグナル分子の活性化を有する抗体を選択することが可能である。このような相同性は、一般的には80%以上の相同性であり、好ましくは90%以上の相同性相同性であり、より好ましくは95%以上の相同性であり、最も好ましくは99%以上の相同性である。また、重鎖及び／又は軽鎖のアミノ酸配列に1乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の各種作用を有する抗体を選択することが可能である。置換、欠失及び／又は付加されるアミノ酸残基数は、一般的には10アミノ酸残基以下であり、好ましくは5乃至6アミノ酸残基以下であり、より好ましくは2乃至3アミノ酸残基以下であり、最も好ましくは1アミノ酸残基である。なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており（Tsubaki et. al., Int. J. Biol. Macromol, 139-147, 2013）。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用など）には影響を及ぼさない。従って、本発明には当該修飾を受けた抗体も含まれ、重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等を挙げることができる。但し、抗原結合能及びCD147の下流の関連シグナル分子を活性化する機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する2本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の双方でカルボキシル末端の1つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0129] 二種類のアミノ酸配列間の相同性は、Blast algorithm

version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffner, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), 「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Blast algorithmは、インターネットで www.ncbi.nlm.nih.gov/blast にアクセスすることによっても使用することができる。なお、上記のBlast algorithmによってIdentity (又はIdentities) 及びPositivity (又はPositivities) の2種類のパーセンテージの値が計算される。前者は相同性を求めるべき二種類のアミノ酸配列の間でアミノ酸残基が一致した場合の値であり、後者は化学構造の類似したアミノ酸残基も考慮した数値である。本明細書においては、アミノ酸残基が一致している場合のIdentity (同一性) の値を持って相同性の値とする。

[0130] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

[0131] 本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤がコンジュゲートを形成しているもの (Immunoconjugate) でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合している物を挙げることができる (Nature Biotechnology (2005) 23, p. 1137-1146)。

[0132] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用

ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996) ; Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) が、これらに限定されるものではない。

[0133] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

[0134] これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0135] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムを挙げることができる。

[0136] 例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (GEヘルスケア)等を挙げることができる。

[0137] また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0138] (抗CD147抗体を含有する医薬)

上述の「抗CD147抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗CD147抗体の中から、本発明の抗CD147抗体を得ることができる。このようにして得られた抗体は、腫瘍及び／又は癌の治療及び／又は予防剤として用いることができる。本発明の抗CD147抗体は、優れた抗腫瘍活

性を有し、腫瘍又は癌の治療薬として有用である。本発明の抗CD147抗体は、ゲムシタビン耐性癌細胞やソラフェニブ低感受性癌細胞に対しても優れた抗腫瘍効果を示した。本発明の抗CD147抗体は、慢性骨髄性白血病細胞において、イマチニブよりも顕著に強い薬効を示した。

[0139] 本発明の抗CD147抗体又は該抗体を含有する医薬によって治療され得る腫瘍としては、CD147を発現する腫瘍であれば特に限定されないが、好ましくは、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌、甲状腺癌、皮膚癌、頭頸部癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、脳腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、白血病（例えば、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、又は慢性リンパ性白血病（CLL）又は急性リンパ性白血病（ALL））、リンパ腫又は悪性リンパ腫（例えば、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（diffuse large B-cell lymphoma、DLBCL））が挙げられ、より好ましくは、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）が挙げられる。

[0140] また、本発明の抗体又は該抗体を含有する医薬によって治療され得る腫瘍としては、SMAD陽性のCD147を発現する腫瘍が挙げられ、SMAD陽性のCD147を発現する腫瘍としては、例えば、SMAD陽性のCD147を発現する肝癌又は膵臓癌が挙げられる。本発明の抗CD147抗体又は該抗体を含有する医薬は、好ましくは、CD147及び／又はSMADの発現が確認された患者に投与される。SMADとしては、好ましくは、SMAD2、SMAD3及び／又はSMAD4が挙げられ、より好ましくは、SMAD4が挙げられる。好ましくは、SMAD4の発現の確認にあわせて、SMAD2又はSMAD3のうちの少なくともいずれか1つが発現していることが確認される。

- [0141] あるいは、本発明の抗体又は該抗体を含有する医薬によって治療され得る腫瘍としては、K L F 5 の発現が低下又は欠失した腫瘍が挙げられ、K L F 5 の発現が低下又は欠失した腫瘍としては、肝癌、A L L、リンパ腫、消化管間質腫瘍（G I S T）、皮膚癌、肉腫、A M L 又は腎臓癌が挙げられる。本発明の抗 C D 1 4 7 抗体又は該抗体を含有する医薬は、好ましくは、K L F 5 の発現が低下又は欠失が確認された患者に投与される。
- [0142] 本発明の抗 C D 1 4 7 抗体は、治療の目的によって、2、3あるいはそれ以上の他の治療剤を投与することもできるし、それらの他の治療剤は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することができる。他の治療剤と抗 C D 1 4 7 抗体は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することもできる。また、抗 C D 1 4 7 抗体と他の治療剤を別々の製剤に封入して同時に投与することもできる。さらに、他の薬剤と抗 C D 1 4 7 抗体を相前後して別々に投与することもできる。すなわち、他の治療剤を投与した後に抗 C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与するか、あるいは抗 C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与した後に他の治療剤を投与してもよい。
- [0143] 本発明は、治療及び／又は予防に有効な量の抗 C D 1 4 7 抗体と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。
- [0144] 本発明は、治療及び／又は予防に有効な量の抗 C D 1 4 7 抗体と治療及び／又は予防に有効な量の少なくとも一つの抗腫瘍治療剤と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。
- [0145] 本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては好ましくは投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。
- [0146] 本発明の医薬組成物は、p H、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、保持したりする

ための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げるができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリスー塩酸（ Tris-HCl ）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、 β -シクロデキストリンやヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・グリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、ソルビタンエステル、ポリソルベート20やポリソルベート80等のポリソルベート、トリトン（ triton ）、トロメタミン（ tromethamine ）、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は、抗CD147抗体の重量に対して0.01～100倍、特に0.1～10倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

[0147] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはpH7.0～8.5のTr

i s バッファー、pH 4.0-5.5 の酢酸バッファー、pH 3.0-6.2 のクエン酸バッファーを含むことができる。また、これらのバッファーにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。本発明の医薬組成物には抗CD147抗体を含む医薬組成物並びに、抗CD147抗体及び少なくとも一つの抗腫瘍治療剤を含む医薬組成物を挙げることができ、本発明の医薬組成物は選択された組成と必要な純度を持つ薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗CD147抗体を含む医薬組成物並びに、抗CD147抗体及び少なくとも一つの抗癌剤治療剤を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

[0148] 本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができる。本発明の抗体をヒトに対して投与する際には、約0.1~100mg/kgを1~180日間に1回又は複数回投与すればよい。しかし、投与量や投与回数は、一般に、患者の性別、体重、年齢、症状、重篤度、副作用などを考慮して決定されるべきものであるので、上記の用量や用法には限定されないものとする。

[0149] 本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などを挙げることができる。投与経路は、経口経路又は非経口経路であり、非経口経路には、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、直腸内、経粘膜内、皮内などの経路が挙げられる。

[0150] 本発明の抗体若しくは当該抗体の抗原結合断片、これらを含む薬物複合体、これらを含むバイスペシフィック抗体又はこれらを含む医薬組成物は、これらが投与される患者選別のためのバイオマーカーと組み合わせて提供され得る。これらの抗体や医薬組成物は、バイオマーカーを検出する手段と組み合わせてキットとして提供されていてもよいし、抗体や医薬組成物の提供とバイオマーカーとの提供は別々であってもよい。バイオマーカーを用いることにより、本発明の抗体や医薬組成物は、本発明の抗体の効果がより高

く期待される患者群に投与され得る。

[0151] 本発明は、癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中に含まれる S M A D 4 の発現又は K L F 5 の発現を測定し、S M A D 4 が検出された患者又は K L F 5 の発現低下若しくは欠失が検出された患者を、本発明の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は本発明の医薬組成物による癌の治療への応答性があると判定することを含む、癌の治療への応答性を予測する方法；癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中における S M A D 4 の発現又は K L F 5 の発現を検出し、S M A D 4 が検出された患者又は K L F 5 の発現低下若しくは欠失が検出された患者を、本発明の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は本発明の医薬組成物による癌の治療の対象者として選別することを含む、癌の治療の対象を選別する方法；癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中に含まれる S M A D 4 の発現又は K L F 5 の発現を検出し、S M A D 4 が検出された患者又は K L F 5 の発現低下若しくは欠失が検出された患者に対し、本発明の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は本発明の医薬組成物を投与することを含む、癌の治療方法；あるいは、本発明の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は本発明の医薬組成物による癌の治療への応答性を判定するためのキットであって、癌患者由来の生物学的試料中の S M A D 4 の発現又は K L F 5 の発現を検出する手段を少なくとも含む、キットに関する。

[0152] 本明細書において「生物学的試料」は、個体から単離された組織、液体、細胞、およびそれらの混合物をいい、例えば腫瘍生検、髄液、胸腔内液、腹腔内液、リンパ液、皮膚切片、血液、尿、糞便、痰、呼吸器、腸管、尿生殖器官、唾液、乳、消化器官、およびこれらから採取された細胞を挙げることができるが、これらに限定されない。「生物学的試料」は、がん細胞を含む試料であることが好ましく、より好ましくは切除や生検により得られた組織や細胞、あるいは胸腔内液や腹腔内液に由来する細胞を例示できる。さらに好ましい生物学的試料は、がん細胞またはがん組織を含む試料である。

[0153] 「S M A D 4 の発現」の検出や測定は、S M A D 4 のゲノム配列、遺伝子

発現又は蛋白質発現を当業者に周知の方法を用いて実施することができ、例えば、RNAシーケンス、マイクロアレイ、ゲノムシーケンス、免疫アッセイが挙げられる。

- [0154] 「KLF5の発現」の検出や測定は、KLF5のゲノム配列、遺伝子発現又は蛋白質発現を当業者に周知の方法を用いて検出することができ、例えば、IHC、RNAシーケンス、マイクロアレイ、ゲノムシーケンス、免疫アッセイが挙げられる。「KLF5の発現低下」とは、対照（例えば、健常者や同一患者の非がん組織における発現レベル）との比較において、それよりも発現レベルが低いことをいう。あるいは、本発明の抗体又は医薬組成物による癌の治療への応答性があると判定することができるKLF5発現の低下の程度は、当業者によって周知の方法及び適切な臨床試験の実施により決定され得、例えば、効果の得られた患者と効果の得られなかった患者におけるKLF5の発現量を比較して適切な閾値が設定される。従って、「KLF5の発現低下」とは、例えば、このようにして設定された閾値よりも下であることをいう。

実施例

- [0155] 以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及びManiatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年発刊) に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。本実施例において、ヒト膵臓株MIA PaCa-2は、ATCC, Cat. CRL-1420を使用し、ヒト膵臓癌

細胞株 PANC-1 は、ATCC, Cat. CRL-1469 を使用した。

[0156] (実施例 1) 細胞免疫によるマウス・ラット抗体の作製

1) -1 CD147 発現ベクターの作製

市販のヒト CD147 遺伝子 (BSG variant 2 / CD147 v2) のクローン IOH3378 (インビトロジェン社) と哺乳類細胞用発現ベクター pcDNA-DEST40 (インビトロジェン社) を Gateway LR クロナーゼを用いて反応させ、ヒト CD147 v2 発現ベクター (pcDNA-DEST40-CD147 v2) を作製した。

[0157] 市販のヒト CD147 遺伝子 (BSG variant 1 / CD147 v1) の哺乳類細胞用発現ベクター pCMV6-XL5-hBSGv1 (Origene 社、Cat. SC303059) を購入し、ヒト CD147 v1 発現ベクターとした。

[0158] カニクイザル CD147 発現ベクターとして、pCMV3-cynoBSG (Sino Biological Inc.、Cat. CG90636-UT) を購入した。

[0159] マウス CD147 v2 発現ベクターとして、pCMV3-mBSGv2 (Sino Biological Inc.、Cat. MG50332-UT) を購入した。

[0160] 1) -2 マウスハイブリドーマの作製

4~6 週齢の BALB/c AnNCrI CrIj マウス (日本チャールス・リバー社) を使用した。0 日目、7 日目、15 日目及び 24 日目にベルセン (Thermo Fisher Scientific 社) で剥がした 5×10^6 個の LNCaP 細胞 (ATCC, CRL-1740) を PBS に懸濁して背部皮下に投与した。31 日目に同じ細胞を 5×10^6 個静脈投与し、同日に脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。脾臓細胞とマウスミエローマ P3X63Ag8U.1 細胞 (ATCC, CRL-1597) とを PEG 4000 (IBL 社) を用いて細胞融合しハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの単離、培養には、ClonaCell-HY Medium D

(STEMCELL TECHNOLOGIES社)、ClonaCell
-HY MediumE (STEMCELL TECHNOLOGIES社
)を用いた。

[0161] 1) - 3 ラットハイブリドーマの作製

7週齢のWKY／Izm (日本エスエルシー株式会社)を使用した。ヒト
脾臓癌細胞株PANC-1を 1×10^7 個、腎部に免疫し13日後に腸骨リン
パ節細胞を採取しハイブリドーマ作製に用いた。ラット脾臓細胞とマウスミ
エローマSP2／O-Ag14細胞(ATCC, CRL-1581)をL
F301細胞融合装置(株式会社ベックス)を用いて細胞融合しハイブリド
ーマを作製した。ハイブリドーマの単離、培養には、ClonaCell-
HY MediumD (STEMCELL TECHNOLOGIES社)
、ClonaCell-HY MediumE (STEMCELL TEC
HNOLOGIES社)を用いた。

[0162] 1) - 4 ELISAによる抗原同定

ヒトCD147Fc融合蛋白質(Sino Biological社、C
at. 10186-H02H)とマウスCD147Fc融合蛋白質(Sin
o Biological社、Cat. 50332-M03H)を使用した
。ヒトCD147Fc融合蛋白質とマウスCD147Fc融合蛋白質は、P
BS緩衝液を添加し、氷上で溶解し、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した。同蛋白質溶
解液を96ウェルプレート(NUNC社、Cat. 442404)に100
 μl 加え、4℃一晩保存し、ウェルをCD147Fc融合蛋白質でコートし
た。蛋白質溶解液を除き、1%BSA(Research Organic
s社、Cat. 1334A)を含むPBS緩衝液でウェルを4℃、2時間ブ
ロッキングした。0.05%Tween20(ATTO社、Cat. WSE
-7235)を含むPBS緩衝液でウェルを3回洗浄したのち、実施例1)
-2、1) - 3で調製したハイブリドーマ培養上清をPBS緩衝液で20倍
に希釈し各ウェルに加え室温で1時間加温した。0.05%Tween20
(ATTO社、Cat. WSE-7235)を含むPBS緩衝液でウェルを

3回洗浄した後、1%BSAを含むPBS緩衝液で50000倍に希釈した anti-rat-Fab2-igG-HRP (Jackson ImmunoResearch社、Cat. 112-036-072) を100 μ l 加え30分間、室温で振盪した。0.05%Tween20 (ATTO社、Cat. WSE-7235) を含むPBS緩衝液でウェルを5回洗浄した後、100 μ lのHRP酵素発色試薬 (eBioscience社、Super AquaBlue ELISA substrate, Cat. 00-4203) を加え、10~20分室温で加温し、プレートリーダー (Envision、パーキンエルマー社) で405nmの吸光度を測定した。2~3ウェルの吸光度の測定値について平均値を算出し、1次抗体なしの対照ウェルでの測定値の2倍以上の吸光度が観察された抗体について結合性あり (+)、2倍に満たないものを結合性なし (-) と判定し表1にまとめた。LN22R8、2P1A6、2P3A9、2P3G8、2P8C12、2P10F2、2P2D7、2P2D10、2P1B7の培養上清について、ヒトCD147Fc融合蛋白質コートウェル特異的な発色を確認した。LN24R7、2P5F5、2P6A2、2P3G8については、ヒト及びマウスCD147Fc融合蛋白質コートウェル特異的な発色を確認した。

[0163]

[表1]

	BSA	hCD147	mCD147
LN22R8	-	+	-
LN24R7	-	+	+
2P1A6	-	+	-
2P3A7	-	-	-
2P3A9	-	+	-
2P3E12	-	-	-
2P3G5	-	-	-
2P5E2	-	-	-
2P5F5	-	+	+
2P6A2	-	+	+
2P6C9	-	-	-
2P6H2	-	-	-
2P7B8	+	+	-
2P7D6	-	-	-
2P8B12	-	-	-
2P8C12	-	+	-
2P9A12	+	+	+
2P9B10	-	-	-
2P10E6	-	-	-
2P10F2	-	+	-
2P10H2	+	+	+
2P2D7	-	+	-
2P2D10	-	+	-
2P2E6	-	-	-
2P2H8	-	-	-
2P1B7	-	+	-
2P3A9	-	-	-
2P3G8	-	+	+

[0164] 1) - 5 モノクローナル抗体の調製と抗体アイソタイプの決定

実施例 1) - 4 で抗ヒト CD 1 4 7 抗体産生が確認されたハイブリドーマで、安定的に培養可能なものについて、市販の I s o t y p i n g キットを用いて、培養上清に含まれる抗体のアイソタイプを決定し表 2 に示した。C L - 1 0 0 0 フラスコ（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて、これらのハイブリドーマを培養し、モノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清を調製した。

[0165] [表2]

細胞免疫より取得した CD 1 4 7 抗体

抗体	アイソタイプ
L N 2 2 R 8	マウス I g G 3
2 P 1 A 6	ラット I g G 2 a / κ
2 P 1 B 7	ラット I g G 2 a / κ
2 P 2 D 6	ラット I g G 2 a / κ
2 P 3 G 8	ラット I g G 2 b / κ
2 P 2 D 7	ラット I g G 2 a / κ
2 P 2 D 1 0	ラット I g G 2 b / κ
2 P 8 C 1 2	ラット I g G 2 a / κ
2 P 1 0 F 2	ラット I g G 2 b / κ

[0166] 1) - 6 モノクローナル抗体の精製

実施例 1) - 5 で作製した培養上清から抗体を精製した。抗ヒト CD 1 4 7 マウスモノクローナル抗体については、r P r o t e i n A アフィニティークロマトグラフィー（4～6℃下）1 段階工程で精製した。r P r o t e i n A アフィニティークロマトグラフィー精製後のバッファー置換工程は 4～6℃下で実施した。最初に培養上清を P B S で平衡化した M a b S e l e c t S u R e（G E H e a l t h c a r e B i o s c i e n c e 社製）が充填されたカラムにアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち

、カラム容量2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2M アルギニン塩酸塩溶液 (pH 4.0) で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific 社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) により HBSor (25mM Histidine / 5% Sorbitol / pH 6.0) への液置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量UF10K, Sartorius 社、4℃下) にて濃縮し、IgG濃度を4.9mg/ml に調製した。最後に Minisart-Plus filter (Sartorius 社) でろ過し、精製サンプルとした。

- [0167] 抗ヒトCD147ラットモノクローナル抗体については、Protein Gアフィニティークロマトグラフィー (4～6℃下) 1段階工程で精製した。Protein Gアフィニティークロマトグラフィー精製後のバッファ置換工程は4～6℃下で実施した。最初に、PBSで平衡化した Protein G (GE Healthcare Bioscience 社) が充填されたカラムにハイブリドーマの培養上清をアプライした。培養上清液がカラムに全て入ったのち、カラム容量2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に0.1M グリシン / 塩酸水溶液 (pH 2.7) で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。集めた画分に1M Tris-HCl (pH 9.0) を加えてpH 7.0～7.5に調整した後に、Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量UF30K, Sartorius 社、4～6℃下) にてHBSor (25mM Histidine / 5% Sorbitol / pH 6.0) へのバッファ置換を行うとともに濃縮を行い、抗体濃度を1mg/mL以上に調製した。最後に Minisart-Plus filter (Sartorius 社) でろ過し、精製サンプルとした。

- [0168] 1) -7 in vivo 抗腫瘍活性測定による抗体スクリーニング
 1×10^7 個のヒト膵臓株 PANC-1 を PBS で懸濁し、NOD-sci

dマウス（日本チャールス・リバー社、NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J）の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに群分けをし、移植の27、34、41日後にマウス抗CD147抗体（LN22R8）、ラット抗CD147抗体（2P1A6、2P1B7、2P3G8、2P2D10、2P8C12、2P10F2）を10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した（n=6）。移植の27、34日後にラット抗CD147抗体（2P2D6）を10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した（n=6）。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス（株式会社ミットヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0169] 腫瘍体積（mm³）＝1/2×短径（mm）×短径（mm）×長径（mm）

結果を図1（a）～（c）に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。2P2D6抗体、2P3G8抗体及び2P2D10抗体の結果を図1（a）に示した。最終測定日である移植48日後における腫瘍増殖抑制率は、10mg/kg投与群で、それぞれ、10%、45%及び40%であった。LN22R8抗体、2P1A6抗体及び2P1B7抗体の結果を図1（b）に示した。最終測定日である移植48日後における腫瘍増殖抑制率は、10mg/kg投与群で、それぞれ、50%、26%及び24%であった。2P8C12抗体及び2P10F2抗体の結果を図1（c）に示した。最終測定日である移植48日後における腫瘍増殖抑制率は、10mg/kg投与群で、それぞれ、-2%及び62%であった。

[0170] 1) - 8 CD147抗体の種交差性の解析

CHO-K1細胞（ATCC、CCL-61）にLipofectamine 2000（ThermoFisher Scientific社、Cat. 11668-019）を用いて、実施例1) - 1で作製したpcDNA-DEST40-CD147v2、又はpCMV3-cynoBSGを導入し、1日後にマウス抗ヒトCD147抗体（LN22R8）、又はラット抗ヒトCD147抗体（2P1A6、2P1B7、2P3G8、2P2D

10、2P8C12、2P10F2、2P2D6)、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理し、抗マウスIgG-FITC (MP Biomedical社、Cat. 554936) 又は、抗ラットIgG-PE (BD Biosciences社、Cat. 550767) を用いて各抗体のCD147発現CHO-K1細胞への結合を蛍光検出可能にした。CHO-K1細胞のヒトとカニクイザルCD147発現は、市販の抗CD147抗体 (MEM-M6/1、Abserotec社、Cat. MCA28822) の結合により蛍光検出可能にした。上記の細胞について、フローサイトメーター (Cantoll、BD Biosciences社) の測定を実施し、図2-1~3に結果をまとめた。図の縦軸は細胞数を示し、横軸は蛍光シグナルの強度を示す。

[0171] 市販の抗CD147抗体 (MEM-M6/1)、マウス抗ヒトCD147抗体 (LN22R8)、ラット抗ヒトCD147抗体 (2P1A6、2P1B7、2P3G8、2P2D10、2P8C12、2P10F2、2P2D6)、いずれの抗CD147抗体もヒトCD147発現CHO-K1細胞に結合性を示した (図2-1~3)。

[0172] 市販の抗CD147抗体 (MEM-M6/1) はカニクイザルCD147発現CHO-K1細胞に結合性を示したが、マウス抗ヒトCD147抗体 (LN22R8)、ラット抗ヒトCD147抗体 (2P1A6、2P1B7、2P3G8、2P2D10、2P8C12、2P10F2、2P2D6)、いずれのCD147抗体もカニクイザルCD147発現CHO-K1細胞には結合性を示さなかった (図2-1~3)。

[0173] なお、いずれの抗CD147抗体もマウスCD147発現CHO-K1細胞には結合性を示さなかった (データ未記載)。

[0174] 1) -9 エピトープ解析

エピトープ解析用のヒトCD147異体発現ベクターの作製

カニクイザルとヒトのCD147のアミノ酸配列は、BLAST検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) の結果、81%が同一であり、限られたアミノ酸の違いが、C

D147抗体結合性のエピトープ認識に直接影響していると想定し、種間で異なるアミノ配列を部分的に移植した変異体を用いての抗腫瘍エピトープの推定を進めることにした。hCD147v1、v2共通に含まれるアミノ酸配列を対象として、カニクイザルとヒトのCD147での配列比較を実施し、種間で異なるアミノ酸領域の9領域に分類し、mu1～mu9とした(図3)。CD147変異体発現ベクター作製と細胞膜上への発現確認用にN末端にFLAG配列を導入したヒトCD147variant2のcDNA配列を人工合成し、pcDNA3.1ベクターに導入したプラスミド、Signal-N-Flag-hCD147v2__pcDNA3.1(Genscript社にて作製)を作製した。さらに同プラスミドのヒトCD147遺伝子にカニクイザルのCD147アミノ酸配列mu1～mu9について、DNA置換によるアミノ酸置換変異として導入したヒト-カニクイザルキメラCD147発現ベクター9種、hCD147-mu1__pcDNA3.1、hCD147-mu2__pcDNA3.1、hCD147-mu3__pcDNA3.1、hCD147-mu4__pcDNA3.1、hCD147-mu5__pcDNA3.1、hCD147-mu6__pcDNA3.1、hCD147-mu7__pcDNA3.1、hCD147-mu8__pcDNA3.1、hCD147-mu9__pcDNA3.1作製した(Genscript社にて作製)。

[0175] 1) -10 変異体を用いた抗腫瘍エピトープ領域の特定

ヒトCD147、カニクイザルCD147又は、ヒト-カニクイザルキメラCD147発現ベクター9種の発現ベクターをCHO-K1細胞(ATCC、CCL-61)にLipofectamine 2000(サーモサイエンティフィック社、Cat. 11668-019)を用いて、導入し、1日後に抗ヒトCD147マウス抗体(LN22R8)、ラット抗ヒトCD147抗体(2P1A6、2P1B7、2P3G8、2P2D10、2P8C12、2P10F2、2P2D6)、10μg/mlで処理し、抗マウスIgG-PE(DAKO社、Cat. R480)、抗ラットIgG-PE(B

D社、#550767)を用いて抗CD147抗体のCD147発現CHO-K1細胞への結合を調べた。CD147蛋白質の発現は、市販の抗FLAG抗体(anti-Flag M2, SIGMA社、Cat. F4049-2MG)を用いて確認した。フローサイトメーター(Cantoll、BD Bioscience社)の測定を実施し、表3に結果をまとめた。1次抗体未処理の対照細胞と比較し、10倍以上の蛍光シグナルの増加が認められたサンプルについて、結合陽性(+)と判定した。10倍未満の部分的な蛍光シグナルの増加が認められたサンプルについて、結合弱陽性(±)と判定した。1次抗体未処理の対照細胞と比較し、蛍光シグナルの増加が認められなかったサンプルについて、結合陰性(-)と判定した。

[0176] 実施例1) - 7で40%以上の抗腫瘍効果が観察された抗体2P3G8、2P10F2、2P2D10、LN22R8の抗体は、いずれもm3の変異を持つCD147への結合性が失われていた。抗腫瘍効果に重要なエプトープはm3領域であることが示唆された。

[0177]

[表3]

	in vivo anti- tumor effect	mock	pCMV3- cynoBSG	Signal -N- Flag- hCD1 47V2- pcDN A3.1	hCD1 47- mu1- pcDN A3.1	hCD1 47- mu2- pcDN A3.1	hCD1 47- mu3- pcDN A3.1	hCD1 47- mu4- pcDN A3.1	hCD1 47- mu5- pcDN A3.1	hCD1 47- mu6- pcDN A3.1	hCD1 47- mu7- pcDN A3.1	hCD1 47- mu8- pcDN A3.1	hCD147- mu9- pc DNA3.1
anti-Flag M2	ND	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2P1A6	26%	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2P1B7	24%	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+
2P3G8	45%	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2P10F2	58%	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2P8C12	8%	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2P2D10	40%	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
LN22R8	50%	-	-	±	±	+	-	-	+	+	+	+	±
MEM-M6/1	ND	-	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+

[0178] 1) - 1 1 L N 2 2 R 8 と 2 P 1 0 F 2 抗体の可変領域をコードする c
DNA のヌクレオチド配列の決定

1) - 11-1 LN22R8抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

1) - 11-1-1 LN22R8抗体生産ハイブリドーマのtotal RNAの調製

LN22R8抗体の可変領域をコードするcDNAを増幅するため、LN22R8抗体産生ハイブリドーマよりTRIzol Reagent (Ambion社)を用いてtotal RNAを調製した。

[0179] 1) - 11-1-2 5' - RACE PCRによるLN22R8抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAの増幅と配列の決定

軽鎖可変領域をコードするcDNAの増幅は、実施例1) - 11-1-1で調製したtotal RNAの約1 µgとSMARTer RACE 5' / 3' Kit (Clontech社)を用いて実施した。LN22R8抗体の軽鎖遺伝子の可変領域をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE 5' / 3' Kitに付属)、及び公知のマウス軽鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

[0180] 5' - RACE PCRで増幅した軽鎖の可変領域をコードするcDNAをプラスミドにクローニングし、次に軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列のシーケンス解析を実施した。

[0181] 決定されたLN22R8抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号7に示し、アミノ酸配列を配列番号8に示す。LN22R8抗体の軽鎖可変領域のCDRL1、CDRL2及びCDRL3を、それぞれ、配列番号11、12及び13に示す。

[0182] 1) - 11-1-3 5' - RACE PCRによるLN22R8抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAの増幅と配列の決定

重鎖可変領域をコードするcDNAの増幅は、実施例1) - 11-1-1で調製したtotal RNAの約1 µgとSMARTer RACE 5' / 3' Kit (Clontech社)を用いて実施した。LN22R8

抗体の重鎖遺伝子の可変領域をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE 5' / 3' Kit に付属)、及び公知のマウス重鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

[0183] 5' - RACE PCRで増幅した重鎖の可変領域をコードするcDNAをプラスミドにクローニングし、次に重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列のシーケンス解析を実施した。

[0184] 決定されたLN22R8抗体の重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号9に示し、アミノ酸配列を配列番号10に示す。LN22R8抗体の重鎖可変領域のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を、それぞれ、配列番号14、15及び16に示す。

[0185] 1) - 11-2 2P10F2抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

実施例1) - 11-1と同様の方法で実施した。ただし、軽鎖遺伝子の可変領域をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE 5' / 3' Kit に付属)、及び公知のラット軽鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用い、重鎖遺伝子の可変領域をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE 5' / 3' Kit に付属)、及び公知のラット重鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

[0186] 決定された2P10F2抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号17に示し、アミノ酸配列を配列番号18に示す。2P10F2抗体の軽鎖可変領域のCDRL1、CDRL2及びCDRL3を、それぞれ、配列番号21、22及び23に示す。重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号19に示し、アミノ酸配列を配列番号20に示す。2P10F2抗体の重鎖可変領域のCDRH1、C

DRH2及びCDRH3を、それぞれ、配列番号24、25及び26に示す。

[0187] 1) - 12 LN22R8のヒトキメラ抗体発現ベクターの作製

1) - 12-1 ヒトキメラ及びヒト化軽鎖発現ベクターpCMA-LKの構築

プラスミドpcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen社)を制限酵素XbaI及びPmeIで消化して得られる約5.4kbのフラグメントと、配列番号27に示すヒト軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片をIn-Fusion HD PCRクローニングキット (Clontech社)を用いて結合して、pcDNA3.3/LKを作製した。

[0188] pcDNA3.3/LKからネオマイシン発現ユニットを除去することによりpCMA-LKを構築した。

[0189] 1) - 12-2 ヒトキメラ及びヒト化IgG1タイプ重鎖発現ベクターpCMA-G1の構築

pCMA-LKをXbaI及びPmeIで消化して軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域を取り除いたDNA断片と、配列番号28で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片をIn-Fusion HD PCRクローニングキット (Clontech社)を用いて結合して、pCMA-G1を構築した。

[0190] 1) - 12-3 ヒトキメラ及びヒト化IgG2タイプ重鎖発現ベクターpCMA-G2の構築

配列番号29で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG2定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片をもちいて、実施例1) - 12-2と同様の方法でpCMA-G2を構築した。

[0191] 1) - 12-4 ヒトキメラLN22R8の軽鎖発現ベクターの構築

実施例1) - 11-1-2で得られたLN22R8の軽鎖の可変領域をコ

ードするcDNAをテンプレートとして、In-fusionクローニング用に設計したプライマーでPCRを行うことにより軽鎖の可変領域をコードするcDNAを含むDNA断片を増幅した。pCMA-LKを制限酵素BsiWIで切断した箇所に、In-Fusion HD PCRクローニングキット(Clontech社)を用いて、増幅したDNA断片を挿入することによりヒトキメラLN22R8の軽鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラLN22R8の軽鎖のヌクレオチド配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号30及び配列番号31にそれぞれ示す。

[0192] 1) -12-5 ヒトキメラLN22R8のIgG1タイプ重鎖発現ベクターの構築

1) -11-1-3で得られたLN22R8重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとして、In-fusionクローニング用に設計したプライマーでPCRを行うことにより重鎖の可変領域をコードするcDNAを含むDNA断片を増幅した。pCMA-G1を制限酵素BspIで切断した箇所に、In-Fusion HD PCRクローニングキット(Clontech社)を用いて、増幅したDNA断片を挿入することによりヒトキメラLN22R8のIgG1タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラLN22R8のIgG1タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号32及び配列番号33にそれぞれ示す。

[0193] 1) -12-6 ヒトキメラLN22R8のIgG2タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例1) -11-1-3で得られたLN22R8重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとして、In-fusionクローニング用に設計したプライマーでPCRを行うことにより重鎖の可変領域をコードするcDNAを含むDNA断片を増幅した。pCMA-G2を制限酵素BspIで切断した箇所に、In-Fusion HD PCRクローニングキット(Clontech社)を用いて、増幅したDNA断片を挿入することによりヒトキメラLN22R8のIgG2タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

。ヒトキメラLN22R8のIgG2タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号34及び配列番号35にそれぞれ示す。

[0194] 1) -12-7 ヒトキメラLN22R8のIgG4Pタイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号36に示すヒトキメラLN22R8のIgG4Pタイプ重鎖のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した(GENEART社)。合成したDNA断片をもちいて、実施例1)-12-2と同様の方法でヒトキメラLN22R8のIgG4Pタイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラLN22R8のIgG4Pタイプ重鎖のアミノ酸配列を配列番号37に示す。

[0195] 1) -13 2P10F2のヒトキメラ抗体発現ベクターの作製

1) -13-1 ヒトキメラ及びヒト化IgG1LALAタイプ重鎖発現ベクターpCMA-G1LALAの構築

配列番号38で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1LALA定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片をもちいて、実施例1)-12-2と同様の方法でpCMA-G1LALAを構築した。

[0196] 1) -13-2 ヒトキメラ及びヒト化IgG4Pタイプ重鎖発現ベクターpCMA-G4Pの構築

配列番号39で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG4P定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片をもちいて、実施例1)-12-2と同様の方法でpCMA-G4Pを構築した。

[0197] 1) -13-3 ヒトキメラ2P10F2の軽鎖発現ベクターの構築

実施例1)-11-2で得られた2P10F2の軽鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1)-12-4と同様の方法でヒトキメラ2P10F2の軽鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ2P10F2の軽鎖のヌクレオチド配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号40及び配列番号41にそれぞれ示す。

[0198] 1) -13-4 ヒトキメラ2P10F2のIgG1LALAタイプ重鎖

発現ベクターの構築

実施例 1) - 11 - 2 で得られた 2 P 1 0 F 2 の重鎖の可変領域をコードする c D N A をテンプレートとしてもちいて、In-fusion クローニング用に設計したプライマーで P C R を行うことにより重鎖の可変領域をコードする c D N A を含む DNA 断片を増幅した。p C M A - G 1 L A L A を制限酵素 B l p l で切断した箇所に、In-Fusion HD PCR クローニングキット (C l o n t e c h 社) を用いて、増幅した DNA 断片を挿入することによりヒトキメラ 2 P 1 0 F 2 の I g G 1 L A L A タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ 2 P 1 0 F 2 の I g G 1 L A L A タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号 4 2 及び配列番号 4 3 にそれぞれ示す。

[0199] 1) - 13 - 5 ヒトキメラ 2 P 1 0 F 2 の I g G 2 タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例 1) - 11 - 2 で得られた 2 P 1 0 F 2 の重鎖の可変領域をコードする c D N A をテンプレートとしてもちいて、実施例 1) - 12 - 6 と同様の方法でヒトキメラ 2 P 1 0 F 2 の I g G 2 タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ 2 P 1 0 F 2 の I g G 2 タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号 4 4 及び配列番号 4 5 にそれぞれ示す。

[0200] 1) - 13 - 6 ヒトキメラ 2 P 1 0 F 2 の I g G 4 P タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例 1) - 11 - 2 で得られた 2 P 1 0 F 2 の重鎖の可変領域をコードする c D N A をテンプレートとしてもちいて、In-fusion クローニング用に設計したプライマーで P C R を行うことにより重鎖の可変領域をコードする c D N A を含む DNA 断片を増幅した。p C M A - G 4 P を制限酵素 B l p l で切断した箇所に、In-Fusion HD PCR クローニングキット (C l o n t e c h 社) を用いて、増幅した DNA 断片を挿入することによりヒトキメラ 2 P 1 0 F 2 の I g G 4 P タイプ重鎖発現ベクター

を構築した。ヒトキメラ2P10F2のIgG4Pタイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号46及び配列番号47にそれぞれ示す。

- [0201] 1) -14 LN22R8、2P10F2のヒトキメラ抗体の生産と調製
- 1) -14-1 LN22R8、2P10F2のヒトキメラ抗体の生産
- FreeStyle 293F細胞 (Invitrogen社) はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の 1.2×10^9 個のFreeStyle 293F細胞 (Invitrogen社) を3L Fernbach Erlenmeyer Flask (CORNING社) に播種し、FreeStyle293 expression medium (Invitrogen社) で希釈して 2.0×10^6 細胞/mLに調製した。40mLのOpti-Pro SFM培地 (Invitrogen社) に0.24mgの重鎖発現ベクターと0.36mgの軽鎖発現ベクターと1.8mgのPolyethyleneimine (Polyscience #24765) を加えて穏やかに攪拌し、さらに5分間放置した後にFreeStyle 293F細胞に添加した。37℃、8%CO₂インキュベーターで4時間、90rpmで振とう培養後に600mLのEX-CELL VPRO培地 (SAFC Biosciences社)、18mLのGlutamax 1 (GIBCO社)、及び30mLのYeastolate Ultrafiltrate (GIBCO社) を添加し、37℃、8%CO₂インキュベーターで7日間、90rpmで振とう培養して得られた培養上清をDisposable Capsule Filter (Advantec #CCS-045-E1H) でろ過した。
- [0202] ヒトキメラLN22R8のIgG1タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラLN22R8の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したLN22R8のヒトキメラ抗体を「LN22R8chIgG1」と命名した。ヒトキメラLN22R8のIgG2タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラLN22R8の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したLN22R8のヒトキメラ抗体を「

LN22R8chIgG2」と命名した。ヒトキメラLN22R8のIgG4Pタイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラLN22R8の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したLN22R8のヒトキメラ抗体を「LN22R8chIgG4P」と命名した。ヒトキメラ2P10F2のIgG1LALAタイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ2P10F2の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したL2P10F2のヒトキメラ抗体を「2P10F2chIgG1LALA」と命名した。ヒトキメラ2P10F2のIgG2タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ2P10F2の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したL2P10F2のヒトキメラ抗体を「2P10F2chIgG2」と命名した。ヒトキメラ2P10F2のIgG4Pタイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ2P10F2の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したL2P10F2のヒトキメラ抗体を「2P10F2chIgG4P」と命名した。

- [0203] 1) -14-2 LN22R8、2P10F2のヒトキメラ抗体の精製
実施例1) -14-1で得られた培養上清から抗体をrProtein Aアフィニティークロマトグラフィーの1段階工程で精製した。培養上清をPBSで平衡化したMabSelectSuReが充填されたカラム（GE Healthcare Bioscience社製）にアプライしたのちに、カラム容量の2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2M アルギニン塩酸塩溶液（pH4.0）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette）によりHBSor（25mM ヒスチジン／5% ソルビトール、pH6.0）へのバッファー置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20（分画分子量UF10K, Sartorius社）で抗体を濃縮し、IgG濃度を1 mg/mL以上に調製した。最後にMinisart-Plus filter（Sartorius社）でろ過し、精製サンプルとした。

[0204] 1) - 15 ヒトキメラ抗体のADCC活性

ヒトキメラ抗体のADCC活性について、エフェクター細胞としてヒトの末梢血単核球 (PBMC)、ADCC標的細胞としてヒト膵臓株MIA PaCa-2を用いて評価した。放射線同位体 ^{51}Cr で標識したMIA PaCa-2細胞とマウス抗体 (LN22R8)、ラット抗体 (2P10F2)、又は、ヒトキメラ抗体 (LN22R8chIgG1、LN22R8chIgG2、LN22R8chIgG4P、2P10F2chIgG1LALA、2P10F2chIgG4P) を0.5又は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 4°C 30分間処理した後、ヒトの末梢血から分離したPBMCをMIA PaCa-2細胞の20倍の割合で加え、4時間、 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。上清中に放出された ^{51}Cr をTopCount NXT v2.53を用いて測定しTotal release値を得た。 ^{51}Cr で標識したMIA PaCa-2細胞をTriton-100で処理して放出された ^{51}Cr の測定値をMaximum release値、PBMCを加えない抗体処理細胞から処理して放出された ^{51}Cr の測定値をSpontaneous release値として、下記の式から、% specific releaseを算出し、図6にまとめた。陰性対照サンプルとして、ヒトIgG (hIgG, ChromPure Human IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories社, Cat. 009-000-003) を処理したサンプルについて同様に測定を実施し、併せて示した。測定は3重に実施し、平均値、標準偏差を算出して併せて示した。

[0205]
$$\% \text{ specific release} = (\text{Total release} - \text{Spontaneous release}) / \text{Maximum release}$$

ヒトIgG (hIgG) とLN22R8のマウス抗体は、ADCC活性を示さなかったのに対し、LN22R8chIgG1は $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で17.4%、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で18.1%とADCC活性を示した。LN22R

8chIgG2、LN22R8chIgG4PのADCC活性は、LN22R8chIgG1より低く、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ でもそれぞれ3.0%、2.2%であった。

[0206] 2P10F2ラット抗体は、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で4.8%、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で8.4%とADCC活性を示した。2P10F2chIgG1LALAは、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で4.7%、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で2.9%とADCC活性を示した。2P10F2chIgG4Pは、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で3.4%、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で1.1%と2P10F2ラット抗体、2P10F2chIgG1LALAより低いADCC活性を示した。文献(Bruggemann et al., J. Exp. Med., 1351-1361, 1987)報告通り、IgG1サブタイプを利用したヒトキメラ抗体がもっとも高いADCC活性を示した。

[0207] 1) -16 ヒトキメラ抗体のCDC活性

抗ヒトCD147抗体による補体依存的な殺細胞活性(CDC活性)を標的細胞としてヒト膵臓株MIA PaCa-2を用いて評価した。補体として市販のウサギ補体(Low Tox-M Rabbit Complement, CEDARLANE LABORATORIES LIMITED, Cat. CL3051)を用いた。抗ヒトCD147抗体として、マウス抗体(LN22R8)、ラット抗体(2P10F2)、又は、ヒトキメラ抗体(LN22R8chIgG1、LN22R8chIgG2、LN22R8chIgG4P、2P10F2chIgG1LALA、2P10F2chIgG4P)を用いた。CDC活性陰性の対照抗体としてヒトIgG(hIgG, ChromPure Human IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories社, Cat. 009-000-003)を用いた。上記抗体を0、0.1、1又は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で1時間、4℃で処理した後、ウサギ補体を終濃度7.5%となるように添加し、37℃、5%CO₂存在下で、3時間加温後、生細胞に含まれる細胞内ATPをCellTiter-Glo Luminescent

Cell Viability Assay (Promega社, Cat. G7572) を用いて測定した。CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて得られる発光シグナルについて、EnVision 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer社) を用いて定量した。測定は3重に実施し、平均値と標準偏差を算出した。無処理の細胞から得られた発光シグナルを100%として、抗体と補体依存的に減少した発光シグナルをCDC活性として、図7にまとめた。

[0208] マウス抗体 (LN22R8)、ラット抗体 (2P10F2) でのみ、陰性対照のhIgGに対して濃度依存的なCDC活性が観察され、LN22R8では $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で最大41.1%まで生細胞が低下した。2P10F2では、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で最大53.5%まで生細胞が低下した。

[0209] ヒトキメラ抗体 (LN22R8chIgG1、LN22R8chIgG2、LN22R8chIgG4P、2P10F2chIgG1LALA、2P10F2chIgG4P) では、陰性対照のhIgGに対して明確なCDC活性は観察されなかった。

[0210] 1) -17 ヒトキメラ抗体のADCP活性

ヒトIgG抗体はマウスのFc γ 受容体との相互作用を介して、抗体依存的な単球、マクロファージによる貪食作用 (ADCP) を誘導することで、癌細胞への殺細胞活性を示すことが報告されている (Overdijk et al., Journal of Immunology, 1-9, 2012)。ヒトキメラ抗体のADCP活性について、エフェクター細胞としてRAW264.7 (ATCC, TIB-71)、ADCP標的細胞としてヒト膵臓株PANC-1又はMIA PaCa-2を用いて評価した。PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling (SIGMA, Cat. MINI67-1KIT) で標識したADCP標的細胞とヒトキメラ抗体 (LN22R8chIgG1、LN

22R8chIgG2、LN22R8chIgG4P)を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 4°C 、1時間処理した後、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Lit for General Cell Membrane Labeling (SIGMA, Cat. PKH26GL-1KT)で標識したRAW264.7細胞をADCP標的細胞の5倍添加し、3時間、 37°C 、5% CO_2 存在下で加温した。フローサイトメーター (BD社、Cantoll)を用いて、貪食作用によりPKH26シグナル陽性に移行したPKH26陽性細胞の割合を測定した。陰性対照サンプルとして、ヒトIgG (hIgG, ChromPure Human IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories社, Cat. 009-000-003)を処理したサンプルについて同様に測定を実施した。測定は3重に実施し、平均値、標準偏差を算出して図8(a) PANC-1の結果を、図8(b) MIA PaCa-2の結果をそれぞれ示した。

[0211] PANC-1細胞をADCPの標的とした場合、LN22R8chIgG1は9.2%、LN22R8chIgG4Pは9.0%とヒトIgG (5.5%)に対して、高いADCP活性を示した。LN22R8chIgG2は、5.9%であり、ADCP活性陰性であった。

[0212] MIA PaCa-2細胞をADCPの標的とした場合も、同様の傾向を示し、LN22R8chIgG1は6.6%、LN22R8chIgG4Pは6.1%とヒトIgG (3.6%)に対して、高いADCP活性を示した。LN22R8chIgG2は、3.6%であり、ADCP活性陰性であった。

[0213] 1) -18 ヒトキメラ抗体のin vivo抗腫瘍活性測定

5×10^6 細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50% GFR-Matrigel (Corning社、Cat. 354230)を含むPBSで懸濁し、4~5週齢雌のNOD-scidマウス (NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本チャールス・リバーより購入)の腋窩部皮下に

移植した。腫瘍体積をもとに移植の5～7日後に群分けを実施し、抗ヒトCD147抗体LN22R8のマウス抗体(LN22R8)、ヒトキメラ抗体3種(LN22R8chIgG1、LN22R8chIgG2、LN22R8chIgG4P)を1mg/kg、3mg/kg、10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5)。抗ヒトCD147抗体2P10F2のラット抗体(2P10F2)、ヒトキメラ抗体2種(2P10F2chIgG2、2P10F2chIgG4P)を10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5～6)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0214] 腫瘍体積(mm³) = 1/2 × 短径(mm) × 短径(mm) × 長径(mm)

結果を図9-1(a)～(d)、図9-2(e)～(g)に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

[0215] LN22R8は、マウス抗体、3種のヒトキメラ抗体も用量依存的な抗腫瘍効果を示した。ヒトキメラ抗体LN22R8chIgG4P 10mg/kg投与群では、移植後18日後に5匹中5匹のマウスで腫瘍の完全縮退が観察され、実験終了時の移植後41日後でも腫瘍の再増殖は見られなかった。他のLN22R8抗体投与群では、一部あるいはすべてのマウスで腫瘍の再増殖が観察された。

[0216] 2P10F2は、ラット抗体、2種のヒトキメラ抗体で抗腫瘍効果が確認された。2P10F2chIgG4P 10mg/kg投与群では、移植21日後に6匹中6匹のマウスで腫瘍の完全縮退が観察された。

[0217] 同じエピトープ部分を認識する抗ヒトCD147抗体であるマウス抗体LN22R8とラット抗体2P10F2は、ADCC活性、ADCP、CDC活性といったマウス免疫系に依存したエフェクター機能を有するヒトキメラ抗体chIgG1やADCP活性を有するヒトキメラ抗体chIgG4Pだけでなく、いずれのエフェクター機能もほとんど示さないヒトキメラ抗体c

hlgG2でも90%以上の抗腫瘍効果が保持されていることから、マウスの免疫に依存せず、CD147に作用する新規の作用機序によって抗腫瘍効果を示していることが示唆された。

[0218] 1) - 19 NOGマウスでのCD147ヒトキメラ抗体の抗腫瘍効果

NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ null) マウスでは、マウスT細胞、B細胞を欠失しているNOD-scidマウスにサイトカインレセプター共通ドメインであるIL-2レセプター γ 鎖ノックアウトを掛け合わせることで、マウスT、B細胞に加え、NK細胞、補体活性を欠失しており、マクロファージや樹上細胞の機能低下がみられ、極めて重度な免疫不全状態にある (Ito, Blood, 3175-3182, 2002)。これらマウス免疫系の重度な不全状態で、CD147抗体の抗腫瘍効果が影響を受けるかMIA PaCa-2の皮下移植モデルで検証した。

[0219] 5×10^6 細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50%GFR-Matrigel (Corning社、Cat. 354230)を含むPBSで懸濁し、7週齢雌のNOGマウス (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic, In-Vivo Science社より購入) の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植の6日後に群分けを実施し、抗CD147ヒトキメラ抗体 (LN22R8chlgG4P) を10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した (n=5)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス (株式会社ミットヨ製) を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0220] 腫瘍体積 (mm³) = $1/2 \times$ 短径 (mm) $\times$ 短径 (mm) $\times$ 長径 (mm)

結果を図10に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

[0221] 図10に示したヒトキメラ抗体LN22R8chlgG4Pの結果は、移植17日後における腫瘍増殖抑制率は、10mg/kg投与群で99%であり、5匹中3匹のマウスで腫瘍の完全縮退が観察された。

[0222] 抗CD147ヒトキメラ抗体(LN22R8chlgG4P)は、マウスT、B細胞に加え、NK細胞、補体活性を欠失したNOGマウスに形成させた脾臓癌腫瘍に対しても、強い抗腫瘍効果を示したことから、マウスの免疫細胞に依存せずに抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

[0223] (実施例2) CD147蛋白の免疫によるサル交差性ラット抗体の作製
実施例1で得られた強い抗腫瘍効果を示す抗ヒトCD147抗体は、マウス、ラット、カニクイザルのCD147に交差性を示さなかった。実施例1で得られた抗体を用いてカニクイザルCD147交差性を示すCD147抗体の取得を試みた。

[0224] 2) - 1 免疫

免疫にはWKY/Imzマウスの雌(日本エスエルシー社)を使用した。
Recombinant Human BSG, His tagged (CREATIVE BIOMART社製)抗原蛋白とFreund's Complete Adjuvant(和光純薬社製)を混合したものを尾根部に投与したラットのリンパ節及び脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

[0225] 2) - 2 ハイブリドーマの作製

リンパ節細胞若しくは脾臓細胞とマウスミエローマSP2/O-ag14細胞(ATCC, No. CRL-1581)とをLF301 Cell Fusion Unit(BEX社)を用いて電気細胞融合し、Clona Cell-HY Selection Medium D(StemCell Technologies社)に希釈して培養した。出現したハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローンハイブリドーマを作製した。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清を用いて抗CD147抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

[0226] 2) - 3 フローサイトメトリー法による抗体スクリーニング

ヒト癌細胞に結合し、ヒトCD147、カニクイザルCD147への結合

性を示す抗体産生ハイブリドーマを選択するためにフローサイトメーターを用いた抗体結合性スクリーニングを実施した。ヒト癌細胞として、CD147陽性のヒト膵臓株MIA PaCa-2を用いた。実施例1) - 8と同様にヒト、又は、カニクイザルのCD147を発現したCHO-K1細胞(CHO-K1-hCD147v2、CHO-K1-cynoCD147)をヒト、又はカニクイザルCD147への結合性確認に用いた。MIA PaCa-2、CHO-K1-hCD147v2、CHO-K1-cynoCD147の懸濁液にハイブリドーマ培養上清を等量添加し、4℃で1時間以上反応させた後、5%FBSを含むPBSで細胞を洗浄し、抗ラットIgG-PE(BD Biosciences社、Cat. 550767)を用いて各抗体の細胞への結合を蛍光検出可能にした。フローサイトメーター(Cantoll、BD Bioscience社)を用いて細胞の蛍光シグナルの測定を実施し、陰性対照サンプル(ハイブリドーマ培養液を加えていない細胞)に対する蛍光シグナルの比を算出し、表2に結果の一部をまとめた。

[0227] 市販のラット抗体Isotypingキット(Bio-Rad Laboratories社、RMT1)を用いて、培養上清に含まれる抗体のIsotypeを決定し併せて、表4に示した。

[0228] 実施例1で取得した2P10F2はMIA PaCa-2、CHO-K1-hCD147v2に結合性を示し、CHO-K1-cynoCD147には結合性を示さなかった。rat__CD147__#84(本明細書中、r#84と表記する場合もある)、rat__CD147__#131(本明細書中、r#131と表記する場合もある)、rat__CD147__#110(本明細書中、r#110と表記する場合もある)、rat__CD147__#101(本明細書中、r#101と表記する場合もある)は、MIA PaCa-2、CHO-K1-hCD147v2、CHO-K1-cynoCD147に結合性を示し、カニクイザル交差性を示す抗ヒトCD147ラット抗体が取得できた。

[0229]

[表4]

クローンID	アイソタイプ	MIA PaCa-2	CHO-K1- hCD147 v2	CHO-K1- cyno CD147
2P10F2	ラット IgG2b/ κ	17.3	33.0	0.0
r#84	ラット IgG2b/ κ	9.1	9.9	19.0
r#131	ラット IgG1/ κ	4.3	7.8	7.3
r#110	ラット IgG1/ κ	2.7	4.9	4.6
r#101	ラット IgG2a/ κ	10.2	23.1	8.8

[0230] 2) -4 低IgG血清を用いたラットモノクローナル抗体の調製

カニクイザル交差性を示す抗ヒトCD147モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養上清から精製した。まず、rat_CD147_#131の抗体産生ハイブリドーマをClonaCell-HY Selection Medium Eで十分量まで増殖させた後、Ultra Low IgG FBS (Life Technologies社) を20%添加したHybridoma SFM (Life Technologies社) に培地交換し、7日間培養した。本培養上清を回収し0.45 μ mのフィルターを通して滅菌した。

[0231] 2) -5 高密度培養によるラットモノクローナル抗体の調製

CL-1000フラスコ (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて、rat_CD147_#84、rat_CD147_#101、rat_CD147_#110ハイブリドーマを培養し、モノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清を調製した。

[0232] 2) -6 モノクローナル抗体の精製

実施例2) -4 及び実施例2) -5 で作製した培養上清から実施例1) -6 と同様の方法で抗体を精製した。

[0233] 2) -7 in vivo 抗腫瘍活性測定による抗体スクリーニング

5×10^6 細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50%GFR-Matrigel (Corning社、Cat. 354230) を含むPBSで懸濁し、5週齢雌のNOD-scidマウス (NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本チャールス・リバーより購入) の腋窩部皮下に移

植した。腫瘍体積をもとに移植の6～8日後に群分けを実施し、カニクイザル交差性抗CD147ラット抗体#84、#101又は#110を移植後、8日後、15日後に10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5)。対照群のマウスには、PBSを同様に腹腔内に投与した。カニクイザル交差性抗CD147ラット抗体#131を移植後、6日後に10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0234] 腫瘍体積(mm³) = 1/2 × 短径(mm) × 短径(mm) × 長径(mm)

結果を図11(a)～(d)に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。r#84は、移植28日後における腫瘍増殖抑制率が、10mg/kg投与群で95%であった(図11(a))。r#101は、移植15日後における腫瘍増殖抑制率が10mg/kg投与群で37%であったが、移植28日後には腫瘍の再増殖が見られた(図11(b))。r#110は、移植15日後における腫瘍増殖抑制率が10mg/kg投与群で51%であったが、移植28日後には腫瘍の再増殖が見られた(図11(c))。r#131は、移植16日後における腫瘍増殖抑制率は、10mg/kg投与群で50%であった(図11(d))。M1A PaCa-2の腫瘍増殖を強く阻害するラット抗体、r#84、部分的な阻害をするr#101、r#110、r#131が得られた。

[0235] 結果を図11(a)～(d)に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。r#84は、移植28日後における腫瘍増殖抑制率が10mg/kg投与群で95%であった(図11(a))。r#101は、移植15日後における腫瘍増殖抑制率が10mg/kg投与群で37%であったが、移植28日後には腫瘍の再増殖が見られた(図11(b))。r#110は、移植15日後における腫瘍増殖抑制率が10mg/kg投与群で51%であったが、移植28日後には腫瘍の再増殖が見

られた（図11（c））。r#131は、移植16日後における腫瘍増殖抑制率が10mg/kg投与群で50%であった（図11（d））。

[0236] 2) -8 エピトープ解析：2P10F2-competitive ELISA

サル交差性ラットCD147抗体のエピトープ解析を目的として、2P10F2 chlgG4PのCD147リコンビナント蛋白質への結合性を阻害するか競合ELISAにより調べた。ヒトCD147-Fc融合蛋白質（Sino Biological Inc., 10186-H02H）をPBSで溶解し、20μg/mlに調製し、96ウェルプレート（Thermo fisher社, Cat. 43454）に50μl加え4℃で保管した。蛋白溶液を除き、300μlの1%BSA含有PBSを加えて、室温で1時間加温した。1%BSA含有PBSで希釈した25μlの20あるいは60μg/mlのCD147ラット抗体r#84、r#101、r#110、r#131又は2P10F2、又は1%BSA含有PBSを競合抗体として96ウェルプレートに加え、室温で2時間加温した。1%BSA含有PBSで希釈した20ng/mlの2P10F2 chlgG4Pを25μl、96ウェルプレートに加え、室温で2時間加温した。0.05% Tween 20（BIO RAD, Cat. 170-6531）を含むPBSで2回、96ウェルを洗浄した。1%BSA含有PBSで2000倍に希釈したMouse monoclonal HP6025 Anti-Human IgG4 Fc（HRP）（abcam社, Cat. ab99823）を50μl、96ウェルプレートに加え、室温で1時間加温した。0.05% Tween 20（BIO RAD, Cat. 170-6531）を含むPBSで3回、96ウェルを洗浄した。50μlのSuper Aqua Blue ELISA Substrate（eBioscience社, 00-4203-58）を96ウェルプレートに加え、室温で20分間加温した。EnVision 2104 Multilabel Reader（Perkin Elmer社）で、96ウェルプレートの405nmの

吸光度を測定した。競合抗体を含まないウェルでの測定値を対照として、競合抗体によって低下した吸光度を%で算出し図12に示した。測定は3ウェルで実施し、平均値を示した。

[0237] r#84、r#101、r#131は、2P10F2ラット抗体と同様に2P10F2chlgG4Pの結合性を90%以上阻害し、抗体認識部位が、2P10F2と近いことが示唆された。r#110は、2P10F2ラット抗体の結合を阻害しなかった。抗体認識部位は、2P10F2と離れているか、あるいは結合性が弱いために、2P10F2ラット抗体の結合を阻害できない可能性が考えられた。

[0238] (実施例3) サル交差性ラット抗体のクローニングとヒトキメラ抗体の作製

3) -1 ラット抗CD147抗体の可変領域をコードするcDNAのクローニングヌクレオチド配列の決定

3) -1-1 rat__CD147__#84抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

実施例1) -11-2と同様の方法で実施した。決定されたrat__CD147__#84抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号48に示し、アミノ酸配列を配列番号49に示す。重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号50に示し、アミノ酸配列を配列番号51に示す。rat__CD147__#84抗体の軽鎖可変領域のCDRL1、CDRL2及びCDRL3を、それぞれ、配列番号52、53及び54に示す。rat__CD147__#84抗体の重鎖可変領域のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を、それぞれ、配列番号55、56及び57に示す。

[0239] 3) -1-2 rat__CD147__#101抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

実施例1) -11-2と同様の方法で実施した。決定されたrat__CD147__#101抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号58に示し、アミノ酸配列を配列番号59に示す。重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号60に示し、アミノ酸配列を配列番号61に示す。rat__CD147__#101抗体の軽鎖可変領域のCDRL1、CDRL2及びCDRL3を、それぞれ、配列番号62、63及び64に示す。rat__CD147__#101抗体の重鎖可変領域のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を、それぞれ、配列番号65、66及び67に示す。

ド配列を配列番号58に示し、アミノ酸配列を配列番号59に示す。重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号60に示し、アミノ酸配列を配列番号61に示す。rat_CD147_#101抗体の軽鎖可変領域のCDRL1、CDRL2及びCDRL3を、それぞれ、配列番号62、63及び64に示す。rat_CD147_#101抗体の重鎖可変領域のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を、それぞれ、配列番号65、66及び67に示す。

[0240] 3) -1-3 rat_CD147_#110抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

実施例1) -11-2と同様の方法で実施した。決定されたrat_CD147_#110抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号68に示し、アミノ酸配列を配列番号69に示す。重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号70に示し、アミノ酸配列を配列番号71に示す。rat_CD147_#110抗体の軽鎖可変領域のCDRL1、CDRL2及びCDRL3を、それぞれ、配列番号72、73及び74に示す。rat_CD147_#110抗体の重鎖可変領域のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を、それぞれ、配列番号75、76及び77に示す。

[0241] 3) -1-4 rat_CD147_#131抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

実施例1) -11-2と同様の方法で実施した。決定されたrat_CD147_#131抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号78に示し、アミノ酸配列を配列番号79に示す。重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号80に示し、アミノ酸配列を配列番号81に示す。rat_CD147_#131抗体の軽鎖可変領域のCDRL1、CDRL2及びCDRL3を、それぞれ、配列番号82、83及び84に示す。rat_CD147_#131抗体の重鎖可変領域のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を、それぞれ、配列番号

85、86及び87に示す。

[0242] 3) - 2 ヒトキメラ抗体発現ベクターの作製

3) - 2 - 1 r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 のヒトキメラ抗体発現ベクターの作製

3) - 2 - 1 - 1 ヒトキメラ及びヒト化 I g G 4 P F A L A タイプ重鎖発現ベクター p C M A - G 4 P F A L A の構築

配列番号88で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒト I g G 4 P F A L A 定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片をもちいて、実施例1) - 12 - 2と同様の方法で p C M A - G 4 P F A L A を構築した。

[0243] 3) - 2 - 1 - 2 ヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の軽鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 1で得られた r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の軽鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1) - 12 - 4と同様の方法でヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の軽鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の軽鎖のヌクレオチド配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号89及び配列番号90にそれぞれ示す。

[0244] 3) - 2 - 1 - 3 ヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の I g G 1 タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 1で得られた r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1) - 12 - 5と同様の方法でヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の I g G 1 タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の I g G 1 タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号91及び配列番号92にそれぞれ示す。

[0245] 3) - 2 - 1 - 4 ヒトキメラ r a t _ C D 1 4 7 _ # 8 4 の I g G 2 タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 1 で得られた *rat*_CD147_#84 の重鎖の可変領域をコードする cDNA をテンプレートとしてもちいて、実施例1) - 12 - 6 と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG2 タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG2 タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号93 及び配列番号94 にそれぞれ示す。

[0246] 3) - 2 - 1 - 5 ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG4 P タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 1 で得られた *rat*_CD147_#84 の重鎖の可変領域をコードする cDNA をテンプレートとしてもちいて、実施例1) - 13 - 6 と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG4 P タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG4 P タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号95 及び配列番号96 にそれぞれ示す。

[0247] 3) - 2 - 1 - 6 ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG1 L A L A タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 1 で得られた *rat*_CD147_#84 の重鎖の可変領域をコードする cDNA をテンプレートとしてもちいて、実施例1) - 13 - 4 と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG1 L A L A タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG1 L A L A タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号97 及び配列番号98 にそれぞれ示す。

[0248] 3) - 2 - 1 - 7 ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG4 P F A L A タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 1 で得られた *rat*_CD147_#84 の重鎖の可変領域をコードする cDNA をテンプレートとしてもちいて、*Infusion* クローニング用に設計したプライマーで PCR を行うことにより重鎖の可変領域をコードする cDNA を含む DNA 断片を増幅した。pCMA-G

4PFALAを制限酵素B₁p₁で切断した箇所に、In-Fusion HD PCRクローニングキット（Clontech社）を用いて、増幅したDNA断片を挿入することによりヒトキメラrat_CD147_#84のIgG4PFALAタイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラrat_CD147_#84のIgG4PFALAタイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号99及び配列番号100にそれぞれ示す。

[0249] 3) - 2 - 2 rat_CD147_#101のヒトキメラ抗体発現ベクターの作製

3) - 2 - 2 - 1 ヒトキメラrat_CD147_#101の軽鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 2で得られたrat_CD147_#101の軽鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1) - 12 - 4と同様の方法でヒトキメラrat_CD147_#101の軽鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラrat_CD147_#101の軽鎖のヌクレオチド配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号101及び配列番号102にそれぞれ示す。

[0250] 3) - 2 - 2 - 2 ヒトキメラrat_CD147_#101のIgG2タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 2で得られたrat_CD147_#101の重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1) - 12 - 6と同様の方法でヒトキメラrat_CD147_#101のIgG2タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラrat_CD147_#101のIgG2タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号103及び配列番号104にそれぞれ示す。

[0251] 3) - 2 - 2 - 3 ヒトキメラrat_CD147_#101のIgG4Pタイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) - 1 - 2で得られたrat_CD147_#101の重鎖の可

変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1)－13－6と同様の方法でヒトキメラrat__CD147__#101のIgG4Pタイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラrat__CD147__#101のIgG4Pタイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号105及び配列番号106にそれぞれ示す。

[0252] 3)－2－2－4 ヒトキメラrat__CD147__#101のIgG4PFALAタイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3)－1－2で得られたrat__CD147__#101の重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例3)－2－1－7と同様の方法でヒトキメラrat__CD147__#101のIgG4PFALAタイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラrat__CD147__#101のIgG4PFALAタイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号107及び配列番号108にそれぞれ示す。

[0253] 3)－2－3 rat__CD147__#110のヒトキメラ抗体発現ベクターの作製

3)－2－3－1 ヒトキメラrat__CD147__#110の軽鎖発現ベクターの構築

実施例3)－1－3で得られたrat__CD147__#110の軽鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1)－12－4と同様の方法でヒトキメラrat__CD147__#110の軽鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラrat__CD147__#110の軽鎖のヌクレオチド配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号109及び配列番号110にそれぞれ示す。

[0254] 3)－2－3－2 ヒトキメラrat__CD147__#110のIgG2タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3)－1－3で得られたrat__CD147__#110の重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1)－

12-6と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 2タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 2タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号111及び配列番号112にそれぞれ示す。

[0255] 3)-2-3-3 ヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 4 Pタイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3)-1-3で得られた *rat*_CD147_#110の重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1)-13-6と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 4 Pタイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 4 Pタイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号113及び配列番号114にそれぞれ示す。

[0256] 3)-2-3-4 ヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 4 P F A L Aタイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3)-1-3で得られた *rat*_CD147_#110の重鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例3)-2-1-7と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 4 P F A L Aタイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#110のIgG 4 P F A L Aタイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号115及び配列番号116にそれぞれ示す。

[0257] 3)-2-4 *rat*_CD147_#131のヒトキメラ抗体発現ベクターの作製

3)-2-4-1 ヒトキメラ *rat*_CD147_#131の軽鎖発現ベクターの構築

実施例3)-1-4で得られた *rat*_CD147_#131の軽鎖の可変領域をコードするcDNAをテンプレートとしてもちいて、実施例1)-12-4と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#131の軽鎖発

現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#131 の軽鎖のヌクレオチド配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号117及び配列番号118にそれぞれ示す。

[0258] 3) -2-4-2 ヒトキメラ *rat*_CD147_#131 の IgG2 タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) -1-4 で得られた *rat*_CD147_#131 の重鎖の可変領域をコードする cDNA をテンプレートとしてもちいて、実施例1) -12-6 と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#131 の IgG2 タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#131 の IgG2 タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号119及び配列番号120にそれぞれ示す。

[0259] 3) -2-4-3 ヒトキメラ *rat*_CD147_#131 の IgG4 P タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例3) -1-4 で得られた *rat*_CD147_#131 の重鎖の可変領域をコードする cDNA をテンプレートとしてもちいて、実施例1) -13-6 と同様の方法でヒトキメラ *rat*_CD147_#131 の IgG4 P タイプ重鎖発現ベクターを構築した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#131 の IgG4 P タイプ重鎖のヌクレオチド配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列番号121及び配列番号122にそれぞれ示す。

[0260] 3) -3 ヒトキメラ抗体の調製

3) -3-1 サル交差性ラット抗体のヒトキメラ抗体の生産

実施例1) -14-1 と同様の方法で生産した。

[0261] ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG1 タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した *rat*_CD147_#84 のヒトキメラ抗体を「#84 ch IgG1」と命名した。ヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の IgG2 タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ *rat*_CD147_#84 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した *rat*_CD147_#84 のヒトキメ

ラ抗体を「#84 ch Ig G2」と命名した。ヒトキメラ rat__CD147__#84 の Ig G4 P タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#84 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した rat__CD147__#84 のヒトキメラ抗体を「#84 ch Ig G4 P」と命名した。ヒトキメラ rat__CD147__#84 の Ig G1 L A L A タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#84 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した rat__CD147__#84 のヒトキメラ抗体を「#84 ch Ig G1 L A L A」と命名した。ヒトキメラ rat__CD147__#84 の Ig G4 P F A L A タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#84 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した rat__CD147__#84 のヒトキメラ抗体を「#84 ch Ig G4 P F A L A」と命名した。

[0262] ヒトキメラ rat__CD147__#101 の Ig G2 タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#101 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した rat__CD147__#101 のヒトキメラ抗体を「#101 ch Ig G2」と命名した。ヒトキメラ rat__CD147__#101 の Ig G4 P タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#101 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した rat__CD147__#101 のヒトキメラ抗体を「#101 ch Ig G4 P」と命名した。ヒトキメラ rat__CD147__#101 の Ig G4 P F A L A タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#101 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した rat__CD147__#101 のヒトキメラ抗体を「#101 ch Ig G4 P F A L A」と命名した。

[0263] ヒトキメラ rat__CD147__#110 の Ig G2 タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#110 の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得した rat__CD147__#110 のヒトキメラ抗体を「#110 ch Ig G2」と命名した。ヒトキメラ rat__CD147__#110 の Ig G4 P タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラ rat__CD147__#

110の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したrat__CD147__#110のヒトキメラ抗体を「#110chlgG4P」と命名した。ヒトキメラrat__CD147__#110のlgG4PFALAタイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラrat__CD147__#110の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したrat__CD147__#110のヒトキメラ抗体を「#110chlgG4PFALA」と命名した。

[0264] ヒトキメラrat__CD147__#131のlgG2タイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラrat__CD147__#131の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したrat__CD147__#131のヒトキメラ抗体を「#131chlgG2」と命名した。ヒトキメラrat__CD147__#131のlgG4Pタイプ重鎖発現ベクターとヒトキメラrat__CD147__#131の軽鎖発現ベクターの組み合わせで取得したrat__CD147__#131のヒトキメラ抗体を「#131chlgG4P」と命名した。

[0265] 3) - 3 - 2 サル交差性ラット抗体のヒトキメラ抗体の精製
実施例3) - 3 - 1 で得られた培養上清から、実施例1) - 14 - 2 と同様の方法で精製した。

[0266] (実施例4) ヒトキメラ抗体のin vivo抗腫瘍活性
5×10⁶細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50%GFR-Matrigel (Corning社、Cat. 354230) を含むPBSで懸濁し、5～6週齢雌のNOD-scidマウス (NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本チャールス・リバーより購入) の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植の5～6日後に群分けを実施し、カニクイザル交差性抗CD147ヒトキメラ抗体 (#84chlgG1、#84chlgG1LALA、#84chlgG2、#84chlgG4P、#84chlgG4PFALA) を群分け後当日に1、3、又は10 mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した (n=5)。カニクイザル交差性抗CD147ヒトキメラ抗体 (#101chlgG2、#101chlgG4P、#101chlgG4PFALA、#110chlgG2、#110chlgG

4 P、# 1 1 0 c h l g G 4 P F A L A、# 1 3 1 c h l g G 2、# 1 3 1 c h l g G 4 P) を群分け後当日に3、又は10 mg / kg で担癌マウスの腹腔内に投与した (n = 5)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス (株式会社ミットヨ製) を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0267] 腫瘍体積 (mm³) = 1 / 2 × 短径 (mm) × 短径 (mm) × 長径 (mm)

結果を図13-1 (a) ~ (d)、図13-2 (e) ~ (h)、図13-3 (i) ~ (l)、図13-4 (m) 及び (n) に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

[0268] ヒトキメラ抗体 # 8 4 は、いずれの I g G サブタイプも用量依存的な抗腫瘍効果を示した。もっとも強い抗腫瘍効果が確認された # 8 4 c h l g G 4 P 1 0 m g / k g 投与群では、移植20日後に5例中5例のマウスで腫瘍の完全な退縮が確認された。

[0269] ヒトキメラ抗体 # 1 0 1 は、いずれの I g G サブタイプも用量依存的な抗腫瘍効果を示した。もっとも強い抗腫瘍効果が確認された 1 0 1 c h l g G 4 P 1 0 m g / k g 投与群では、移植20日後に5例中4例のマウスで腫瘍の完全な退縮が確認された。

[0270] ヒトキメラ抗体 # 1 1 0 は、いずれの I g G サブタイプも用量依存的な抗腫瘍効果を示した。もっとも強い抗腫瘍効果が確認された 1 1 0 c h l g G 4 P 1 0 m g / k g 投与群では、移植22日後に5例中3例のマウスで腫瘍の完全な退縮が確認された。

[0271] ヒトキメラ抗体 # 1 3 1 は、I g G 4 P サブタイプで用量依存的な抗腫瘍効果を示した。# 1 3 1 c h l g G 2 では、3 m g / k g、1 0 m g / k g 投与群で見られた抗腫瘍効果に差はなかった。

[0272] いずれのヒトキメラ抗体も、抗体のヒト I g G s u b t y p e に依存せず、1 0 m g / k g の投与量では、6 8 ~ 1 0 0 % の腫瘍増殖抑制効果を示した。カニクイザル交差性抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体 # 0 8 4、# 1

01、#110、#131についても、細胞の免疫から取得された抗ヒトCD147抗体、LN22R8や2P10F2同様に、マウスの免疫系に依存せず、CD147に作用する新規の作用機序によって抗腫瘍効果を示していることが示唆された。

[0273] (実施例5) ヒトキメラ抗体のCD147結合性評価

実施例3) -3-1で作製した#84chlgG1、#84chlgG2、#84chlgG4P、#84chlgG1LALA、#84chlgG4PFALA、#101chlgG4P、#110chlgG4PのヒトCD147に対する解離定数測定は、Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience社製) を使用し、Human Antibody Capture Kit (GE Healthcare Bioscience社製) を用いて固定化したAnti-Human IgG (Fc) antibodyに抗体をリガンドとして捕捉(キャプチャー)し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。ランニングバッファーとしてHBS-EP+ (GE Healthcare Bioscience社製)、センサーチップとしてCM5 (GE Healthcare Bioscience社製) を用いた。チップ上に1 μ g/mL又は2 μ g/mLのヒトキメラ抗体を10 μ L/分で60秒間添加した後、抗原としてCD147蛋白質の希釈系列溶液(#131chlgG4Pに対して0.25~4 μ g/mL、#84chlgG1、#84chlgG2、#84chlgG4P、#84chlgG1LALA、#84chlgG4PFALA、#101chlgG4P、#110chlgG4Pに対して0.5~8 μ g/mL) を流速30 μ L/分で120秒間添加し、引き続き120秒間、300秒間又は600秒間の解離相をモニターした。ここで、CD147蛋白質は、大腸菌で発現させ、Ni affinity, SECの2 steps精製後、タグ切断精製したものを使用した。再生溶液として、3M magnesium chloride (GE Healthcare Bioscience社製) を流速20 μ L/分で30秒間添

加した。データの解析には1 : 1 結合モデルを用いて、結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 及び解離定数 (KD ; $KD = k_d / k_a$) を算出した。結果を表5に示す。

[0274] [表5]

ヒトキメラ抗体のヒトCD147との解離定数

	名称	KD (nM)
1	#84chlgG1	393
2	#84chlgG2	334
3	#84chlgG4P	381
4	#84chlgG1LALA	371
5	#84chlgG4PFALA	358
6	#101chlgG4P	10.5
7	#110chlgG4P	9.94
8	#131chlgG4P	3.45

[0275] (実施例6) ヒト化抗体の作製

6) - 1 ヒト化抗体の設計

6) - 1 - 1 可変領域の分子モデリング

ホモロジーモデリングとして公知の方法 (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)) を利用した。市販のタンパク質立体構造解析プログラムDiscovery Studio (ダッソー・システムズ社製) を用いて、可変領域に対して高い配列同一性を有するProtein Data Bank (Nuc. Acids Res. 35, D301-D303 (2007)) に登録されている構造を検索した。ヒットした重鎖、軽鎖及び重鎖軽鎖インターフェース構造を鋳型として、三次元モデルが作成された。

[0276] 6) - 1 - 2 ヒト化抗体の設計方法

CDRグラフティング (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) によりヒト化した。rat__CD147__#84のフレームワーク領域は、KABAT et al.,

(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))において既定されるヒトkappa鎖サブグループ1のコンセンサス配列と、ヒトgamma鎖サブグループ3のコンセンサス配列に高い相同性を有することから、それらがrat__CD147__#84の軽鎖と重鎖のアクセプタとしてそれぞれ選択された。rat__CD147__#101のフレームワーク領域は、Kabat et al.において既定されるヒトkappa鎖サブグループ1のコンセンサス配列と、ヒトgamma鎖サブグループ3及びIMGT (THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM (登録商標))において規定されるヒトgamma鎖のIGHV3-30*05とIGHJ3*01に、高い相同性を有することから、それらがrat__CD147__#101の軽鎖と重鎖のアクセプタとしてそれぞれ選択された。rat__CD147__#110のフレームワーク領域は、IMGTにおいて規定されるヒトkappa鎖のIGKV1-39*01とIGKJ4*01と、ヒトgamma鎖のIGHV1-2*02とIGHJ6*01に、高い相同性を有することから、それらがrat__CD147__#110の軽鎖と重鎖のアクセプタとしてそれぞれ選択された。rat__CD147__#131のフレームワーク領域は、IMGTにおいて規定されるヒトkappa鎖のIGKV1-39*01とIGKJ2*01と、ヒトgamma鎖のIGHV3-30*05とIGHJ6*01に、高い相同性を有することから、rat__CD147__#131の軽鎖と重鎖のアクセプタとしてそれぞれ選択された。アクセプタ上に移入すべきドナー残基は、Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989))によって与えられる基準などを参考に、三次元モデルを分析することで選択された。

[0277] 6) -1-3 rat__CD147__#84重鎖のヒト化

rat__CD147__#84重鎖の可変領域に対し、図14(a)に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体重鎖#84H1hの可変領域が設計された。

[0278] 設計された可変領域に、ヒトのIgG2及びIgG4Pのgamma鎖定常領域を接続させたヒト化抗体重鎖が設計され、それぞれ#84H1hIgG2、#84H1hIgG4Pと命名した。#84H1hIgG2の全長アミノ酸配列を配列番号123に記載する。配列番号123のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号124に記載する。#84H1hIgG4Pの全長アミノ酸配列を配列番号125に記載する。配列番号125のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号126に記載する。

[0279] 6) -1-4 rat__CD147__#84軽鎖のヒト化

rat__CD147__#84軽鎖の可変領域に対し、図14(b)に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体軽鎖#84L2hの可変領域が設計された。

[0280] 設計された可変領域に、ヒトのκ鎖定常領域を接続させたヒト化抗体軽鎖が設計され、#84L2hと命名した。#84L2hの軽鎖全長アミノ酸配列を配列番号127に記載する。配列番号127のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号128に記載する。

[0281] 6) -1-5 #84ヒト化抗体

上記より設計された重鎖#84H1hIgG2と軽鎖#84L2hを組み合わせ、ヒト化抗体#84H1L2hIgG2を設計した。また、重鎖#84H1hIgG4Pと軽鎖#84L2hを組み合わせ、ヒト化抗体#84H1L2hIgG4Pを設計した。

[0282] 6) -1-6 rat__CD147__#101重鎖のヒト化

rat__CD147__#101重鎖の可変領域に対し、図15(a)に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体重鎖#101H1hの可変領域が設計された。

設計された可変領域に、ヒトの I g G 2 及び I g G 4 P の g a m m a 鎖定常領域を接続させたヒト化抗体重鎖が設計され、それぞれ # 1 0 1 H 1 h I g G 2、# 1 0 1 H 1 h I g G 4 P と命名した。# 1 0 1 H 1 h I g G 2 の全長アミノ酸配列を配列番号 1 2 9 に記載する。配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号 1 3 0 に記載する。# 1 0 1 H 1 h I g G 4 P の全長アミノ酸配列を配列番号 1 3 1 に記載する。配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号 1 3 2 に記載する。

[0283] 6) - 1 - 7 r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 0 1 軽鎖のヒト化

r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 0 1 軽鎖の可変領域に対し、図 1 5 (b) に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体軽鎖 # 1 0 1 L 2 h の可変領域が設計された。

設計された可変領域に、ヒトの κ 鎖定常領域を接続させたヒト化抗体軽鎖が設計され、# 1 0 1 L 2 h と命名した。# 1 0 1 L 2 h の軽鎖全長アミノ酸配列を配列番号 1 3 3 に記載する。配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号 1 3 4 に記載する。

[0284] 6) - 1 - 8 # 1 0 1 ヒト化抗体

上記より設計された重鎖 # 1 0 1 H 1 h I g G 2 と軽鎖 # 1 0 1 L 2 h を組み合わせ、ヒト化抗体 # 1 0 1 H 1 L 2 h I g G 2 を設計した。また、重鎖 # 1 0 1 H 1 h I g G 4 P と軽鎖 # 1 0 1 L 2 h を組み合わせ、ヒト化抗体 # 1 0 1 H 1 L 2 h I g G 4 P を設計した。

[0285] 6) - 1 - 9 r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 1 0 重鎖のヒト化

r a t _ C D 1 4 7 _ # 1 1 0 重鎖の可変領域に対し、図 1 6 (a)、(b) に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体重鎖 # 1 1 0 H 1 h、# 1 1 0 H 1 3 h の可変領域が設計された。

[0286] 設計された可変領域に、I g G 4 P の g a m m a 鎖定常領域を接続させたヒト化抗体重鎖が設計され、それぞれ # 1 1 0 H 1 h I g G 4 P、# 1 1 0 H 1 3 h I g G 4 P と命名した。# 1 1 0 H 1 h I g G 4 P の全長アミノ酸

配列を配列番号135、#110H13hlgG4Pの全長アミノ酸配列を配列番号147に記載する。配列番号135のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号136、配列番号147のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号148に記載する。

[0287] 6) -1-10 rat_CD147_#110軽鎖のヒト化
rat_CD147_#110軽鎖の可変領域に対し、図16(c)、(d)、(e)に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体軽鎖#110L4h、#110L2h、#110L12hの可変領域が設計された。

[0288] 設計された可変領域に、ヒトのκ鎖定常領域を接続させたヒト化抗体軽鎖が設計され、それぞれ#110L4h、#110L2h、#110L12hと命名した。#110L4hの軽鎖全長アミノ酸配列を配列番号137、#110L2hの軽鎖全長アミノ酸配列を配列番号149、#110L12hの軽鎖全長アミノ酸配列を配列番号151に記載する。配列番号137のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号138、配列番号149のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号150、配列番号151のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号152に記載する。

[0289] 6) -1-11 #110ヒト化抗体
上記より設計された重鎖#110H1hlgG4Pと軽鎖#110L4hを組み合わせ、ヒト化抗体#110H1L4hlgG4Pを設計した。また、重鎖#110H13hlgG4Pと軽鎖#110L2hを組み合わせ、ヒト化抗体#110H13L2hlgG4Pを設計し、重鎖#110H13hlgG4Pと軽鎖#110L12hを組み合わせ、ヒト化抗体#110H13L12hlgG4Pを設計した。

[0290] 6) -1-12 rat_CD147_#131重鎖のヒト化
rat_CD147_#131重鎖の可変領域に対し、図17(a)に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体重鎖#131H

2 h の可変領域が設計された。

[0291] 設計された可変領域に、ヒトの IgG2 の γ 鎖定常領域を接続させたヒト化抗体重鎖が設計され、 $\#131\text{H2hIgG2}$ と命名した。 $\#131\text{H2hIgG2}$ の全長アミノ酸配列を配列番号 139 に記載する。配列番号 139 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号 140 に記載する。

[0292] 6) - 1 - 13 $\text{rat_CD147_}\#131$ 軽鎖のヒト化 $\text{rat_CD147_}\#131$ 軽鎖の可変領域に対し、図 17 (b) に示すアクセプタのアミノ酸残基を移入することで、ヒト化抗体軽鎖 $\#131\text{L2h}$ の可変領域が設計された。

[0293] 設計された可変領域に、ヒトの κ 鎖の定常領域を接続させたヒト化抗体軽鎖が設計され、 $\#131\text{L2h}$ と命名した。 $\#131\text{L2h}$ の軽鎖全長アミノ酸配列を配列番号 141 に記載する。配列番号 141 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を配列番号 142 に記載する。

[0294] 6) - 1 - 14 $\#131$ ヒト化抗体
上記より設計された重鎖 $\#131\text{H2hIgG2}$ と軽鎖 $\#131\text{L2h}$ を組み合わせ、ヒト化抗体 $\#131\text{H2L2hIgG2}$ を設計した。

[0295] 6) - 2 ヒト化抗体の軽鎖発現ベクターの構築
6) - 2 - 1 $\#84\text{L2h}$ 発現ベクターの構築
配列番号 128 に示す $\#84\text{L2h}$ のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 37 乃至 402 に示される DNA 断片を合成した (GENEART 社)。
 In-Fusion HD PCR クローニングキット (Clontech 社) を用いて、 pCMA-LK を制限酵素 BsiWI で切断した箇所に合成した DNA 断片を挿入することにより $\#84\text{L2h}$ 発現ベクターを構築した。

[0296] 6) - 2 - 2 $\#101\text{L2h}$ 発現ベクターの構築
配列番号 134 に示す $\#101\text{L2h}$ のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 37 乃至 402 に示される DNA 断片を合成した (GENEART 社)

。実施例6)－2－1と同様の方法で#101L2h発現ベクターを構築した。

[0297] 6)－2－3 #110L4h、#110L2h及び#110L12h発現ベクターの構築

配列番号138、配列番号150及び配列番号152に示す#110L4h、#110L2h及び#110L12hのヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至402に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例6)－2－1と同様の方法で#110L4h、#110L2h及び#110L12h発現ベクターを構築した。

[0298] 6)－2－4 #131L2h発現ベクターの構築

配列番号142に示す#131L2hのヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至402に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例6)－2－1と同様の方法で#131L2h発現ベクターを構築した。

[0299] 6)－3 ヒト化抗体の重鎖発現ベクターの構築

6)－3－1 #84H1hIgG2発現ベクターの構築

配列番号124に示す#84H1hIgG2のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至437に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット(Clontech社)を用いて、pCMA-G2を制限酵素BspIで切断した箇所に合成したDNA断片を挿入することにより#84H1hIgG2発現ベクターを構築した。

[0300] 6)－3－2 #84H1hIgG4P発現ベクターの構築

配列番号126に示す#84H1hIgG4Pのヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至437に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット(Clontech社)を用いて、pCMA-G4Pを制限酵素BspIで切断した箇所に合成したDNA断片を挿入することにより#84H1hIgG4P発

現ベクターを構築した。

[0301] 6) - 3 - 3 # 1 0 1 H 1 h l g G 2 発現ベクターの構築

配列番号 1 3 0 に示す # 1 0 1 H 1 h l g G 2 のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 3 6 乃至 4 2 8 に示される DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社) 。実施例 6) - 3 - 1 と同様の方法で # 1 0 1 H 1 h l g G 2 発現ベクターを構築した。

[0302] 6) - 3 - 4 # 1 0 1 H 1 h l g G 4 P 発現ベクターの構築

配列番号 1 3 2 に示す # 1 0 1 H 1 h l g G 4 P のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 3 6 乃至 4 2 8 に示される DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社) 。実施例 6) - 3 - 2 と同様の方法で # 1 0 1 H 1 h l g G 4 P 発現ベクターを構築した。

[0303] 6) - 3 - 5 # 1 1 0 H 1 h l g G 4 P 及び # 1 1 0 H 1 3 h l g G 4 P 発現ベクターの構築

配列番号 1 3 6 及び配列番号 1 4 8 に示す # 1 1 0 H 1 h l g G 4 P 及び # 1 1 0 H 1 3 h l g G 4 P のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 3 6 乃至 4 2 5 に示される DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社) 。実施例 6) - 3 - 2 と同様の方法で # 1 1 0 H 1 h l g G 4 P 及び # 1 1 0 H 1 3 h l g G 4 P 発現ベクターを構築した。

[0304] 6) - 3 - 6 # 1 3 1 H 2 h l g G 2 発現ベクターの構築

配列番号 1 4 0 に示す # 1 3 1 H 2 h l g G 2 のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 3 6 乃至 4 3 1 に示される DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社) 。実施例 6) - 3 - 1 と同様の方法で # 1 3 1 H 2 h l g G 2 発現ベクターを構築した。

[0305] 6) - 4 ヒト化抗体の調製

6) - 4 - 1 ヒト化抗体の生産

実施例 1) - 1 4 - 1 と同様の方法で生産した。実施例 6) - 1 - 5 、実施例 6) - 1 - 8 、実施例 6) - 1 - 1 1 、及び実施例 6) - 1 - 1 4 に示した H 鎖と L 鎖の組み合わせに対応した H 鎖発現ベクターと L 鎖発現ベクター

一の組み合わせで、各種ヒト化抗体を取得した。

[0306] 6) - 4 - 2 ヒト化抗体の1段階精製

実施例6) - 4 - 1で得られた培養上清から抗体をrProtein Aアフィニティークロマトグラフィーの1段階工程で精製した。培養上清をPBSで平衡化したMabSelect SuReが充填されたカラム (GE Healthcare Bioscience社製) にアプライしたのちに、カラム容量の2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2 Mアルギニン塩酸塩溶液 (pH 4.0) で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) によりPBSへのバッファ置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量UF10K, Sartorius社) で抗体を濃縮し、IgG濃度を1 mg/mL以上に調製した。最後にMinisart-Plus filter (Sartorius社) でろ過し、精製サンプルとした。

[0307] 6) - 4 - 3 ヒト化抗体の2段階精製

実施例6) - 4 - 1で得られた培養上清をrProtein Aアフィニティークロマトグラフィーとセラミックハイドロキシアパタイトの2段階工程で精製した。培養上清をPBSで平衡化したMabSelect SuReが充填されたカラム (GE Healthcare Bioscience社製) にアプライした後に、カラム容量の2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2 Mアルギニン塩酸塩溶液 (pH 4.0) で抗体を溶出した。抗体の含まれる画分を透析 (Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) によりPBSへのバッファ置換を行い、5 mMリン酸ナトリウム/50 mM MES/pH 7.0のバッファで5倍希釈した後に、5 mM NaPi/50 mM MES/30 mM NaCl/pH 7.0のバッファで平衡化したセラミックハイドロキシアパタイトカラム (日本バイオラッド、

Bio-Scale CHT Type-1 Hydroxyapatite Column) にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific 社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) により HBSor (25 mM ヒスチジン / 5 % ソルビトール、pH 6.0) へのバッファー置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量 UF10K, Sartorius 社) にて抗体を濃縮し、IgG 濃度を 25 mg/mL に調製した。最後に Minisart-Plus filter (Sartorius 社) でろ過し、精製サンプルとした。

[0308] (実施例 7) ヒト化抗体の活性測定

7) -1 ヒト化抗体の CD147 抗体結合性評価

実施例 6) -4-3 で作製したヒト化抗ヒト CD147 抗体 #84H1L2hlgG2、#84H1L2hlgG4P、#101H1L2hlgG2、#101H1L2hlgG4P、#110H1L4hlgG4P 及び #131H2L2hlgG2 とヒト CD147 との解離定数測定は、Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience 社製) を使用し、Human Antibody Capture Kit (GE Healthcare Bioscience 社製) を用いて固定化した Anti-Human IgG (Fc) antibody に抗体をリガンドとして捕捉 (キャプチャー) し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。ランニングバッファーとして HBS-EP+ (GE Healthcare Bioscience 社製)、センサーチップとして CM5 (GE Healthcare Bioscience 社製) を用いた。チップ上に 1 µg/mL のヒト化抗体を 10 µL / 分で 60 秒間添加した後、実施例 5) で用いた抗原の希釈系列溶液 (#101H1L2hlgG2 及び #101H1L2hlgG4P に対して 0.0625 ~ 1 µg/mL、#84H1L2hlgG2、#84H1L2hlgG4P、#110

H1L4hlgG4P、#110H13L2hlgG4P、#110H13L12hlgG4P及び#131H2L2hlgG2に対して0.25~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を流速30 $\mu\text{L}/\text{分}$ で120秒間添加し、引き続き300秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、3M magnesium chloride (GE Healthcare Bioscience社製)を流速20 $\mu\text{L}/\text{分}$ で30秒間添加した。データの解析には1:1結合モデルを用いて、結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 及び解離定数(KD; $KD = k_d / k_a$)を算出した。

[0309] 結果を表6に示す。

[0310] [表6]

ヒト化抗体のヒトCD147との解離定数

名称	KD (nM)
#84H1L2hlgG2	227
#84H1L2hlgG4P	242
#101H1L2hlgG2	10.5
#101H1L2hlgG4P	10.5
#110H1L4hlgG4P	8.60
#110H13L2hlgG4P	58.9
#110H13L12hlgG4P	154
#131H2L2hlgG2	5.84

[0311] 7) -2 膵臓癌担癌モデルにおけるヒト化CD147抗体の抗腫瘍効果
 5×10^6 細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50%GFR-Matrigel (Corning社、Cat. 354230)を含むPBSで懸濁し、4週齢雌のNOD-scidマウス(NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本チャールス・リバーより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに群分けをし、移植の7日後に実施例6) -4-2で作製したヒト化CD147抗体(#84H1L2hlgG2、#84H1L2lg4P、#101H1L2hlg2、#101H1L2hlg4P、

#110H1L4hlg4P、#131H2L2hlg2)を3mg/kg、10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5)。対照薬として膵臓癌の治療薬であるゲムシタビン(日本イーライリリー社より購入)を移植の7、14日後に400mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0312] 結果を図18(a)～(d)に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

[0313] 対照薬の腫瘍増殖抑制率は、71%である、腫瘍の消失は認められなかったのに対し、いずれのヒト化CD147抗体も、3あるいは10mg/kg投与群でゲムシタビンよりも優れた抗腫瘍効果を示した。#84H1L2hlg4P、#101H1L2hlg2、#101H1L2hlg4P、#110H1L4hlg4Pの10mg/kg投与群では、腫瘍の消失を伴う強い抗腫瘍効果が確認された。

[0314] (実施例8) CD147抗体の*in vitro* p38MAPKシグナルの活性化

8) -1 膵臓癌細胞PANC-1における抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体によるp38MAPKリン酸化の誘導

CD147は活性化によってp38MAPKのリン酸化を促すことが報告されている(Lim et al., FEBS Letters, 88-92, 1998)(Li et al., J. Hepatology, 1378-1389, 2015)。抗腫瘍効果を示す抗CD147が、p38MAPKのシグナルに及ぼす影響を調べるために、CD147ヒトキメラ抗体LN22R8chlgG4Pを10μg/mlで15分間処理したPANC-1細胞について、p38MAPKリン酸化をSimple Western assays法(プロテインシンプル ジャパン株式会社、Wes)を用いて評価した。対照サンプルとして、PANC-1細胞をヒトIgG(J

ackson ImmunoResearch社、009-000-003) 10 μ g/mlを同様に処理して解析に供した。p38MAPKの検出には、p38 MAPK rabbit mAb (Cell signaling technology社、Cat. #9212)を用いた。リン酸化p38MAPKの検出には、P-p38 MAPK (T180/Y182) (D3F9) XP rabbit mAb (Cell signaling technology社、#4511S)を用いた。検出されたp38MAPKシグナル対する、リン酸化p38MAPKシグナルの比を図19に示した。抗体処理サンプルは2重に実施し、平均値を図に示した。

[0315] LN22R8chlgG4P抗体処理群では、リン酸化MAPKシグナルの増加が観察された。

[0316] 8) -2 CD147抗体のin vitro p38シグナル下流分子のHSP27のリン酸化

p38MAPKは活性化によって、HSP27をリン酸化することが報告されている(Landry et al., Biochem. Cell Biol., 703-707, 1995)。CD147ヒトキメラ抗体LN22R8によって誘導されるp38のリン酸化が、実際のp38シグナル活性化を促しているか確認するために8) -1の抗体処理サンプルについて、リン酸化をSimple Western assays法(プロテインシンプル ジャパン株式会社、Wes)を用いて評価した。HSP27の検出には、HSP27 抗体(R&D systems社、Cat. AF15801)を用いた。リン酸化HSP27の検出には、Phospho-HSP27 (Ser82) antibody (Cell signaling technology社、2401S)、又はAnti-HSP27 (phospho Ser15) 抗体(abcam社、Cat. ab76313)を用いた。

[0317] 検出されたHSP27シグナル対する、Ser82又はSer15リン酸化HSP27シグナルの比を、それぞれ、図20(a)又は図20(b)に

示した。抗体処理サンプルは2重に実施し、平均値を図に示した。

[0318] LN22R8chIgG4P抗体処理群では、リン酸化HSP27シグナルの増加が観察された。CD147ヒトキメラ抗体によって誘導されたp38のリン酸化によって下流のHSP27のリン酸化活性化が誘導されていることから、抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体LN22R8chIgG4Pがp38MAPKシグナルの活性化を誘導することが判った。また、膵臓癌細胞MIA PaCa-2においても同様に、p38MAPKシグナルの活性化が確認された。

[0319] (実施例9) CD147抗体の腫瘍内p38シグナルの活性化 *in vivo*で観察されたCD147抗体によるp38MAPKシグナルの活性化が、マウス皮下に形成した腫瘍内でも起こるかをMIA PaCa-2のマウス皮下腫瘍で調べた。5×10⁶細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50%GFR-Matrigel (Corning社、Cat. 354230)を含むPBSで懸濁し、5週齢雌のNOD-scidマウス (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J、日本チャールス・リバーより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植の5日後に群分けを実施し、抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体LN22R8chIgG4Pを群分け後当日に10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した。抗体投与後、6, 24, 48, 72時間後に腫瘍を採材し、ドライアイスで凍結後、冷凍保存した。凍結した腫瘍組織からのサンプル調製 (n=3) には、gentleMACS Octo Dissociator with Heaters (ミルテニー社)を用いた。調製した腫瘍ライセートに対し、Simple Western assays法 (プロテインシンプル ジャパン株式会社、We s)を用いて解析した。

[0320] 検出されたp38MAPKシグナルの平均値を標準誤差と併せて図21 (a)に示した。検出されたリン酸化p38MAPKシグナルの平均値を標準誤差と併せて図21 (b)に示した。p38MAPKシグナル対する、リン酸化p38MAPKシグナルの比の平均値を標準誤差と併せて図21 (c)

に示した。LN22R8chIgG4Pは、投与後6時間から72時間で、リン酸化p38MAPKの割合を増加させた。24時間から72時間では、p38MAPKが増加することで、リン酸化p38MAPKのシグナルは6時間をピークに減少していた。

[0321] マウスの皮下腫瘍内でもCD147キメラ抗体投与によるp38リン酸化の上昇、HSP27リン酸化の増加が観察され、p38シグナルの活性化が起こっていることがわかった。

[0322] (実施例10) p38MAPK下流の分子CXCL8の誘導

p38MAPKの活性化によって、CXCL8のmRNA安定化を介した誘導 (Hoffmann et al., J. Leukoc. Biol., 847-855, 2002)、SMAD3/4シグナルの活性化が報告されている (Levonon et al., PLOS ONE, e57474, 2013)。MIA PaCa-2腫瘍内で、抗体投与後にCXCL8の遺伝子発現が誘導されるか抗体投与後のマウス皮下腫瘍から抽出したRNAを定量的PCR法によって調べた。同様にSMADシグナル活性化によって誘導されることが報告されているRHOB遺伝子 (Vasilaki et al., FASEB Journal, 891-905, 2010) についてもCD147抗体投与による変動を調べた。内在対照遺伝子として、importin (ipo8) 遺伝子とTATA box binding protein (tbp) 遺伝子の発現を測定した。抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体を投与し、72時間後のMIA PaCa-2腫瘍を採材し、RNA later (QIAGEN社、Cat. 76104) で処理した後、RNeasy Mini Kit (250) (QIAGEN社、Cat. 74106) を使用し、RNAを抽出した。抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体として、実施例1) -14で作製したLN22R8chIgG1、LN22R8chIgG2又はLN22R8chIgG4Pを用いた。定量的RT-PCRには、EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR kit Universal (Thermof

isher scientific, Cat. 11781-01K) を用い、遺伝子定量プローブとして、importin (ipo8) (Thermo Fisher Scientific, Cat. Hs00183533_m1), TATA box binding protein (tbp) (Thermo Fisher Scientific, Cat. Hs00427621_m1), rashomolog family member B (rhoB) (Thermo Fisher Scientific, Cat. hs00269660_s1), interleukin 8 (Thermo Fisher Scientific, Cat. Hs00174103_m1) をそれぞれ、用いた。PCR 反応に伴う遺伝子特異的な蛍光シグナルの増加を ABI Prism 7500 (Applied Biosystems 社) を用いて測定した。

図 22 (a) に ipo8 / tbp 遺伝子の発現比の平均値 (n = 3) を標準偏差と併せて示した。

図 22 (b) に cxc18 / tbp 遺伝子の発現比の平均値 (n = 3) を標準偏差と併せて示した。

図 22 (c) に rhoB / tbp 遺伝子の発現比の平均値 (n = 3) を標準偏差と併せて示した。

[0323] LN22R8chlgG1、LN22R8chlgG2 又は LN22R8chlgG4P 投与後に、ipo8 遺伝子の発現は変動しなかったのに対し、抗ヒト CD147 ヒトキメラ抗体投与群での cxc18、rhoB の発現誘導が確認された。cxc18、rhoB の発現誘導は、実施例 1) - 18 で示したヒトキメラ抗体の抗腫瘍効果の強さに順じており、両遺伝子の発現誘導が抗腫瘍効果と相関する可能性が示唆された。

[0324] (実施例 11) 抗ヒト CD147 ラット抗体のヒトキメラ抗体化による抗腫瘍効果の増強における、cxc18、rhoB 遺伝子の誘導

抗ヒト CD147 ラット抗体 rat_CD147_#110 は、実施例 2、実施例 7 に示した通り、ヒトキメラ化によって抗腫瘍効果が増強した。ヒ

トキメラ抗体LN22R8chIgG1、LN22R8chIgG2又はLN22R8chIgG4P投与後の腫瘍中で観察されたcxcl8、rhoBの誘導について、14) - 2と同様にrat_CD147_#110とキメラ抗体#110chIgG4Pを比較した。

[0325] 図23(a)にipo8/tbp遺伝子の発現比の平均値(n=3)を標準偏差と併せて示した。

[0326] 図23(b)にcxcl8/tbp遺伝子の発現比の平均値(n=3)を標準偏差と併せて示した。

[0327] 図23(c)にrhoB/tbp遺伝子の発現比の平均値(n=3)を標準偏差と併せて示した。

[0328] ipo8遺伝子の発現は、抗体投与によって変動しなかった。cxcl8遺伝子、rhoB遺伝子の発現はrat_CD147_#110の投与によって、抗体未投与群と同様に変化が見られなかったのに対し、#110chIgG4Pでのcxcl8、rhoBの誘導が確認された。両遺伝子の誘導がCD147抗体による抗腫瘍効果と関連するパラメーターであることが示唆された。

[0329] (実施例12) SMAD4陰性膵臓癌担癌モデルによる評価

SMADシグナルの活性化に重要な分子の一つとして、転写因子、SMAD4が知られている(Zang, et al., Current Biology, 270-276, 1997)。一部の膵臓癌では、SMAD4の遺伝子的な欠損によりSMADシグナルが部分的な阻害を受けていることが知られている(Hahn, et al., Science, 350-353, 1996)。SMAD4が欠損し、SMADシグナルが部分的に阻害されている膵臓癌細胞株BxPC-3について(Yasutome et al., Clin. Exp. Metastasis, 461-473, 2005)、CD147抗体が抗腫瘍効果を示すか調べた。2.5×10⁶細胞のヒト膵臓株BxPC-3(ATCC, Cat. CRL-1687)を100%Matrigel(Corning社、Cat. 354234)を含むPBS

で懸濁し、6週齢雌のBALB/c-nuマウス(CAnN, Cg-Foxn1nu/CrlCrlj、日本チャールス・リバーより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植後8日後に群分けを実施し、移植の8、15、22日後にマウス抗ヒトCD147抗体LN22R8R8、又はラット抗ヒトCD147抗体2P10F2 10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5)。対照薬として膵臓癌の治療薬であるゲムシタビン(日本イーライリリー社、ジェムザール(登録商標))を移植の8、15、22日後に200mg/kgで担癌マウスの尾静脈内投与した(n=5)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0330] 腫瘍体積(mm³) = 1/2 × 短径(mm) × 短径(mm) × 長径(mm)

図24に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。BxPC-3腫瘍は、LN22R8抗体、2P10F2抗体及びゲムシタビンに耐性であった。

[0331] (実施例13) SMAD4導入によるCD147抗体感受性の獲得

複数の膵臓癌細胞株でSMAD4を導入することによってSMADシグナルが回復することが報告されている。SMAD4の導入によって回復したSMADシグナルによりCD147抗体の感受性が増加するか調べた。

[0332] 13) - 1 SMAD4安定発現細胞の作製

Retro-X™ Qベクターキットを利用しBxPC-3のSMAD4安定発現株を作製した。レトロウイルスベクター(タカラバイオ社、Retro-X™ Q Vector Set, Cat. 631516)としてキットに含まれるpQCXIPのクローニング部位に人工合成により作製したヒトSMAD4遺伝子を導入し、SMAD4発現レトロウイルスベクターとした。Retro-X Universal Packaging System(タカラバイオ社、Cat. 631530)を利用し、BxPC-3にSMAD4発現レトロウイルスベクターを導入し、ピューロマイシン(タカラバイオ社、Cat. 631306)によりウイルス感染により染色体

にレトロウイルスが組み込まれ、ピューロマイシン耐性、SMAD4陽性となったBxPC-3細胞を選択し、SMAD4陽性BxPC-3細胞、BxPC-3-SMAD4とした。レトロウイルスベクターpQCXIPを同様に感染させ、ピューロマイシン耐性となったBxPC-3細胞をBxPC-3-mockとした。レトロウイルス感染実験は2回実施し、BxPC-3-mock、BxPC-3-SMAD4について、lot. 1, lot. 2を作製した。

[0333] 13) - 2 CD147とSMAD4発現の確認

BxPC-3 (ATCC, Cat. CRL-1687)、実施例13) - 1で作製したBxPC-3-mock、BxPC-3-SMAD4について、Simple Western assays法（プロテインシンプルジャパン株式会社、Wes）を用いて解析した。SMAD4陽性対照サンプルとして、MIA PaCa-2を利用した。SMAD4の検出には抗SMAD4抗体（R&D systems, Cat. AF2097）を利用した。GAPDHの検出には、抗GAPDH抗体（Abfrontier, Cat. LF-MA0026）を利用した。CD147の検出には、抗CD147抗体（Abcam, Cat. Ab108317）を利用した。

[0334] 結果を図25 (a) に示した。MIA PaCa-2はSMAD4陽性、CD147陽性であった。BxPC-3はSMAD4陰性、CD147陽性であった。BxPC-3-mockは、レトロウイルス感染による影響は見られず、SMAD4陰性、CD147陽性であった。SMAD4発現レトロウイルスベクターを導入した、BxPC-3-SMAD4は、lot. 1、lot. 2のいずれもSMAD4陽性であった。lot. 2のSMAD4発現が高く、後の実験には、lot. 2をBxPC-3-SMAD4として利用した。

[0335] 13) - 3 SMAD4安定発現したBxPC-3腫瘍のCD147ヒトキメラ抗体への感受性

2. 5×10^6 細胞のBxPC-3-mock、又はBxPC-3-SMA

D4を100%Matrigel (Corning社、Cat. 354234)を含むPBSで懸濁し、5週齢雌のBALB/c-nuマウス (CAN N, Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j、日本チャールス・リバーより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとにBxPC-3-mock移植後6日後に、BxPC-3-SMAD4は移植後3日後に群分けをそれぞれ実施し、群分け実施当日、7、14、21、28日後にヒトキメラ抗ヒトCD147抗体LN22R8R8chIgG2、又はLN22R8R8chIgG4P 10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した (n=5)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス (株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0336] 腫瘍体積 (mm³) = 1/2 × 短径 (mm) × 短径 (mm) × 長径 (mm)

結果を図25 (b)、図25 (c)に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。BxPC-3-mock腫瘍は、LN22R8R8chIgG2、又はLN22R8R8chIgG4P抗体に耐性又は、低感受性であった。BxPC-3-SMAD4腫瘍は、LN22R8R8chIgG2、又はLN22R8R8chIgG4P抗体に部分的な感受性を示した。

[0337] 13) - 4 SMAD4発現による腫瘍中p38シグナルの変化

SMAD4陰性の膵臓癌細胞では、SMAD4を発現させることによって、p38シグナルが増強することが報告されている (Chen et al., B. M. C., 1471-2407, 2014)。BxPC-3-SMAD4腫瘍中のp38MAPKとリン酸化p38MAPKについて、抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体投与 (抗体投与後72時間後)による変動について、実施例13) - 1と同様にSimple Western assay法 (プロテインシンプル ジャパン株式会社、Wes)を用いて解析した。実施例1) - 18の項と同様に、抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体として、LN22R8chIgG4Pを10mg/kg、MIA PaCa-2皮下腫瘍を生着したマウスに投与した。腫瘍組織からのサンプル調製 (n=3

）には、gentleMACS Octo Dissociator with Heaters（ミルテニー社）を用いた。

[0338] 図26（a）にp38 MAPK測定値について、3つの腫瘍サンプルの測定値の平均値と標準誤差を併せてグラフに記載した。図26（b）にリン酸化p38 MAPK測定値について、3つの腫瘍サンプルの測定値の平均値と標準誤差を併せてグラフに記載した。

[0339] BxPC-3-SMAD4腫瘍中では、p38とリン酸化p38が2倍以上に増加していた。CD147ヒトキメラ抗体投与後72時間後では、p38の部分的な減少、リン酸化p38の部分的な増加が観察された。

[0340] 膵臓癌細胞BxPC-3の腫瘍では、SMAD4の発現によって、p38シグナルの増強が起こることがわかった。CD147ヒトキメラ抗体LN22R8chlgG4Pの感受性増加に、SMAD4依存的なp38シグナルの増強が寄与している可能性が考えられる。

[0341] （実施例14）ゲムシタビン耐性膵臓癌におけるキメラCD147抗体の抗腫瘍効果

ゲムシタビン耐性の膵臓癌腫瘍モデルでのCD147抗体の抗腫瘍効果を調べた。5×10⁶細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50%GFR-Matrigel（Corning社、Cat. 354230）を含むPBSで懸濁し、5週齢雌のNOD-scidマウス（NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本チャールス・リバー）の腋窩部皮下に移植した。移植の6日後に膵臓癌の治療薬であるゲムシタビン（日本イーライリリー社）を400mg/kg腹腔内投与し、1週間後に増殖の確認されたゲムシタビン耐性腫瘍を形成したマウスを腫瘍のサイズに基づき群分けを実施し、対照群（n=5）には、ゲムシタビンを移植後13日目（群分け日）、20日目に400mg/kg腹腔内投与した。CD147抗体とゲムシタビン併用投与群（n=5）として、ゲムシタビンを移植後13日目（群分け日）、20日目に400mg/kg腹腔内投与するのに加え、CD147ヒトキメラ抗体LN22R8chlgG4Pを移植後13日目（群分け日）、20

日目に 10 mg/kg 腹腔内投与した。移植腫瘍の長径及び短径を週 2 回、電子デジタルノギス（株式会社ミットヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0342] 結果を図 27 に示したグラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。Gemcitabin と抗体を投与していない未投与群（non treatment）の腫瘍増殖を併せて記載した（ $n=5$ ）。

[0343] 対照薬のゲムシタピンの投与群の、腫瘍の平均サイズは、移植後 28 日後に 1269 mm^3 であり退縮する腫瘍は認められなかったのに対し、CD147 ヒトキメラ抗体 LN22R8chlgG4P を併用投与した群の腫瘍の平均サイズは、 15 mm^3 であり、5 例中 3 例での腫瘍の退縮が認められた。この結果から、ゲムシタピンに耐性を示し増殖する膵臓癌腫瘍についても CD147 抗体への感受性を示す可能性が示された。

[0344] （実施例 15）肝臓癌モデルにおけるヒト化 CD147 抗体の抗腫瘍効果
15) - 1 Hep G2 細胞における CD147 と SMAD4 の発現
実施例 13) - 2 と同様に、肝臓癌細胞株 Hep G2 細胞（ATCC, Cat. HB-8065）の CD147 と SMAD4 発現について確認した。CD147 陽性の対照検体として、MIA PaCa-2、BxPC-3（ATCC, Cat. CRL-1687）を用いた。SMAD4 陽性の対照検体として、MIA PaCa-2、SMAD4 陰性の対照検体として、BxPC-3 をそれぞれ用いた。

[0345] 検出されたシグナルについて、GAPDH に対するシグナル比を求め、下記にまとめた。Hep G2 細胞は、CD147、SMAD4 陽性であることがわかった。

[0346] CD147/GAPDH のシグナル比

MIA PaCa-2	0.481
BxPC-3	0.481
Hep G2	2.944

[0347] SMAD4/GAPDHのシグナル比

MIA PaCa-2	0.329
BxPC-3	0.003
Hep G2	0.723

[0348] 15) -2 Hep G2細胞におけるCD147のフローサイトメーターによる発現確認

Hep G2細胞 (ATCC, Cat. HB-8065) の細胞表面に発現するCD147をフローサイトメーターにより解析した。ヒトCD147の発現確認には、市販の抗ヒトCD147抗体としてAPCラベルされた抗ヒトCD147マウスIgG1抗体MEM-M6/1-APC (Thermo fisher, Cat. MA1-10104) を用いた。マウスIgG1 isotype control抗体としてmIgG1-APC (ミルテニーバイオ社、Cat. 130-092-214) を用いた。Hep G2細胞の懸濁液に、1/10量のMEM-M6/1-APCを加え、4℃、30分間処理した。5%FBSを含むPBS緩衝液で細胞を洗浄後、フローサイトメーター (Cantoll、BD Bioscience社) の測定を実施し、図28(a)に結果をまとめた。

[0349] MEM-M6/1-APC で処理したHep G2細胞は、強い蛍光シグナルを示し、CD147を発現していることがわかった。

[0350] 15) -3 肝臓癌細胞におけるヒト化CD147抗体によるp38活性化

肝臓癌細胞Hep G2において、抗CD147抗体が、p38MAPKに及ぼす影響を調べるために、抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体 (LN22R8chIgG4P) 又は、実施例6) -4-2で作製した抗ヒトCD147ヒト化抗体 (#84H1L2hIgG2、#84H1L2hIg4P、#101H1L2hIgG2、#101H1L2hIg4P、#110H1L4hIg4P、#131H2L2hIgG2) を10μg/mlで15分間処理したHep G2細胞 (ATCC, Cat. HB-8065) について、

p38リン酸化をSimple Western assays法（プロテインシンプル ジャパン株式会社、We s）を用いて評価した。対照サンプルとして、HepG2細胞をヒトIgG（hIgG, Jackson ImmunoResearch社、009-000-003）10 μ g/mlを同様に処理して解析に供した。p38MAPKの検出には、p38 MAPK rabbit mAb（Cell signaling technology社、Cat. #9212）を用いた。リン酸化p38MAPKの検出には、P-p38 MAPK（T180/Y182）（D3F9）XP rabbit mAb（Cell signaling technology社、#4511S）を用いた。検出されたp38MAPKシグナルに対する、リン酸化p38MAPKシグナルの比を図28（b）に示した。

[0351] LN22RchIgG4P、#84H1L2hIgG2、#84H1L2hIg4P、#101H1L2hIgG2、#101H1L2hIg4P、#110H1L4hIg4P又は#131H2L2hIgG2の処理によって、ヒトIgG処理群より2倍以上のリン酸化p38 MAPKシグナルの増加が観察され、肝臓癌細胞でも膵臓癌細胞同様に抗ヒトCD147抗体によってp38MAPKのリン酸化が誘導されていることがわかった。

[0352] 15) -4 肝臓癌におけるヒト化CD147抗体とソラフェニブの抗腫瘍効果の比較

CD147とSMAD4陽性で、抗ヒトCD147抗体によるp38のリン酸化が確認されたヒト肝臓株HepG2（ATCC, Cat. HB-8065）について、抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体とヒト化抗体の抗腫瘍効果を検討した。

[0353] 5 $\times$ 10⁶細胞のヒト肝臓株HepG2を50%Matrigel（Corning社、Cat. 354234）を含むPBSで懸濁し、4週齢雌のNOD-scidマウス（NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植後9日後に群分けを実施し、ヒトキメラCD147抗体（LN22

R8chlgG4P)、実施例6) - 4 - 2で作製したヒト化CD147抗体(#84H1L2hlgG2、#84H1L2hlg4P、#110H1L4hlg4P)を1mg/kg、10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に投与した(n=5)。対照薬として肝臓癌の治療薬であるソラフェニブ(ネクサバル錠200mg、バイエル薬品株式会社)をネクサバル錠添付文書の参考文献(Chang et. al., Cancer Chem. Ther. Pharm., 2007)に従いPEG-35ヒマシ油(Cremophor EL、ナカライテスク社、Cat. 09727-14)エタノール溶媒に溶解し、移植の9、10、11、12、13、16、17、18日後に30mg/kg、90mg/kgで担癌マウスに経口投与した(n=5)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0354] 腫瘍体積(mm³) = 1/2 × 短径(mm) × 短径(mm) × 長径(mm)

結果を表7及び図29(a)～(d)に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

ソラフェニブ投与は、腫瘍増殖の部分的な阻害が観察されたが、腫瘍の消失は認められなかった。LN22R8chlgG4P、#84H1L2hlgG2、#84H1L2hlg4P、#110H1L4hlg4Pは、いずれも腫瘍の消失を伴う優れた抗腫瘍効果を示した。

[0355]

[表7]

群構成・投与（一群：5匹）	腫瘍の平均容積（mm ³ ）	腫瘍増殖抑制率（％）	腫瘍の完全縮退例数
未処置	1740	0	0/5
ヒヒカル, qD1x9 po	1576	9	0/5
ソラフェニブ 30mg/kg, qD1x9 po	1425	18	0/5
ソラフェニブ 90mg/kg, qD1x9 po	1252	28	0/5
LN22R8chlgG4P, 1 mg/kg, 単回投与 ip	664	62	0/5
LN22R8chlgG4P, 10 mg/kg, 単回投与 ip	13	99	2/5
#84H1L2hlgG2, 1 mg/kg, 単回投与 ip	456	74	0/5
#84H1L2hlgG2, 10 mg/kg, 単回投与 ip	339	81	4/5
#84H1L2hlgG4P, 1 mg/kg, 単回投与 ip	471	73	0/5
#84H1L2hlgG4P, 10 mg/kg, 単回投与 ip	6	100	4/5
#110H1L4hlgG4P, 1 mg/kg 単回投与 ip	410	76	0/5
#110H1L4hlgG4P, 10 mg/kg, 単回投与 ip	257	85	2/5

[0356] （実施例16） T細胞及びPBMCに対する作用

CD147はT細胞の活性化に伴いCD4陽性、CD8陽性のT細胞で発現が上昇し（Hu et al., J. Cell. Mol. Med., 21:32-2143, 2010）、一部のCD147抗体では、T細胞の活性化誘導能や増殖を阻害する効果が報告されている（Koch et al., Int. Immunology, 777-786, 1999; Chiamp anichayakul et al., Immunology 167-178, 2006）。エフェクター機能に依存せず、強い抗腫瘍効果を示す抗ヒトCD147抗体が、T細胞を含む末梢血リンパ球（PBL）に及ぼす影響を調べた。

[0357] 16) -1 PBMCのCD3/CD28刺激によるCD147の発現上昇

CD147の発現がT細胞の活性化に伴い上昇するか、ヒトPBMCを用いて調べた。ヒトPBMCを10%FBSを含むRPMI1640培地で、37℃、5%CO2存在下で培養した。培養時に、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (CD3/CD28 beads, Thermofishers scientific社、Cat. 1131D) を添加し増殖を誘導し、4日後にフローサイトメーター

の解析を実施し、CD147の発現が変化するか調べた。ヒトCD147の発現確認には、市販の抗ヒトCD147抗体としてAPCラベルされた抗ヒトCD147マウスIgG1抗体MEM-M6/1-APC (CD147-APC, Thermofisher, Cat. MA1-10104) を用いた。マウスIgG1 Isotype control抗体としてmIgG1-APC (ミルテニーバイオ社、Cat. 130-092-214) を用いた。ヒトPBMCに含まれるT細胞のCD3, CD4, CD8を検出するために、APC/Fire™ 750 anti-human CD3 Antibody (BioLegend社製, Cat. 344840)、PerCP/Cy5.5 anti-human CD4 (BioLegend社製, Cat. 344608)、Brilliant Violet 510 anti-human CD8 (BioLegend社製, Cat. 344732) を用いた。

[0358] CD3, CD4陽性の細胞及びCD3, CD8陽性の細胞におけるCD147-APCの結合を図30にまとめた。CD3, CD4陽性の細胞及びCD3, CD8陽性の細胞において、CD3/CD28 beads刺激した場合に、CD147の発現上昇が確認され、T細胞の活性化に伴いCD147のT細胞膜表面上の発現が上昇することが確認された。

[0359] 16) -2 ヒト末梢血単核球の増殖における抗ヒトCD147抗体作用の評価

ヒト末梢血単核球 (PBMC) の増殖における抗ヒトCD147抗体作用を解析した。抗ヒトCD147抗体として、2P10F2chIgG4Pを用いた。CellVue Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Kit (sigma, Cat. MIDCLARET-1KT) を用いて、PBMCを蛍光ラベルした後に、10% FBSを含むRPMI 1640培地で、37℃、5%CO₂存在下で培養した。培養時に、IL-2、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (CD3/CD28 beads, Ther

m o f i s h e r s s c i e n t i f i c 社、C a t . 1 1 3 1 D) を添加し増殖を誘導した際に 2 P 1 0 F 2 c h I g G 4 P (1 0 μ g / m l) を加えて、増殖への影響を調べた。培養 3 日、5 日目に、細胞分裂によって減少した P B M C 細胞蛍光シグナルに対しフローサイトメーター (C a n t o I I 、 B D B i o s c i e n c e 社) を用いた測定を実施し、図 3 1 に結果をまとめた。

[0360] C D 3 / C D 2 8 b e a d s の添加によって、細胞分裂によって減少した P B M C 細胞蛍光シグナルが、培養 3 日後、5 日後に観察された。I L - 2 、 2 P 1 0 F 2 c h I g G 4 P 、 又は I L - 2 と 2 P 1 0 F 2 c h I g G 4 P を培養時に添加した場合に、蛍光シグナルの減少に変化は見られなかった。実施例 1) - 1 8 で示したヒト脾臓癌のマウス腫瘍モデルにおいて強い抗腫瘍効果を示した抗ヒト C D 1 4 7 ヒトキメラ抗体 2 P 1 0 F 2 c h I g G 4 P は、P B M C の増殖には、影響を与えないことが示唆された。

[0361] 1 6) - 3 ヒト末梢血リンパ球のサイトカイン産生における抗ヒト C D 1 4 7 抗体の評価

抗ヒト C D 1 4 7 抗体として、ヒトキメラ抗体 # 8 4 c h I g G 1 、 # 8 4 c h I g G 2 、 # 8 4 c h I g G 4 P 、 # 8 4 c h I g G 1 L A L A 、 # 8 4 c h I g G 4 P F A L A 、 # 1 0 1 c h I g G 4 P 又は # 1 1 0 c h I g G 4 P を用いた。ヒト末梢血より F i c o l l - P a q u e P L U S (G E ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて、P B L を調製した。9 6 ウェルプレートに 1 0 μ g / m l のヒトキメラ抗体をコートした。陰性コントロール抗体としてヒト I g G (h I g G , J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 社、0 0 9 - 0 0 0 - 0 0 3) 、 T 細胞の活性化やサイトカイン誘導を誘導する陽性コントロール抗体として D y n a b e a d s H u m a n T - A c t i v a t o r C D 3 / C D 2 8 (C D 3 / C D 2 8 - b e a d s 、 T h e r m o f i s h e r s s c i e n t i f i c 社、C a t . 1 1 3 1 D) を用いた。抗体をコートしたウェルに 1×10^6 の P B L を加え、2 4 時間後に、培地中のサイトカイン (I L 2 , T N F α 、 I N F

γ) を測定した。Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28は、PBLを加えたウェルに直接添加し、同様に24時間後に、培地中のサイトカイン (IL2, TNF α 、INF γ) を測定した。IL2の測定には、Quantikine ELISA Human IL-2 (R&D systems, Cat. D2050) を用いた。TNF α の測定には、Amersham TNF- α Human, Biotrak Easy ELISA (GEヘルスケア・ジャパン株式会社, Cat. RPN5967) を用いた。INF γ の測定には、Human IFN- γ ELISA development kit (MABTECH社, Cat. 3420-1H-6) を用いた。測定は3重に実施し、検出された吸光度の平均値と標準偏差を算出し、図32にまとめた。

[0362] 測定したPBLより産生されたサイトカイン (IL2, TNF α 、INF γ) は、いずれも陽性コントロールであるCD3/CD28-beadsを添加したウェルでの培養でのみ上昇が確認され、いずれの抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体コートしたウェルでの培養でも、陰性コントロールであるhIgGと同様にサイトカインの上昇は認められなかった。

[0363] (実施例17) ヒト化#110Fab'-CD147複合体のX線結晶構造解析

17) -1 複合体の結晶化

ヒト化#110H1L4hIgG4PをPepsinにより切断して得られたFab' 2を、Dithiothreitolで還元した後、Iodoacetamideによりアルキル化することでFab' 断片を取得した。このFab' 断片と実施例5) で用いたhCD147v2 (22-205) の混合物をSuperdex 10/300GL Increaseカラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供与し、複合体画分を取得した。複合体はAmiconUltra15 MWCO 10K (ミリポア社製) で緩衝液 (10mM Tris HCl pH 7.5、50mM NaCl) に置換し、13g/Lに濃縮した。複合体溶

液を蒸気拡散法により結晶化した。タンパク質溶液0.5 μ Lに沈殿剤溶液(0.1 M NaMalonate pH 7.0、12% (w/v) Polyethylene Glycol 3350)を等量加えた溶液を、0.05 mLの沈殿剤溶液を入れた密閉容器に両溶液が触れ合わないよう収め、25°Cで静置した。約1週間後に得られた0.15 mm $\times$ 0.15 mm $\times$ 0.3 mmの結晶を30% (w/v)になる様にPolyethylene Glycol 400を加えた沈殿剤溶液に浸してから液体窒素で凍結した。放射光施設フotonファクトリー(茨城県、日本)のビームラインPF-BL17AにてX線回折データを収集した。得られた回折像からソフトウェアmosflm(CCP4: Collaborative Computational Project No. 4)を用いて回折強度を数値化し、結晶構造因子を求めた。結晶の空間群はP21、結晶の単位格子は($a=64.96$ Å, $b=93.37$ Å, $c=98.31$ Å, $\alpha=\gamma=90$ 、 $\beta=90.89$)であった。

[0364] 17) - 2 複合体の構造解析

得られた構造因子とFab'断片のホモロジーモデルおよびヒトCD147の既知構造(PDB ID: 3b5h)の三次元構造座標を用いて分子置換法を行い、位相を決定した。計算にはソフトウェアphaser(CCP4: Collaborative Computational Project No. 4)を使用した。結晶は非対称単位に2つの複合体を含んでいた。ソフトウェアRefmac5(CCP4: Collaborative Computational Project No. 4)を用いて構造の精密化を行い、ソフトウェアcootを用いてモデルの修正を行った。この操作を繰り返し行い、2.3 Å分解能で最終のR値23%、free R値28%を得た。最終のモデルはヒト化#110H1L4のFab'断片を2つと、それぞれに結合するhCD147v2を含む。なお、片方のhCD147v2についてはアミノ酸残基23-203に相当する電子密度が認められたが、もう片方についてはドメイン1に相当する電子密度は明瞭では

なく、アミノ酸残基103-202に相当する電子密度のみ認められた。

[0365] 17) -3 エピトープの特定

非対称単位に含まれる2つの複合体において共通してヒト化#110H1L4のFab'断片の結合面から4 Å以内にあるhCD147v2のアミノ酸残基は以下の通りである: Arg106、Lys108、Ala109、Val110、Lys127、Ser128、Glu129、Ser130、Val131、Pro132、Pro133、Val134、Gln164、Gly165。図41に複合体全体のリボンモデルと表面を、図42にhCD147v2とヒト化#110H1L4との相互作用を示した。

[0366] (実施例18) 胃癌モデルにおけるヒト化CD147抗体の抗腫瘍効果

フローサイトメーターによりCD147陽性が確認されたヒト胃癌細胞株KATO III細胞(ATCC, Cat. HTB-103)について、抗ヒトCD147ヒトキメラ抗体とヒト化抗体の抗腫瘍効果を検討した。

[0367] 5×10^6 細胞のヒト胃癌株KATO IIIを100%Matrigel (Corning社, Cat. 354234)で懸濁し、5週例雌のNOD-scidマウス(NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本クレアより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植後3日後に群分けを実施し、ヒトキメラCD147抗体(LN22R8chlg4P)、実施例6)-4-2で作製したヒト化CD147抗体(#110H1L4hlg4P)を10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に、群分け後7日ごとに投与した(n=6)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0368] 腫瘍体積(mm³) = $1/2 \times \text{短径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times \text{長径(mm)}$

結果を図43に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

未処理群のマウスの腫瘍の平均体積は、移植から24日後に290mm³であ

るのに対し、LN22R8chlgG4p投与群では、 199 mm^3 、#110H1L4hlgG4P投与群では、 134 mm^3 であり、算出された抗腫瘍効果は、LN22R8chlgG4p投与群で31%、#110H1L4hlgG4P投与群では、54%であった。

[0369] (実施例19) 慢性骨髄性白血病モデルにおけるヒト化CD147抗体の抗腫瘍効果

フローサイトメーターによりCD147陽性が確認されたヒト慢性骨髄性白血病細胞株KU812細胞(ATCC, Cat. CRL-2099)について、抗ヒトCD147ヒト化抗体の抗腫瘍効果を検討した。

[0370] 5×10^6 細胞の慢性骨髄性白血病細胞株KU812を50%Matrigel(Corning社, Cat. 354234)を含むPBSで懸濁し、5週例雌のNOD-scidマウス(NOD, CB17-Prkdc^{scid}/J、日本クレアより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植後3日後に群分けを実施し、実施例6) -4-2で作製したヒト化CD147抗体(#110H1L4hlg4P)を 10 mg/kg で担癌マウスの腹腔内に、群分け後7日ごとに投与した($n=5$)。対照薬として慢性骨髄性白血病の治療薬であるイマチニブ(ASTATECH社, Cat. #63168)を 9 mg/ml 溶液に蒸留水で調製し、 90 mg/kg で担癌マウスに経口投与した(土日休薬連投、移植後4、7、8、9、10、11、14、15、16、17、18、21、22、23、24日後に投与)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0371] 腫瘍体積(mm^3) = $1/2 \times \text{短径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm}) \times \text{長径}(\text{mm})$

結果を図44に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

未処理群のマウスの腫瘍の平均体積は、移植から25日後に 627 mm^3 であるのに対し、イマチニブ投与群では、 328 mm^3 、#110H1L4hlg

G4P投与群のでは、 6 mm^3 であり、算出された抗腫瘍効果は、イマチニブ投与群で48%、#110H1L4hlgG4P投与群では、97%であった。#110H1L4hlgG4P投与群でのみ、5例中4例で腫瘍の完全縮退が観察された。

[0372] (実施例20) 大腸癌モデルにおけるヒト化CD147抗体の抗腫瘍効果
フローサイトメーターによりCD147陽性が確認されたヒト大腸癌細胞株SW620細胞(ATCC, Cat. CCL-227)について、ヒト化抗体の抗腫瘍効果を検討した。

[0373] 5×10^6 細胞のヒト大腸癌株SW620を100%Matrigel (Corning社、Cat. 354234)で懸濁し、5週例雌のNOD-scidマウス(NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本クレアより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植後3日後に群分けを実施し、ヒトキメラCD147抗体(LN22R8hlgG4P)、実施例6) - 4 - 2で作製したヒト化CD147抗体(#084H1L2hlg4Pあるいは#110H1L4hlg4P)を 10 mg/kg で担癌マウスの腹腔内に、群分け後7日ごとに投与した($n=5$)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0374] 腫瘍体積(mm^3) = $1/2 \times \text{短径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm}) \times \text{長径}(\text{mm})$

結果を図45に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

未処理群のマウスの腫瘍の平均体積は、移植から21日後に 1302 mm^3 であるのに対し、#084H1L2hlg4P投与群では、 709 mm^3 、#110H1L4hlgG4P投与群のでは、 403 mm^3 であり、算出された抗腫瘍効果は、#084H1L2hlg4P投与群で46%、#110H1L4hlgG4P投与群では、69%であった。

[0375] (実施例21) 腎臓癌786-Oモデルにおけるヒト化CD147抗体の抗

腫瘍効果

フローサイトメーターによりCD147陽性が確認されたヒト腎臓癌786-Oについて、ヒト化抗体の抗腫瘍効果を検討した。

5×10^6 細胞のヒト腎臓癌786-Oを50%Matrigel (Corning社、Cat. 354234) をで懸濁し、5週例雌のNOD-scidマウス (NOD, CB17-Prkdc<scid>/J、日本クレアより購入) の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植後3日後に群分けを実施し、ヒトキメラCD147抗体 (LN22R8chlgG4P)、実施例6)-4-2で作製したヒト化CD147抗体 (#084H1L2hlg4Pあるいは#110H1L4hlg4P) を10mg/kgで担癌マウスの腹腔内に、群分け後7日ごとに計4回投与した (n=6)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス (株式会社ミットヨ製) を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0376] 腫瘍体積 (mm³) = $1/2 \times \text{短径 (mm)} \times \text{短径 (mm)} \times \text{長径 (mm)}$

結果を図46に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

未処理群のマウスの腫瘍の平均体積は、移植から31日後に918mm³であるのに対し、#084H1L2hlg4P投与群では、224mm³、#110H1L4hlg4P投与群のでは、379mm³であり、算出された抗腫瘍効果は、#084H1L2hlg4P投与群で76%、#110H1L4hlg4P投与群では、59%であった。

[0377] (実施例22) 急性骨髄性白血病 (AML) モデルにおけるヒト化CD147抗体の抗腫瘍効果

フローサイトメーターによりCD147陽性が確認されたヒトAML細胞株OCI-AML3細胞 (DSMZ, Cat. ACC 582) について、ヒト化抗体の抗腫瘍効果を検討した。

[0378] 5×10^6 細胞のヒトAML細胞株OCI-AML3細胞を50% GFR

－Matrigel (Corning社、Cat. 354230) で懸濁し、5週例雌のNOD-scidマウス(NOD, CB17-Prkdc^{scid}/J、日本クレアより購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに移植後3日後に群分けを実施し、実施例6)－4－2で作製したヒト化CD147抗体(#110H1L4hlg4P)を尾静脈注射により、10mg/kgで担癌マウスに群分け後7日ごとに投与した(n=6)。移植腫瘍の長径及び短径を週2回、電子デジタルノギス(株式会社ミットヨ製)を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0379] 腫瘍体積 (mm³) = 1/2 × 短径 (mm) × 短径 (mm) × 長径 (mm)

結果を図47に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

未処理群のマウスの腫瘍の平均体積は、移植から21日後に1533mm³であるのに対し、#110H1L4hlg4P投与群では、394mm³であり、算出された抗腫瘍効果は、#110H1L4hlg4P投与群では、74%であった。

[0380] (実施例23) 結合性の異なるヒト化抗CD147抗体の活性測定

5×10⁶細胞のヒト膵臓株MIA PaCa-2を50%GFR-Matrigel (Corning社、Cat. 354230) を含むPBSで懸濁し、4週例雌のNudeマウス(BALB/c Slc-nu/nu、日本エスエルシー(株)より購入)の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに群分けをし、移植の7日後に実施例6)－4－2で作製したCD147蛋白質への結合性が異なる3種のヒト化CD147抗体(#110H1L4hlg4P、#110H13L02hlg4P及び#110H13L12hlg4P、表6に結合性を記載)を10mg/kgで担癌マウスに尾静脈投与した(n=6)。対照薬として膵臓癌の治療薬であるゲムシタビン(日本イーライリリー社より購入)を移植の3、10日後に400mg/kgで担癌マウスに尾静脈投与した(n=6)。移植腫瘍の長径及び短径を

週2回、電子デジタルノギス（株式会社ミットヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0381] 結果を図48に示した。グラフには腫瘍体積の変化について、平均値と標準誤差を併せて記載した。

[0382] 対照薬のゲムシタピンの腫瘍増殖抑制率は、66%であったのに対し、いずれのヒト化CD147抗体も、10 mg/kg投与群でゲムシタビンよりも優れた抗腫瘍効果を示した。

[0383] （実施例24） CD147抗体の比較

24) - 1 既存の抗CD147抗体の抗原結合性評価

競合抗体として、WO2010/036460の4A5、5F6抗体、WO2017/061602のPPAT-082-03の特許記載配列に基づき、精製抗体を調製した。CD147蛋白質との解離定数測定は、Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience社製) を使用し、Human Antibody Capture Kit (GE Healthcare Bioscience社製) を用いて固定化したAnti-Human IgG (Fc) antibodyに抗体をリガンドとして捕捉（キャプチャー）し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。ランニングバッファーとしてHBS-EP+ (GE Healthcare Bioscience社製)、センサーチップとしてCM5 (GE Healthcare Bioscience社製) を用いた。チップ上に1 μg/mLの競合抗体を10 μL/分で60秒間添加した後、実施例2) - 5で用いた抗原の希釈系列溶液（0.5~8 μg/mL）を流速30 μL/分で120秒間添加し、引き続き300秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、3M magnesium chloride (GE Healthcare Bioscience社製) を流速20 μL/分で30秒間添加した。データの解析には1:1結合モデルを用いて、結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 及び解離定数(K_D ; $K_D = k_d / k_a$)を算出した。ヒト化CD147抗体(#084H1L2hlg

G4Pあるいは#110H1L4hIgG4P)の解離定数は、実施例7)－1の方法で算出した。

[0384] 表8には、算出した解離定数、エフェクター機能、エピトープ領域に関する情報を示す。

[0385] [表8]

抗体	抗体フォーマット	KD (nM)	エフェクター機能	エピトープ領域
#110H1L4h	ヒトIgG4P	8.60	ADCC (-) CDC (-) ADCP (±)	配列番号3 (ヒト CD147 のバリエント2) の Arg106 から Gly165
#084H1L2h	ヒトIgG4P	242	ADCC (-) CDC (-) ADCP (+)	配列番号3 (ヒト CD147 のバリエント2) の Asp65 から Gln81 近傍
4A5	マウスIgG2a	132	ADCC (+) CDC (+) ADCP (+)	#084H1L2h IgG4P に競合
5F6	ヒトIgG1	71.9	ADCC (+) CDC (-) ADCP (+)	#084H1L2h IgG4P に競合
PPAT-082-03	ヒトIgG1	33.2	ADCC (+) CDC (-) ADCP (+)	#084H1L2h IgG4P に競合

[0386] 24)－2 既存のCD147抗体との競合ELISA

実施例6)－4－2で作製したヒト化CD147抗体(#084H1L2hIgG4Pあるいは#110H1L4hIgG4P)を用いRecombinant Human CD147/Fc (Sino Biological社, Cat. 10186-H02H)への結合性を競合ELISAで評価した。競合抗体として、24)－1で調製した4A5、5F6抗体、PPAT-082-03抗体を使用した。競合陰性対照抗体として、ヒトIgG (ジャクソン社, Cat. 130093)を用いた。競合陽性対照抗体として、#084H1L2hIgG4P抗体に対し、#84H1L2hIgG2抗体、#110H1L4hIgG4Pに対し#110chIgG2抗体を用いた。

[0387] 96ウェルプレート (サーモサイエンティフィック社, Cat. 43454)にPBSで希釈したRecombinant Human CD147/Fcを2 µg/ml、50 µl/wellで添加し、4℃で一晩保存した。蛋白溶液を除いた後に1%BSAを含むPBSを300 µl添加し、

1時間室温で加温した。溶液を除き、25 u lの既存の抗体液（0、0.2、2、20 u g / m l）を添加し、2時間室温で加温した。20 n g / m lの濃度の25 u lのヒト化CD147抗体（#084H1L2hlg4Pあるいは#110H1L4hlg4P）を各ウェルに添加し、2時間室温で加温した。0.05% Tween 20（BIO RAD社、Cat. 170-6531）を含むPBSで2回洗浄した後、50 u lの1% BSAを含むPBSで2000倍希釈した抗ヒトIgG4-HRP（アブカム社、Cat. ab99823）を添加し、1時間室温で加温した。0.05% Tween 20（BIO RAD社、Cat. 170-6531）を含むPBSで3回洗浄した後、十分に洗浄液をきり、HRP基質液（eBioscience社、Cat. 00-4203-58）を50 u l加え、15～20分室温で加温後、405 nmの吸光度をプレートリーダー（パーキンエルマー社、モデル名EnVision2104）で測定した。

[0388] 結果を表8および図49（a）、（b）に示す。

[0389] #084H1L2hlg4PのRecombinant Human CD147 /Fcへの結合は、hlgG存在下では1～10 u g / m lの既存のCD147抗体存在下で阻害された。#110H1L4hlg4PのRecombinant Human CD147 /Fcへの結合は、hlgG存、0.1～10 u g / m lの既存のCD147抗体存在下で阻害されず、#110chlgG2抗体の存在下で阻害された。#084H1L2hlg4Pのエピトープは、既存の抗CD147抗体の結合により競合を受けるが、#110H1L4hlg4Pのエピトープは既存の抗CD147抗体の結合により影響を受けないことがわかった。

実施例17)－3で示されたH110H1L4h抗体のエピトープ情報を表8に記載した。実施例1)－9のCD147変異体を用いた解析でエピトープが推定された2P10F2抗体との結合競合性試験結果（実施例2)－8）から、#084H1L2hのエピトープ領域を推定し、表8に記載した。

[0390] 24)－3 抗CD147抗体のADCC評価

実施例1) - 15の手法に従い、抗CD147抗体のADCC活性を評価した。実施例1) - 15の手法と異なる条件として、ADCC標的細胞としてHepG2細胞(ATCC, Cat. HB-8065)を用い、CD147抗体として#110H1L4hlgG4P、#084H1L2hlg4P、4A5、5F6、PPAT-082-03を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で評価した。測定は3重に実施し、平均値、標準偏差を算出した。5%以上の細胞の ^{51}Cr が検出された場合に、ADCC陽性(+)とした。5%未満の場合をADCC活性陰性(-)とした。結果を表8に示した。

[0391] #110H1L4hlgG4P、#084H1L2hlg4Pは、ADCC活性が検出されず、ADCC(-)と判定した。4A5、5F6、PPAT-082-03は、5%以上の細胞の ^{51}Cr が検出され、ADCC陽性(+)とした。#110H1L4hlgG4P、#084H1L2hlg4Pは、ADCC陰性であり、ヒトの生体内でCD147を発現している血液細胞などの正常細胞に対して細胞死を誘導する可能性が、ADCC活性陽性の4A5、5F6、PPAT-082-03よりも低いことが予測される。

[0392] 24) - 4 抗CD147抗体のCDC評価

実施例1) - 16の手法に従い、抗ヒトCD147抗体による補体依存的な殺細胞活性(CDC活性)を評価した。実施例1) - 16の手法と異なる条件として、標的細胞としてヒト肝臓株HepG2細胞(ATCC, Cat. HB-8065)を用い、抗ヒトCD147抗体として、#110H1L4hlgG4P、#084H1L2hlg4P、4A5、5F6およびPPAT-082-03を用い、ウサギ補体を終濃度8%となるように添加し、測定した。測定は3重に実施し、平均値と標準偏差を算出した。30%以上の抗体依存的なCDC活性が認められた抗体については、CDC活性陽性とし、表にCDC(+)と記載した。結果を表8に示した。抗ヒトCD147抗体は、4A5のみCDC活性陽性を示した。#110H1L4hlgG4P、#084H1L2hlg4P、5F6、PPAT-082-03は、CDC陰性であり、ヒトの生体内でCD147を発現している血液細胞などの正

常細胞に対して細胞死を誘導する可能性が、CDC活性陽性の4A5よりも低いことが予測される。

24) - 5 抗CD147抗体のADCP評価

実施例1) - 17の手法に従い、抗CD147抗体のADCP活性を測定した。実施例1) - 17の手法と異なる条件として、標的細胞としてヒト肝臓株HepG2細胞(ATCC, Cat. HB-8065)を用い、抗CD147抗体として#110H1L4hlgG4P、#084H1L2hlgG4P、4A5、5F6、PPAT-082-03を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、標識したRAW264.7細胞はADCP標的細胞の等量添加し、ADCP活性を測定した。測定は3重に実施し、平均値、標準偏差を算出し、ヒトIgG処理群より10%未満のADCP活性上昇を弱陽性(±)、10%以上の活性上昇を陽性(+)として表8に示した。

[0393] #110H1L4hlgG4P のADCP活性は10%未満でありADCC活性±と判定した。#084H1L2hlgG4P、4A5、5F6、PPAT-082-03抗体のADCP活性は10%以上であり、ADCP活性+と判定した。CD147-D2を認識する#110H1L4hlgG4Pは、CD147-D1を認識する他のCD147抗体よりもADCP活性が低かった。ADCPは、CD147抗体がCD147に結合した後に、マクロファージや単核球細胞上に発現するFc γ 受容体によって、抗体のFC部分が認識されることが必要であるが、#110抗体のエピトープが細胞表面に近く、抗原であるCD147に結合した抗体のFC部分が、他のCD147-D1を認識する抗体よりもFc γ 受容体によって認識されにくく、ADCP活性が低い可能性がある。#110H1L4hlgG4P、ADCP活性が弱陽性であり、ヒトの生体内でCD147を発現している血液細胞などの正常細胞に対して細胞死を誘導する可能性が、ADCP活性陽性の#084H1L2hlgG4P、4A5、5F6、PPAT-082-03よりも低いことが予測される。

[0394] (実施例25)

25) - 1 抗CD147抗体による血液系細胞凝集

一部の抗CD147抗体は、血球系細胞の凝集を誘導することが報告されている (Kasirerから *Immunology* 1999, 96 (2) p184-192)。血球系細胞の凝集は、重篤な血液毒性を引き起こす可能性があり (Doll, C., et al., 1994, *Curr. Opin. Oncol.*, 345-350)、治療用抗体としては望ましくない性質である。抗CD147抗体について、細胞集積の活性の違いを調べた。CD147抗体として#110H1L4hlgG4P、#084H1L2hlg4P、4A5、5F6、PPAT-082-03を評価した。陰性の対照抗体としてヒトIgG (hlgG, ChromPure Human IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories社, Cat. 009-000-003) を用いた。HEL92.1.7細胞 (ATCCより購入、Cat. #TIB-180) を96ウェルUボトムプレート (住友ベークライト社、Cat. MS-9096U) に1ウェルあたり、1600細胞 / 80 μ L 10%FBS (ハイクローン社、Cat. SH30084.03) を含むRPMI1640培地 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、Cat. 11875-093) を添加し、4時間、5%CO₂、湿度95%、37度の条件で培養した。各ウェルに20 μ Lの抗CD147抗体溶液 (150 μ g/mL, 50 μ g/mL) を加え、終濃度30、10 μ g/mLとした。5%CO₂、湿度95%、37度の条件で2日間培養し、顕微鏡観察を実施した。

[0395] ヒトIgG、#110H1L4hlgG4Pの添加による細胞の集積は観察されなかったのに対し、#084H1L2hlg4P、4A5、5F6、PPAT-082-03抗体の存在下では、細胞が集積し、プレートの中央に折り重なった細胞塊が観察された。CD147-D2を認識する#110H1L4hlgG4Pは、CD147-D1ドメインを認識する他のCD147抗体とは異なり、血液細胞の凝集活性が無いことが示された。#084をはじめとする細胞凝集活性のあるCD147抗体は、ヒトに投与した場合

に、血液細胞の凝集を介した血栓などの毒性を生じる恐れがあるので、血栓の治療に用いられる用量のヘパリンないし低分子ヘパリンの皮下注、又は抗血小板薬の併用などによって副作用を回避あるいは軽減することが望ましい。

[0396] 25) - 2 サイトカイン放出症候群のリスク評価

治療用抗体の投与によって、OKT3、TGN1412など一部の抗体では、免疫細胞を活性化させることで、血中のサイトカインが上昇し、重篤なサイトカイン放出症候群を引き起こす (Gaston, R., *Kidney International*, 1991, 141-148; Suntharalingam, G., et al., *N. Engl. J. Med.* 2006, 1018-1028)。一部のCD147抗体は、免疫細胞に作用し、インターフェロンガンマやインターロイキン-4の産生を増加する作用が報告されている (Hu, J., et al., *J. Cell. Mol. Med.*, 2010, 2132-2143)。このサイトカイン放出症候群による抗体医薬の毒性は、末梢血を用いたサイトカインリリースアッセイにより予測することができる (Vessillier, S. et al., *J. Immunol. Methods*, 2015, 43-52)。同様のヒト末梢血サイトカインリリースアッセイによりサイトカイン放出症候群のリスクを評価した。CD147抗体として#110H1L4hlgG4P、#110chlgG4ProFALA、#084H1L2hlg4P、#084H1L2hlg2を用い、比較抗体として、ベバシズマブ (Genentech, Inc.)、トラツズマブ (Roche Pharma AG)、アレムツズマブ (サノフィ株式会社)、抗ヒトCD3抗体 (BioLegend Cat. No317326) を用いた。評価した全てのCD147抗体については、ヒト末梢血単核球 (6ドナー分をそれぞれ評価) に対し、細胞増殖の亢進は認められず、サイトカインの放出 (TNF α 、INF- γ 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、MIP-1 α) への影響は、サイトカイン放出症候群のリスクが低いベバシズマブよりも弱かった。抗ヒトC

D3抗体(OKT3)では、細胞増殖の亢進、サイトカインの放出(TNF α 、INF- γ 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、MIP-1 α)の亢進が観察された。#110H1L4hIgG4P、#110chIgG4ProFALA、#084H1L2hIg4P、#084H1L2hIg2は、サイトカイン放出症候群の可能性となるサイトカインリリースを誘導しないことが示された。

[0397] 25) - 3 抗CD147抗体のサル安全性評価

一部の抗マウスCD147抗体は、マウスに投与した際に、CD147の機能を阻害し、脾臓での赤血球の集積を誘導することで、末梢血中の赤血球量が低下し、貧血を引き起こすことが報告されている(Coste, I. et al., Blood, 2001, 3984-3988)。本発明の中で取得した#110H1L4hIgG4PなどのCD147抗体は、マウスのCD147に結合を示さないため、マウスでの安全性評価は適切ではない。そこで、フローサイトメーターを用いた実験によりヒトおよびサルCD147への結合性が確認された抗CD147抗体として、#110H1L4hIgG4Pをカニクイザルに投与し、安全性を評価した。カニクイザル(雌雄各1例)に#110H1L4hIgG4Pを投与可能最大量である99.2 mg/kgで単回静脈内投与した結果、投与後15日までの観察期間と観察期間終了時の病理組織学的検査では、重篤な毒性(体重および摂餌量の変化、病理組織学的変化)は観察されなかった。#110H1L4hIgG4Pは、カニクイザルに対して毒性を示さず、ヒトの癌治療に利用できる可能性が示された。

[0398] (実施例26) KLF5のCD147抗体感受性への影響

癌細胞において、SMAD2/SMAD3/SMAD4依存的な細胞死のシグナルとしてLethal EMTシグナルが知られており、このLethal EMTシグナルは、SMAD4陰性の癌細胞では、通常SMADシグナルによって抑制されている転写因子KLF5蛋白質の発現が増加し、致死性のシグナルを抑制することが報告されている(David, C. Cell

l, 2016, 1015-1030)。本発明のCD147抗体は、SMADシグナルを活性化し、SMAD4陽性の細胞に抗腫瘍効果を示すことから、SMADシグナル依存的な細胞死を誘導すると考えた。KLF5がCD147抗体依存的な抗腫瘍効果の感受性に関与するか調べた。

[0399] 26) -1 KLF5発現株の作製

実施例13の方法に準じ、MIA PaCa-2細胞のKLF5安定発現株を作製した。ヒトKLF5のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号145及び146に示す。KLF5遺伝子として、(Gen script社、Cat. OHu21278C)に含まれる配列(Ref seq. ID: NM_001730.4)を組み込んだレトロウイルスベクターpQCXIPを作製し、レトロウイルスを作製に用いた。ウイルス感染により染色体にレトロウイルスが組み込まれ、ピューロマイシン耐性、KLF5陽性となったMIA PaCa-2細胞を選択し、KLF5陽性MIA PaCa-2細胞、MIA PaCa-2-KLF5とした。レトロウイルスベクターpQCXIPを同様に感染させ、ピューロマイシン耐性となったMIA PaCa-2細胞をMIA PaCa-2-mockとした。

[0400] 26) -2 CD147とSMAD4発現の確認

フローサイトメーターにより、MIA PaCa-2-mockとMIA PaCa-2-KLF5のCD147の発現を確認した。実施例13-2の方法に準じ、MIA PaCa-2-KLF5のKLF5の発現量がMIA PaCa-2-mockから増加していることを確認した。KLF5の検出には、KLF5抗体(CST社、Cat. #51586)を用いた。

26) -3 KLF5を発現したMIA PaCa-2腫瘍のヒト化CD147抗体への感受性

実施例7)-2の方法に準じ、MIA PaCa-2-KLF5とMIA PaCa-2-mockの腫瘍のヒト化CD147抗体#110H1L4hlgG4Pへの感受性を比較した。細胞移植の3日後に実施例6)-4-2で作製したヒト化CD147抗体(#110H1L4hlg4P)を1

mg/kgで担癌マウスに尾静脈投与した（n=6）。7日後に同様に抗体を投与した。対照群の担癌マウスには、PBS緩衝液を同様に尾静脈投与した（n=6）。結果を図50に示す。

- [0401] ヒト化CD147抗体を投与して14日後では、MIA PaCa-2-mockの腫瘍は対照群の9%まで腫瘍の平均体積が減少しており、CD147抗体に感受性を示した。MIA PaCa-2-KLF5の腫瘍の平均体積は、対照群の80%となっており、CD147抗体に低感受性を示した。CD147抗体によるSMADシグナル依存的な抗腫瘍効果は、KLF5の発現によって抑制されることがわかった。

産業上の利用可能性

- [0402] 本発明によりCD147を活性化し、高い抗腫瘍効果を示すCD147特異的抗体が提供される。本発明により、エフェクター機能に依存せずに高い抗腫瘍効果を示す抗体が提供される。本発明の抗体は、肝臓癌細胞において、肝臓癌の標準治療薬のうちの1つとして使用されるソラフェニブよりも顕著に強い薬効を示す。本発明の抗体は、膵臓癌細胞において、膵臓癌の標準治療薬のうちの1つとして使用されるゲムシタビンよりも顕著に強い薬効を示す。また、本発明の抗体は、慢性骨髄性白血病細胞において、慢性骨髄性白血病の標準治療薬のうちの1つとして使用されるイマチニブよりも顕著に強い薬効を示す。本発明の抗体は、その抗腫瘍効果がエフェクター機能に依存せず、その他の安全性評価項目においても懸念が少なく安全性に優れた抗CD147抗体が提供される。CD147は腫瘍細胞だけでなく血液細胞にも発現しているが、本発明の抗体は、T細胞及びPBMCに対して作用せずかつエフェクター機能にも依存しないため、抗腫瘍剤としての開発において、安全性の懸念が少ないという利点を有する。本発明により上記抗体を含む医薬組成物、並びに、該抗体および／または該医薬組成物を用いた腫瘍の治療方法が提供される。

配列表フリーテキスト

- [0403] 配列番号1：ヒトCD147のバリエーション1のアミノ酸配列

- 配列番号 2 : ヒト C D 1 4 7 のバリエーション 1 のヌクレオチド配列
- 配列番号 3 : ヒト C D 1 4 7 のバリエーション 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 4 : ヒト C D 1 4 7 のバリエーション 2 のヌクレオチド配列
- 配列番号 5 : ヒト S M A D 4 のアミノ酸配列
- 配列番号 6 : ヒト S M A D 4 のヌクレオチド配列
- 配列番号 7 : L N 2 2 R 8 の軽鎖の可変領域のヌクレオチド配列
- 配列番号 8 : L N 2 2 R 8 の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 9 : L N 2 2 R 8 の重鎖の可変領域のヌクレオチド配列
- 配列番号 10 : L N 2 2 R 8 の重鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 11 : L N 2 2 R 8 の C D R L 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 12 : L N 2 2 R 8 の C D R L 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 13 : L N 2 2 R 8 の C D R L 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 14 : L N 2 2 R 8 の C D R H 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 15 : L N 2 2 R 8 の C D R H 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 16 : L N 2 2 R 8 の C D R H 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 17 : 2 P 1 0 F 2 の軽鎖の可変領域のヌクレオチド配列
- 配列番号 18 : 2 P 1 0 F 2 の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 19 : 2 P 1 0 F 2 の重鎖の可変領域のヌクレオチド配列
- 配列番号 20 : 2 P 1 0 F 2 の重鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 21 : 2 P 1 0 F 2 の C D R L 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 22 : 2 P 1 0 F 2 の C D R L 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 23 : 2 P 1 0 F 2 の C D R L 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 24 : 2 P 1 0 F 2 の C D R H 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 25 : 2 P 1 0 F 2 の C D R H 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 26 : 2 P 1 0 F 2 の C D R H 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 27 : ヒト軽鎖シグナル配列及びヒト κ 鎖定常領域をコードする D N A 配列を含む D N A 断片
- 配列番号 28 : ヒト重鎖シグナル配列及びヒト I g G 1 定常領域のアミノ酸

をコードするDNA配列を含むDNA断片

配列番号29：ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG2定常領域のアミノ酸

をコードするDNA配列を含むDNA断片

配列番号30：ヒトキメラLN22R8の軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号31：ヒトキメラLN22R8の軽鎖のアミノ酸配列

配列番号32：ヒトキメラLN22R8の重鎖IgG1タイプのヌクレオチド配列

配列番号33：ヒトキメラLN22R8の重鎖IgG1タイプのアミノ酸配列

配列番号34：ヒトキメラLN22R8の重鎖IgG2タイプのヌクレオチド配列

配列番号35：ヒトキメラLN22R8の重鎖IgG2タイプのアミノ酸配列

配列番号36：ヒトキメラLN22R8の重鎖IgG4Pタイプのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むDNA断片

配列番号37：ヒトキメラLN22R8の重鎖IgG4Pタイプのアミノ酸配列

配列番号38：ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1LALA定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片

配列番号39：ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG4P定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片

配列番号40：ヒトキメラ2P10F2の軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号41：ヒトキメラ2P10F2の軽鎖のアミノ酸配列

配列番号42：ヒトキメラ2P10F2の重鎖IgG1LALAタイプのヌクレオチド配列

配列番号43：ヒトキメラ2P10F2の重鎖IgG1LALAタイプのアミノ酸配列

配列番号44：ヒトキメラ2P10F2の重鎖IgG2タイプのヌクレオチド配列

ド配列

配列番号45：ヒトキメラ2 P 1 0 F 2 の重鎖 I g G 2 タイプのアミノ酸配列

配列番号46：ヒトキメラ2 P 1 0 F 2 の重鎖 I g G 4 P タイプのヌクレオチド配列

配列番号47：ヒトキメラ2 P 1 0 F 2 の重鎖 I g G 4 P タイプのアミノ酸配列

配列番号48：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の軽鎖の可変領域のヌクレオチド配列

配列番号49：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号50：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の重鎖の可変領域のヌクレオチド配列

配列番号51：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の重鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号52：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の C D R L 1 のアミノ酸配列

配列番号53：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の C D R L 2 のアミノ酸配列

配列番号54：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の C D R L 3 のアミノ酸配列

配列番号55：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の C D R H 1 のアミノ酸配列

配列番号56：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の C D R H 2 のアミノ酸配列

配列番号57：r a t __ C D 1 4 7 __ # 8 4 (r # 8 4) の C D R H 3 のアミノ酸配列

配列番号58：r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 (r # 1 0 1) の軽鎖の可変

領域のヌクレオチド配列

配列番号59: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号60: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) の重鎖の可変領域のヌクレオチド配列

配列番号61: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) の重鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号62: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号63: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号64: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号65: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号66: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号67: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 0 1 (r # 1 0 1) のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号68: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の軽鎖の可変領域のヌクレオチド配列

配列番号69: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号70: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の重鎖の可変領域のヌクレオチド配列

配列番号71: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の重鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号72: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) のCDRL1の

アミノ酸配列

配列番号73: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の C D R L 2 の

アミノ酸配列

配列番号74: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の C D R L 3 の

アミノ酸配列

配列番号75: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の C D R H 1 の

アミノ酸配列

配列番号76: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の C D R H 2 の

アミノ酸配列

配列番号77: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 1 0 (r # 1 1 0) の C D R H 3 の

アミノ酸配列

配列番号78: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の 軽鎖の可変領

域のヌクレオチド配列

配列番号79: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の 軽鎖の可変領

域のアミノ酸配列

配列番号80: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の 重鎖の可変領

域のヌクレオチド配列

配列番号81: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の 重鎖の可変領

域のアミノ酸配列

配列番号82: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の C D R L 1 の

アミノ酸配列

配列番号83: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の C D R L 2 の

アミノ酸配列

配列番号84: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の C D R L 3 の

アミノ酸配列

配列番号85: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の C D R H 1 の

アミノ酸配列

配列番号86: r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の C D R H 2 の

アミノ酸配列

配列番号 87 : r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 1 3 1 (r # 1 3 1) の C D R H 3 の
アミノ酸配列

配列番号 88 : ヒト重鎖シグナル配列及びヒト I g G 4 P F A L A 定常領域
のアミノ酸をコードする DNA 配列を含む DNA 断片

配列番号 89 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の軽鎖のヌクレオチ
ド配列

配列番号 90 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の軽鎖のアミノ酸配
列

配列番号 91 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 1 タイ
プのヌクレオチド配列

配列番号 92 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 1 タイ
プのアミノ酸配列

配列番号 93 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 2 タイ
プのヌクレオチド配列

配列番号 94 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 2 タイ
プのアミノ酸配列

配列番号 95 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 4 P タ
イプのヌクレオチド配列

配列番号 96 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 4 P タ
イプのアミノ酸配列

配列番号 97 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 1 L A
L A タイプのヌクレオチド配列

配列番号 98 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 1 L A
L A タイプのアミノ酸配列

配列番号 99 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 4 P F
A L A タイプのヌクレオチド配列

配列番号 100 : ヒトキメラ r a t _ _ C D 1 4 7 _ _ # 8 4 の重鎖 I g G 4 P

F A L Aタイプのアミノ酸配列

配列番号101: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号102: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の軽鎖のアミノ酸配列

配列番号103: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の重鎖 I g G 2 のヌクレオチド配列

配列番号104: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の重鎖 I g G 2 のアミノ酸配列

配列番号105: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の重鎖 I g G 4 P のヌクレオチド配列

配列番号106: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の重鎖 I g G 4 P のアミノ酸配列

配列番号107: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の重鎖 I g G 4 P F A L A のヌクレオチド配列

配列番号108: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 0 1 の重鎖 I g G 4 P F A L A のアミノ酸配列

配列番号109: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 1 0 の軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号110: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 1 0 の軽鎖のアミノ酸配列

配列番号111: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 1 0 の重鎖 I g G 2 のヌクレオチド配列

配列番号112: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 1 0 の重鎖 I g G 2 のアミノ酸配列

配列番号113: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 1 0 の重鎖 I g G 4 P のヌクレオチド配列

配列番号114: ヒトキメラ r a t __ C D 1 4 7 __ # 1 1 0 の重鎖 I g G 4

Pのアミノ酸配列

配列番号115: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #110の重鎖 *IgG4*

P F A L Aのヌクレオチド配列

配列番号116: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #110の重鎖 *IgG4*

P F A L Aのアミノ酸配列

配列番号117: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #131の軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号118: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #131の軽鎖のアミノ酸配列

配列番号119: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #131の重鎖 *IgG2*のヌクレオチド配列

配列番号120: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #131の重鎖 *IgG2*のアミノ酸配列

配列番号121: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #131の重鎖 *IgG4* Pのヌクレオチド配列

配列番号122: ヒトキメラ *rat* __CD147__ #131の重鎖 *IgG4* Pのアミノ酸配列

配列番号123: #84H1 *hlgG2*のアミノ酸配列

配列番号124: #84H1 *hlgG2*のヌクレオチド配列

配列番号125: #84H1 *hlgG4P*のアミノ酸配列

配列番号126: #84H1 *hlgG4P*のヌクレオチド配列

配列番号127: #84L2 *h*のアミノ酸配列

配列番号128: #84L2 *h*のヌクレオチド配列

配列番号129: #101H1 *hlgG2*のアミノ酸配列

配列番号130: #101H1 *hlgG2*のヌクレオチド配列

配列番号131: #101H1 *hlgG4P*のアミノ酸配列

配列番号132: #101H1 *hlgG4P*のヌクレオチド配列

配列番号133: #101L2 *h*のアミノ酸配列

- 配列番号134 : # 1 0 1 L 2 h のヌクレオチド配列
- 配列番号135 : # 1 1 0 H 1 h l g G 4 P のアミノ酸配列
- 配列番号136 : # 1 1 0 H 1 h l g G 4 P のヌクレオチド配列
- 配列番号137 : # 1 1 0 L 4 h のアミノ酸配列
- 配列番号138 : # 1 1 0 L 4 h のヌクレオチド配列
- 配列番号139 : # 1 3 1 H 2 h l g G 2 のアミノ酸配列
- 配列番号140 : # 1 3 1 H 2 h l g G 2 のヌクレオチド配列
- 配列番号141 : # 1 3 1 L 2 h のアミノ酸配列
- 配列番号142 : # 1 3 1 L 2 h のヌクレオチド配列
- 配列番号143 : ヒトCD147 v 1 のmu 3 領域
- 配列番号144 : カニクイサルCD147 のmu 3 領域
- 配列番号145 : ヒトKLF 5 のアミノ酸配列
- 配列番号146 : ヒトKLF 5 のヌクレオチド配列
- 配列番号147 : # 1 1 0 H 1 3 h l g G 4 P のアミノ酸配列
- 配列番号148 : # 1 1 0 H 1 3 h l g G 4 P のヌクレオチド配列
- 配列番号149 : # 1 1 0 L 2 h のアミノ酸配列
- 配列番号150 : # 1 1 0 L 2 h のヌクレオチド配列
- 配列番号151 : # 1 1 0 L 1 2 h のアミノ酸配列
- 配列番号152 : # 1 1 0 L 1 2 h のヌクレオチド配列

請求の範囲

[請求項1] 以下の（Ａ）～（Ｆ）からなる群から選択される少なくともいずれか１つの抗体と、ヒトＣＤ１４７への結合に対し競合し、かつ、ＣＤ１４７を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトＣＤ１４７抗体又は該抗体の抗原結合断片：

（Ａ）配列番号７１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

（Ｂ）配列番号５１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号４９に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

（Ｃ）配列番号６１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号５９に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

（Ｄ）配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号７９に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

（Ｅ）配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、及び

（Ｆ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１８に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体。

[請求項2] 以下の（Ａ）～（Ｆ）からなる群から選択される少なくともいずれか１つの抗体が結合するエピトープに結合し、かつ、ＣＤ１４７を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトＣＤ１４７抗体又は該抗体の抗原結合断片：

（Ａ）配列番号７１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

及び配列番号 69 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(B) 配列番号 51 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 49 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(C) 配列番号 61 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 59 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(D) 配列番号 81 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 79 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、

(E) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体、及び

(F) 配列番号 20 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 18 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体。

[請求項3] ADC 活性が低下又は欠失した、請求項 1 又は 2 に記載のヒト CD147 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項4] CDC 活性が低下又は欠失した、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のヒト CD147 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項5] ADP 活性が低下又は欠失した、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のヒト CD147 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項6] 配列番号 3 の 106 番目のアルギニン (Arg) から 165 番目のグリシン (Gly) の残基を含むエピトープに結合する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項7] 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列中の、106 番目のアルギニン (Arg)、108 番目のリシン (Lys)、109 番目のアラニン (

Ala)、110番目のバリン(Val)、127番目のリシン(Lys)、128番目のセリン(Ser)、129番目のグルタミン酸(Glu)、130番目のセリン(Ser)、131番目のバリン(Val)、132番目のプロリン(Pro)、133番目のプロリン(Pro)、134番目のバリン(Val)、164番目のグルタミン(Gln)及び165番目のグリシン(Gly)の各残基を含むエピトープに結合する、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項8] 重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号75に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号76に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号77に示されるアミノ酸配列からなること；及び
軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号72に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号73に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号74に示されるアミノ酸配列からなること；
を特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項9] 配列番号143に記載のアミノ酸配列、又は、配列番号143の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含むエピトープに結合する、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項10] 重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号55に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号56に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号57に示されるアミノ酸配列か

らなること；及び

軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号52に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号53に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号54に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする、請求項1～5又は9のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項11] 重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号65に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号66に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号67に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号62に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号63に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号64に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする、請求項1～5又は9のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項12] 重鎖配列が、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号85に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号86に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号87に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がCDRL1、CDRL2及びCDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号82に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号83に示されるアミノ酸配列からなること；

り、前記CDRL3は、配列番号84に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする、請求項1～5又は9のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項13] Fab、F(ab')₂、Fab'及びFvからなる群から選択される、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体の抗原結合断片。

[請求項14] scFvであることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体。

[請求項15] キメラ抗体であることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項16] ヒト化されていることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項17] 重鎖がヒト免疫グロブリンG1重鎖、ヒト免疫グロブリンG2重鎖又はヒト免疫グロブリンG4重鎖の定常領域を含み、軽鎖がヒト免疫グロブリンκ軽鎖の定常領域を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の抗体。

[請求項18] 重鎖がヒト免疫グロブリンG4重鎖の定常領域を含む、請求項17に記載の抗体。

[請求項19] ヒト免疫グロブリンG4重鎖の定常領域において、EUインデックスにより示される228番目のセリン(Ser)がプロリン(Pro)により置換された、請求項18に記載の抗体。

[請求項20] ヒト免疫グロブリンG4重鎖の定常領域において、EUインデックスにより示される234番目のフェニルアラニン(Phe)がアラニン(Ala)へ置換され、235番目のロイシン(Leu)がアラニン(Ala)に置換されている、請求項18の抗体。

[請求項21] ヒト免疫グロブリンG4重鎖の定常領域において、EUインデックスにより示される228番目のセリン(Ser)がプロリン(Pro)により置換され、234番目のフェニルアラニン(Phe)がアラ

ニン（A l a）へ置換され、235番目のロイシン（L e u）がアラニン（A l a）に置換されている、請求項18の抗体。

[請求項22] 重鎖がヒト免疫グロブリンG2重鎖の定常領域を含む、請求項17に記載の抗体。

[請求項23] 以下の（c）及び（d）を有し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

（c）以下の（c1）～（c4）からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

（c1）配列番号135に示されるアミノ酸配列の20～136番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

（c2）配列番号147に示されるアミノ酸配列の20～136番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

（c3）（c1）又は（c2）の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

（c4）（c1）～（c3）のいずれか1に記載の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

（d）以下の（d1）～（d5）からなる群から選択されるいずれか1に記載の軽鎖可変領域：

（d1）配列番号137に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

（d2）配列番号149に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

（d3）配列番号151に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

（d4）（d1）～（d3）のいずれか1に記載の配列において

各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 95 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(d 5) (d 1) ~ (d 4) のいずれか 1 に記載の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[請求項24] 配列番号 1 3 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 3 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 2 3 に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項25] 配列番号 1 3 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 3 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、請求項 2 3 に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項26] 配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 4 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 2 3 に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項27] 配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 4 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、請求項 2 3 に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項28] 配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 6 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 2 3 に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項29] 配列番号 1 4 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 3 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、請求項 2

3に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項30]

以下の（a）及び（b）を有し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

（a）以下の（a1）～（a4）からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

（a1）配列番号123に示されるアミノ酸配列の20～140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

（a2）配列番号125に示されるアミノ酸配列の20～140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

（a3）（a1）又は（a2）の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

（a4）（a1）～（a3）のいずれか1に記載の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

（b）以下の（b1）～（b3）からなる群から選択されるいずれか1に記載の軽鎖可変領域：

（b1）配列番号127に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

（b2）（b1）の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

（b3）（b1）又は（b2）の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[請求項31]

配列番号123に示されるアミノ酸配列の20～140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域又は配列番号125に示されるアミノ

酸配列の20～140番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号127に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、請求項30に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項32] 配列番号123に示されるアミノ酸配列の20～466番目のアミノ酸残基からなる重鎖又は配列番号125に示されるアミノ酸配列の20～467番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号127に示されるアミノ酸配列の21～234番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、請求項30に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項33] 以下の(e)及び(f)を有し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

(e) 以下の(e1)～(e4)からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

(e1) 配列番号129に示されるアミノ酸配列の20～137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(e2) 配列番号131に示されるアミノ酸配列の20～137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(e3) (e1)又は(e2)の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(e4) (e1)～(e3)のいずれか1に記載の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(f) 以下の(f1)～(f3)からなる群から選択されるいずれか1に記載の軽鎖可変領域：

(f1) 配列番号133に示されるアミノ酸配列の21～128

番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(f2) (f1) の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(f3) (f1) 又は (f2) の配列における各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[請求項34] 配列番号129に示されるアミノ酸配列の20～137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域又は配列番号131に示されるアミノ酸配列の20～137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号133に示されるアミノ酸配列の21～128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、請求項33に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項35] 配列番号129に示されるアミノ酸配列の20～463番目のアミノ酸残基からなる重鎖又は配列番号131に示されるアミノ酸配列の20～464番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号133に示されるアミノ酸配列の21～234番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、請求項33に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項36] 以下の(g)及び(h)を有し、かつ、CD147を介したシグナル伝達を活性化することを特徴とする、ヒトCD147抗体又は該抗体の抗原結合断片：

(g) 以下の(g1)～(g3)からなる群から選択されるいずれか1に記載の重鎖可変領域：

(g1) 配列番号139に示されるアミノ酸配列の20～138番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域；

(g2) (g1) の配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有する

アミノ酸配列；及び

(g 3) (g 1) 又は (g 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、並びに、

(h) 以下の (h 1) ~ (h 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載の軽鎖可変領域：

(h 1) 配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域；

(h 2) (h 1) の配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び

(h 3) (h 1) 又は (h 2) の配列における各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[請求項37] 配列番号 1 3 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 8 番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 1 2 8 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 3 6 に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項38] 配列番号 1 3 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 4 6 4 番目のアミノ酸残基からなる重鎖、及び、配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 ~ 2 3 4 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖を含む、請求項 3 6 に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片。

[請求項39] A D C C 活性が低下又は欠失した、請求項 2 3 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項40] C D C 活性が低下又は欠失した、請求項 2 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項41] A D C P 活性が低下又は欠失した、請求項 2 3 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載のヒト C D 1 4 7 抗体又は該抗体の抗原結合断片。

- [請求項42] 請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。
- [請求項43] 抗腫瘍剤である、請求項42に記載の医薬組成物。
- [請求項44] 腫瘍が、CD147を発現する腫瘍である、請求項43に記載の医薬組成物。
- [請求項45] 腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌、リンパ腫、甲状腺癌、皮膚癌、頭頸部癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、脳腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項43又は44に記載の医薬組成物。
- [請求項46] 腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項43～45のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項47] 腫瘍がSMAD4陽性の腫瘍又はKLF5の発現が低下又は欠失した腫瘍である、請求項43～46のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項48] さらに別の抗腫瘍剤を含有する、請求項42～47のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項49] 請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体若しくは該抗体の抗原結合性断片又は請求項42～48のいずれか1項に記載の医薬組成物を患者に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

- [請求項50] 腫瘍が、CD147を発現する腫瘍である、請求項49に記載の治療方法。
- [請求項51] 腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌、リンパ腫、甲状腺癌、皮膚癌、頭頸部癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、脳腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項49又は50に記載の治療方法。
- [請求項52] 腫瘍が、膵臓癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、悪性リンパ腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項49～51のいずれか1項に記載の治療方法。
- [請求項53] 腫瘍がSMAD4陽性の腫瘍又はKLF5の発現が低下又は欠失した腫瘍である、請求項49～52のいずれか1項に記載の治療方法。
- [請求項54] 別の抗腫瘍剤と組み合わせて投与される、請求項49～53のいずれか1項に記載の治療方法。
- [請求項55] 請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項56] 以下の（j1）～（j3）からなる群から選択されるいずれか1に記載のポリヌクレオチドを含む請求項55に記載のポリヌクレオチド：
- （j1）配列番号75に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号76に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号77に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号72に記載のアミノ酸配列からなるCDR

L 1、配列番号 7 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 7 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 をコードするポリヌクレオチド、

(j 2) (j 1) に記載のヌクレオチド配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；及び

(j 3) (j 1) 又は (j 2) に記載のポリヌクレオチドにおいて 1 ～数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[請求項 57] 以下の (i 1) ～ (i 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドを含む請求項 5 5 に記載のポリヌクレオチド：

(i 1) 配列番号 5 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 5 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 5 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号 5 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 5 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 5 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 をコードするポリヌクレオチド；

(i 2) (i 1) に記載のヌクレオチド配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；及び

(i 3) (i 1) 又は (i 2) に記載のポリヌクレオチドにおいて 1 ～数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[請求項 58] 以下の (k 1) ～ (k 3) からなる群から選択されるいずれか 1 に記載のポリヌクレオチドを含む請求項 5 5 に記載のポリヌクレオチド：

(k 1) 配列番号 6 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 6 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 6

7に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3をコードするポリヌクレオチド、

(k2) (k1)に記載のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；及び

(k3) (k1)又は(k2)に記載のポリヌクレオチドにおいて1～数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[請求項59] 以下の(m1)～(m3)からなる群から選択されるいずれか1に記載のポリヌクレオチドを含む請求項53に記載のポリヌクレオチド：

(m1) 配列番号85に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号86に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号87に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3をコードするポリヌクレオチド、並びに、配列番号82に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号83に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号84に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3をコードするポリヌクレオチド、

(m2) (m1)に記載のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；及び

(m3) (m1)又は(m2)に記載のポリヌクレオチドにおいて1～数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド。

[請求項60] 請求項55～59のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

[請求項61] 請求項60に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

- [請求項62] 請求項61に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含む、請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の製造方法。
- [請求項63] CD147を介したシグナル伝達の活性化が、p38MAPKの活性化及び／又はSMAD4の活性化である、請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
- [請求項64] p38MAPKの活性化及び／又はSMAD4の活性化が、p38MAPKの発現量の増加、p38MAPKのリン酸化、HSP27のリン酸化、CXCL8発現量の増加、rhoB発現量の増加、KLF5 mRNAの低下又はKLF5蛋白質発現量の低下である、請求項63に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
- [請求項65] 請求項63又は64に記載の抗体又は該抗体の抗原結合性断片を投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。
- [請求項66] 癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中に含まれるSMAD4の発現又はKLF5の発現を検出し、SMAD4が検出された患者又はKLF5の発現低下若しくは欠失が検出された患者を、請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は請求項42～48のいずれか1項に記載の医薬組成物による癌の治療への応答性があると判定することを含む、癌の治療への応答性を予測する方法。
- [請求項67] 癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中におけるSMAD4の発現の有無又はKLF5の発現を検出し、SMAD4が検出された患者又はKLF5の発現低下若しくは欠失が検出された患者を、請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は請求項42～48のいずれか1項に記載の医薬組成物による癌の治療の対象者として選別することを含む、癌の治療の対象を選別する方法。
- [請求項68] 癌患者由来の生物学的試料を用い、該生物学的試料中に含まれるS

MAD4の発現の有無又はKLF5の発現を検出し、SMAD4が検出された患者又はKLF5の発現低下若しくは欠失が検出された患者に対し、請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は請求項42～48のいずれか1項に記載の医薬組成物を投与することを含む、癌の治療方法。

[請求項69] 請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体若しくは当該抗体の機能性断片又は請求項42～48のいずれか1項に記載の医薬組成物による癌の治療への応答性を判定するためのキットであって、癌患者由来の生物学的試料中のSMAD4の発現又はKLF5の発現を検出する手段を少なくとも含む、キット。

[請求項70] 請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片と他の薬物がコンジュゲートした、抗体薬物複合体。

[請求項71] 請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体の抗原結合断片と、CD147以外の抗原に結合する抗原結合断片を含む、バイスペシフィック抗体。