

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/133093

発行日 平成29年2月2日 (2017.2.2)

(43) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014.9.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/36 (2006.01)	CO7K 16/36	ZNA 4B024
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00	C 4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D
GO1N 33/531 (2006.01)	GO1N 33/53	L
	GO1N 33/531	A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)		

出願番号	特願2015-503025 (P2015-503025)	(71) 出願人	510097747 国立研究開発法人国立がん研究センター 東京都中央区築地五丁目1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/054925	(74) 代理人	110001047 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成26年2月27日 (2014.2.27)	(72) 発明者	松村 保広 千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がん研究センター東病院内
(31) 優先権主張番号	特願2013-39625 (P2013-39625)	(72) 発明者	安永 正浩 千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がん研究センター東病院内
(32) 優先日	平成25年2月28日 (2013.2.28)	(72) 発明者	久田 洋平 千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がん研究センター東病院内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不溶性フィブリンに対する抗体

(57) 【要約】

フィブリノーゲンと結合せず且つ不溶性フィブリンに対する親和性及び特異性が高い抗体を提供することを目的とし、フィブリノーゲン分子内にて、フィブリノーゲン B 鎖の第231~246位のアミノ酸からなる部位と、フィブリノーゲン 鎖の第232~246位のアミノ酸からなる部位とは結合していることを見出した。さらに、フィブリノーゲンから不溶性フィブリンに変化すると当該結合が解かれ、これら部位は露出することも明らかにした。そして、これら部位を免疫して得られた抗体は、フィブリノーゲンと結合せず且つ不溶性フィブリンに対する親和性及び特異性が高い抗体であることを見出した。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

不溶性フィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体であって、配列番号：1 に示される部位又は配列番号：2 に示される部位に結合する抗体。

【請求項 2】

配列番号：4 ~ 6 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：8 ~ 10 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

配列番号：12 ~ 14 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：16 ~ 18 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号：3 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：7 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

配列番号：11 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：15 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、免疫学的測定用試薬。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、血栓関連疾患の判定用試薬。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、血栓可視化剤。

【請求項 9】

(a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体とサンプルとを接触させるステップ、
(b) 該抗体がサンプル中の不溶性フィブリンと結合したか否かを検出するステップ
を含む、サンプル中の不溶性フィブリンを検出するための方法。

【請求項 10】

(a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体と被験体に由来するサンプルとを接触させるステップ、

(b) 該抗体がサンプル中の不溶性フィブリンと結合したか否かを検出するステップ
を含む、被験体における血栓関連疾患を判定するための方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体と抗腫瘍性部分との複合体。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、不溶性フィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体、及び該抗体を含む不溶性フィブリンを検出するための試薬及び方法に関する。また本発明は、前記抗体を用いた血栓関連疾患を判定するための試薬及び方法に関する。さらに本発明は、前記抗体と抗腫瘍性部分との複合体に関する。

【背景技術】

【0002】

血管が傷つき、血液が傷害血管壁や血管内皮下組織に接触したり、組織因子の血中流入があると、血液凝固反応が開始され、血液中のフィブリノーゲンが不溶性フィブリンに変わり、フィブリンの網が強固な止血栓として傷口を固めることが明らかになっている。

10

【0003】

血液凝固は、癌と密接な関係があることが古くから示唆されている（1800年代のフランスの外科医トルソーの「胃癌患者における四肢の血栓による浮腫」に記載）。最近の臨床疫学データでも、膵臓癌、胃癌、脳腫瘍をはじめとして、殆どの癌において凝固亢進による血栓症の頻度が健常人より有意に高いことが明らかとなっている（非特許文献1）。また、癌組織の内部においても凝固異常に伴う、不溶性フィブリンの蓄積、凝固壊死、血管新生が癌の進展とともに繰り返し起こっているものと考えられている。

【0004】

不溶性フィブリンは、前駆体のフィブリノーゲンが生体に広く認められるのとは異なり、正常な生理的条件下の組織には存在しない。血管外に漏れ出て活性化されたトロンピンがフィブリノーゲンを切断することにより、フィブリンモノマーが形成されて、そのフィブリンモノマーが重合、架橋してフィブリン繊維が形成されることによって生じる。そのため、不溶性フィブリンは、出血や炎症など病理的状态の組織に特異的な存在であり、癌や心筋梗塞、脳梗塞等の凝固を伴う病態が起きたときに形成される。従って、不溶性フィブリンは、かかる血栓関連疾患のマーカー分子であり、特に心筋梗塞や脳梗塞等の脳循環器疾患がない状況における癌組織中に存在する不溶性フィブリンは、まさに癌特異的分子といえる。このように、不溶性フィブリンは血栓形成や重要な疾患との関連性が示されていることから、フィブリンを特異的に検出するための手段の開発が望まれている。

20

30

【0005】

かかる状況を鑑み、フィブリンを検出するための手段として抗体が開発されている（特許文献1～6）。また、本発明者らもフィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体を開発し、その有用性についても明らかにしている（特許文献7）。

【0006】

しかしながら、不溶性フィブリンは、前駆体であるフィブリノーゲンの末端部が切断されて生じるものであるため、不溶性フィブリンとフィブリノーゲンとのアミノ酸配列は、切断されて除かれる部分の有無を除き、完全に一致している。さらに生体内には、プラスミン等によって不溶性フィブリンが分解されることによって生じた溶解性フィブリン（FDP、フィブリン分解産物）が存在していることもある。従って、アミノ酸配列上及び構造上極めて相同性の高い分子（フィブリノーゲン、FDP等）が存在する中、不溶性フィブリンを検出するためには、不溶性フィブリンに対する親和性及び特異性がより高い抗体が必要とされている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2001-354700号公報

【特許文献2】特開2009-149686号公報

【特許文献3】特開2008-29353号公報

【特許文献4】特開平9-127108号公報

50

【特許文献5】特開平9 - 104700号公報

【特許文献6】特開平8 - 301900号公報

【特許文献7】特開2012 - 72号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】PD Steinら、「癌入院患者における静脈血栓塞栓症の発生率 (Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer)」、American J Med.、2006年、116巻、60～68ページ

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、フィブリノーゲンと結合せず且つ不溶性フィブリンに対する親和性及び特異性が高い抗体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、上記課題を解決するため、特許文献7に記載のフィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体(102 - 10抗体)の性状及び機能について鋭意検討を行った。その結果、102 - 10抗体は、インビトロ及びインビボにおいて、癌、脳梗塞、心筋梗塞及び炎症性疾患等において生じる血栓を検出できることが明らかになった。また、102 - 10抗体は、フィブリノーゲンには結合しないが、フィブリノーゲンを構成する3種類のポリペプチド鎖(A鎖、B鎖、鎖)のうち、B鎖には結合できることを見出した。さらに、102 - 10抗体のエピトープがフィブリノーゲンB鎖の第231～246位のアミノ酸からなる部位であることも明らかにした。

【0011】

フィブリノーゲンは、それを構成するフィブリノーゲンB鎖のアミノ末端が切断され、フィブリノーゲン鎖が生じること等によって、フィブリンモノマーとなり、さらには該モノマーが重合、架橋化することにより不溶性フィブリンが形成される。本発明者らによるコンピューターシミュレーション解析の結果、フィブリノーゲンにおいて、前記エピトープはフィブリノーゲンB鎖においてフィブリノーゲン鎖と結合している部位であることが明らかになった。本発明者らは、かかる結果に基づき、102 - 10抗体がフィブリノーゲンに結合できないのは、当該抗体のエピトープが分子内に隠れていることが原因であると考えた。また、102 - 10抗体が不溶性フィブリンに結合できるのは、フィブリンモノマーが重合、架橋化されることによって、フィブリンモノマーにおいて、フィブリノーゲン鎖又はフィブリノーゲンB鎖内の前記エピトープが露呈することにあると本発明者らは想定した。

【0012】

そこで、かかる想定に基づき、フィブリノーゲンB鎖の第231～246位のアミノ酸からなる部位と、フィブリノーゲン分子内にて該部位と結合している、フィブリノーゲン鎖の第232～246位のアミノ酸からなる部位とを、各々抗原としてマウスに免疫し、新たにモノクローナル抗体を作製した。そして、得られた抗体について、フィブリノーゲン又は不溶性フィブリンに対する親和性を評価したところ、いずれの抗体もフィブリノーゲンに対しては結合することなく、不溶性フィブリンに対しては高い親和性を示した。さらに、これら抗体の不溶性フィブリンに対する親和性はいずれも、102 - 10抗体のそれよりもはるかに高いものであることを見出した。また、今回作製した、フィブリノーゲンB鎖の第231～246位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体及びフィブリノーゲン鎖の第232～246位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体について、軽鎖及び重鎖の可変領域及び相補性決定領域のアミノ酸配列を決定した。本発明は、上記知見に基づいてなされたものである。すなわち、本発明は、以下の<1>～<11>を提供

10

20

30

40

50

するものである。

< 1 > 不溶性フィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体であって、配列番号： 1 に示される部位又は配列番号： 2 に示される部位に結合する抗体。

< 2 > 配列番号： 4 ~ 6 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号： 8 ~ 10 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、< 1 > に記載の抗体。

10

< 3 > 配列番号： 12 ~ 14 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号： 16 ~ 18 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、< 1 > に記載の抗体。

< 4 > 配列番号： 3 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

20

配列番号： 7 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、< 1 > に記載の抗体。

< 5 > 配列番号： 11 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号： 15 に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び / 又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と

を保持する、< 1 > に記載の抗体。

30

< 6 > < 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 に記載の抗体を含む、免疫学的測定用試薬。

< 7 > < 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 に記載の抗体を含む、血栓関連疾患の判定用試薬。

< 8 > < 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 に記載の抗体を含む、血栓可視化剤。

< 9 > (a) < 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 に記載の抗体とサンプルとを接触させるステップ、(b) 該抗体がサンプル中の不溶性フィブリンと結合したか否かを検出するステップを含む、サンプル中の不溶性フィブリンを検出するための方法。

< 10 > (a) < 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 に記載の抗体と被験体に由来するサンプルとを接触させるステップ、(b) 該抗体がサンプル中の不溶性フィブリンと結合したか否かを検出するステップを含む、被験体における血栓関連疾患を判定するための方法。

< 11 > < 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 に記載の抗体と抗腫瘍性部分との複合体。

40

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、フィブリノーゲンと結合せず且つ不溶性フィブリンに対する親和性及び特異性が高い抗体を提供することが可能となる。かかる抗体を用いることにより、高感度に、信頼性をもって、且つ簡便に不溶性フィブリン及び血栓の存在を検出することができ、結果として血栓関連疾患を判定することが可能となる。また、かかる抗体を用いることにより、適当な化合物又は分子を血栓が存在する部位、例えば腫瘍に送達させることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】フィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体 (特開 2012 - 7

50

2号公報に記載の102-10抗体)の、ヒト又はマウスに由来する不溶性フィブリン又はフィブリノーゲンに対する親和性について、ELISA法により解析した結果を示すグラフである。

【図2】102-10抗体の、不溶性フィブリン、それを各種酵素により分解して得られた産物(溶解性フィブリン)又はフィブリノーゲンに対する親和性について、ELISA法により解析した結果を示すグラフである。

【図3】102-10抗体及び市販の抗フィブリン抗体(NYB-T2G1、MH-1)の、ヒト不溶性フィブリン、ヒトフィブリノーゲン又はD-ダイマー(溶解性フィブリン)に対する親和性について、ELISA法により解析した結果を示すグラフである。図中、「A」はヒト不溶性フィブリンに対する親和性を示し、「B」はヒトフィブリノーゲンに対する親和性を示し、「C」はD-ダイマーに対する親和性を示す。

【図4】102-10抗体により、脳、肺及び脾臓の正常な組織又は癌化した組織を免疫染色した結果を示す、顕微鏡写真である。

【図5】102-10抗体により、大腸癌、大腸腺腫又は反応性リンパ節炎の組織を免疫染色した結果を示す、顕微鏡写真である。

【図6】102-10抗体により、脳梗塞(発症後3週間経過)、心筋梗塞(発症後3週間経過)、急性膵炎又は慢性膵炎の組織を免疫染色した結果を示す、顕微鏡写真である。

【図7】102-10抗体により、脳梗塞、関節炎又は損傷した皮膚の組織を免疫染色した結果を示す、顕微鏡写真である。図中の日数は、発症又は創傷してからの経過日数を示し。また矢印は、不溶性フィブリン(血栓)形成部位を示す。

【図8】102-10抗体と、p-イソチシアネートベンジル-デスフェリオキサミンBと、⁸⁹Zr核種とからなる、PETプローブの概略図を示す。

【図9】図8に示したPETプローブを投与した化学発癌マウスを、PET(ポジトロン断層法)及びCT(コンピューター断層撮影法)により撮影した結果を示す、写真である。図中、左から順に、化学発癌マウスの外観を撮影した写真、CT画像、PET画像、CT画像とPET画像とを重ね合わせたものを示す。

【図10】図8に示したPETプローブを投与した化学発癌マウスから腫瘍を単離し、該腫瘍の断面を観察した結果を示す写真である。図中「HE」は腫瘍断面をHE染色して観察した結果を示し、「フィブリン」は腫瘍断面を102-10抗体により免疫染色して観察した結果を示し、「オートラジオグラム」は腫瘍断面においてPETプローブから放出される放射線を検出した結果を示す。

【図11】102-10抗体により、フィブリンクロットを免疫染色した結果を示す、顕微鏡写真である。

【図12】還元状態にあるフィブリノーゲン(フィブリノーゲンA鎖、フィブリノーゲンB鎖、フィブリノーゲン鎖)と、非還元状態にあるフィブリノーゲンとを、SDS-PAGEにより展開し、これらタンパク質を展開したゲルをCBBにて染色した結果を示す、写真である。図中、「hu」及び「ms」は、展開したフィブリノーゲンがヒト由来及びマウス由来であることを各々示す。「Mw」は分子量マーカーを展開したレーンであることを示す(図13においても同じ)。

【図13】還元状態にあるフィブリノーゲン(フィブリノーゲンA鎖、フィブリノーゲンB鎖、フィブリノーゲン鎖)と、非還元状態にあるフィブリノーゲンとを、SDS-PAGEにより展開し、102-10抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した結果を示す、写真である。

【図14】フィブリノーゲンB鎖のアミノ酸配列を示す図である。図中マークしてあるアミノ酸配列は、102-10抗体のエピトープが存在することがアミノ酸シーケンス解析により示唆された、フィブリノーゲンB鎖の第179位のヒスチジン~第264位のリジンからなる領域(86アミノ酸)である。

【図15】前記86アミノ酸からなる領域の部分配列からなる合成ペプチドを用いた、102-10抗体との結合における競争阻害実験の結果を示すグラフである。

【図16】フィブリノーゲン分子内の、フィブリノーゲンB鎖とフィブリノーゲン鎖

10

20

30

40

50

との結合状態をコンピューターシミュレーションにて解析した結果を示す図である。図中、矢印は102-10抗体のエピトープ(フィブリノーゲンB鎖の第231~246位のアミノ酸からなる部位)を示す。

【図17】102-10抗体、抗鎖抗体(Fib-0355抗体、Fib-3435抗体)又は抗鎖抗体(13-30抗体、34-105抗体)の、フィブリン又はフィブリノーゲンに対する親和性について、ELISA法により解析した結果を示すグラフである。なお、「抗鎖抗体」は、フィブリノーゲンB鎖の第231~246位のアミノ酸からなるポリペプチドをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体を解析した結果を示し、「抗鎖抗体」は、フィブリノーゲン鎖の第232~246位のアミノ酸からなるポリペプチドをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体を解析した結果を示す。

【図18】抗鎖抗体(Fib-0355抗体)の軽鎖(L鎖)可変領域及び重鎖(H鎖)可変領域、並びにこれらのCDR1~3のアミノ酸配列を示す図である。

【図19】抗鎖抗体(34-105抗体)の軽鎖(L鎖)可変領域及び重鎖(H鎖)可変領域、並びにこれらのCDR1~3のアミノ酸配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

<不溶性フィブリンに対する抗体>

後述の実施例において示す通り、本発明者らは、フィブリノーゲンB鎖の第231~246位のアミノ酸からなる部位若しくはフィブリノーゲン鎖の第187~202位のアミノ酸からなる部位(共に配列番号:1に示される部位)、又はフィブリノーゲン鎖の第232~246位のアミノ酸からなる部位(配列番号:2に示される部位)をエピトープとする抗体は、不溶性フィブリンに結合できるが、フィブリノーゲンには結合できないことを明らかにした。

【0016】

従って、本発明は、不溶性フィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体であって、配列番号:1に示される部位又は配列番号:2に示される部位に結合する抗体を提供する。

【0017】

本発明において「不溶性フィブリン」とは、フィブリノーゲンからトロンビンの作用によりフィブリンモノマーが産生され、該フィブリンモノマーが重合することにより難溶性のフィブリンポリマーが形成され、さらに該フィブリンポリマー間が第XIII因子によって架橋化されているものを意味する。また、本発明における「不溶性フィブリン」には、それを構成するフィブリンモノマー及びフィブリンポリマーが含まれるが、不溶性フィブリンがプラスミン等により分解され、可溶化したもの(FDP、フィブリン分解産物)は、含まれない。

【0018】

本発明において「フィブリノーゲン」とは、2つのフィブリノーゲンA鎖と、2つのフィブリノーゲンB鎖と、2つのフィブリノーゲン鎖とが、架橋化されてなる複合体を意味する。「フィブリノーゲンB鎖」は、ヒト由来のものであれば典型的には、配列番号:19に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、「フィブリノーゲン鎖」は、ヒト由来のものであれば典型的には、配列番号:20に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。また、本発明において「フィブリノーゲン鎖」とは、トロンビンの作用によりフィブリノーゲンB鎖が切断され、そのN末端部分であるフィブリノペプチドBが除去されたタンパク質を意味し、ヒト由来のものであれば典型的には、配列番号:19に記載の第45~491位のアミノ酸配列からなるタンパク質である。

【0019】

配列番号:1に記載のアミノ酸配列は、ヒトフィブリノーゲンB鎖の第231~246位のアミノ酸配列又はヒトフィブリノーゲン鎖の第187~202位のアミノ酸配列であり、配列番号:2に記載のアミノ酸配列は、ヒトフィブリノーゲン鎖の第232~246位のアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

本発明における「抗体」は、免疫グロブリンのすべてのクラス及びサブクラスを含む。「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が含まれ、また、抗体の機能的断片の形態も含む意である。「ポリクローナル抗体」は、異なるエピトープに対する異なる抗体を含む抗体調製物である。また、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体（抗体断片を含む）を意味する。ポリクローナル抗体とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、自然環境の成分から分離され、及び/又は回収された（即ち、単離された）抗体である。

【 0 0 2 1 】

本発明において、抗体が不溶性フィブリンに結合するか、またフィブリノーゲンに結合しないかは、当該技術分野で公知の方法によって判定することができ、かかる公知の方法としては、例えば、後述の実施例において示すような、不溶性フィブリン又はフィブリノーゲンを固相化したプレートを用いた E L I S A 法が挙げられる。

【 0 0 2 2 】

また、本発明において、不溶性フィブリンに対する特異性が高い抗体とは、他のペプチド又はタンパク質に対する親和性よりも、フィブリンに対して高い親和性で結合する抗体を意味する。ここで、高い親和性とは、当該技術分野で公知の方法によって、不溶性フィブリンを他のペプチド又はタンパク質から区別して検出することが可能な程度に高い親和性を意味する。

【 0 0 2 3 】

また、本発明の抗体は、後述の実施例において示す通り、ヒト及びマウス由来の不溶性フィブリンと結合することができ、ヒト及びマウス由来のフィブリノーゲンとは結合しない。従って、マウスにおいて本抗体を用いて得られた試験データをヒトに外挿することが可能である。

【 0 0 2 4 】

また、本発明のモノクローナル抗体の好ましい態様は、後述の実施例に記載の、ハイブリドーマ F i b - 0 3 5 5 が産生するモノクローナル抗体（F i b - 0 3 5 5 抗体）、ハイブリドーマ F i b - 3 4 3 5 が産生するモノクローナル抗体（F i b - 3 4 3 5 抗体）、ハイブリドーマ 1 3 - 3 0 が産生するモノクローナル抗体（1 3 - 3 0 抗体）、ハイブリドーマ 3 4 - 1 0 5 が産生するモノクローナル抗体（3 4 - 1 0 5 抗体）である。

【 0 0 2 5 】

また、本発明のモノクローナル抗体の好ましい別の態様は、前記ハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体の軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3 を含む軽鎖可変領域と、重鎖 C D R 1 ~ C D R 3 を含む重鎖可変領域とを保持する抗体又はそれらのアミノ酸配列変異体である。

【 0 0 2 6 】

かかる本発明の好適なモノクローナル抗体としては、

軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3 のアミノ酸配列（配列番号：4 ~ 6 に記載のアミノ酸配列）又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

重鎖 C D R 1 ~ C D R 3 のアミノ酸配列（配列番号：8 ~ 10 に記載のアミノ酸配列）又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する抗体、

軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3 のアミノ酸配列（配列番号：12 ~ 14 に記載のアミノ酸配列）又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

重鎖 C D R 1 ~ C D R 3 のアミノ酸配列（配列番号：16 ~ 18 に記載のアミノ酸配列）又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、

10

20

30

40

50

欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する抗体が挙げられる。

【0027】

本発明のより好適なモノクローナル抗体としては、

配列番号：3に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：7に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する抗体、

配列番号：11に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：15に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する抗体が挙げられる。

【0028】

また、本発明の抗体の好ましい別の態様は、後述の実施例2に記載のELISAにおいて、不溶性フィブリンに対する親和性（波長492nmにおける吸光度）が0.5以上（より好ましくは1.0以上、さらに好ましくは1.5以上、特に好ましくは2.0以上）である抗体である。

【0029】

また、本発明の抗体の好ましい別の態様は、後述の実施例2に記載のELISAにおいて、不溶性フィブリンに対する親和性（波長492nmにおける吸光度）が、特許文献7に記載の102-10抗体と比較して、5倍以上（より好ましくは10倍以上）である抗体である。

【0030】

また、本発明の抗体の好ましい別の態様は、後述の実施例2に記載のELISAにおいて、フィブリノーゲンに対する親和性（492nmにおける吸光度）に対する不溶性フィブリンのその比率が、10倍以上（より好ましくは20倍以上）である抗体である。

【0031】

本発明の抗体には、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、及びこれら抗体の機能的断片が含まれる。本発明の抗体を医薬としてヒトに投与する場合は、副作用低減の観点から、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体が望ましい。

【0032】

本発明において「キメラ抗体」とは、ある種の抗体の可変領域とそれとは異種の抗体の定常領域とを連結した抗体である。キメラ抗体は、例えば、抗原をマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髄由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。また、本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフト）した抗体であり、その作製方法は、公知である（例えば、EP239400、EP125023、WO90/07861、WO96/02576参照）。本発明において、「ヒト抗体」とは、すべての領域がヒト由来の抗体である。ヒト抗体の作製においては、ヒトB細胞より活性のある抗体の産生をスクリーニングする方法、ファージディスプレイ法、免疫することで、ヒト抗体のレパトリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）を利用すること等が可能である。ヒト抗体の作製手

10

20

30

40

50

法は、公知である（例えば、Nature, 362:255-258(1993)、Intern. Rev. Immunol, 13:65-93(1995)、J. Mol. Biol, 222:581-597(1991)、Nature Genetics, 15:146-156(1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-727(2000)、特開平10-146194号公報、特開平10-155492号公報、特許2938569号公報、特開平11-206387号公報、特表平8-509612号公報、特表平11-505107号公報）。

【0033】

本発明において抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部（部分断片）であって、配列番号：1に示す部位又は配列番号：2に示す部位に結合するものを意味する。具体的には、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、sc(Fv)₂、ダイアボディー、多特異性抗体、及びこれらの重合体等が挙げられる。

10

【0034】

ここで「Fab」とは、1つの軽鎖及び重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「Fab'」は、抗体のヒンジ領域の1つ又はそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fabとは異なる。「F(ab')₂」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二価の抗原結合断片を意味する。

20

【0035】

「可変領域断片(Fv)」は、完全な抗原認識及び結合部位を有する最少の抗体断片である。Fvは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。「一本鎖Fv(scFv)」は、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「sc(Fv)₂」は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。「ダイアボディー」とは、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同一ポリペプチド鎖の中に軽鎖可変領域に結合した重鎖可変領域を含み、各領域は別の鎖の相補的領域とペアを形成している。「多特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。例えば、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現により調製することができる。

30

【0036】

本発明の抗体には、望ましい活性（抗原への親和性、抗原に対する特異性、及び/又は他の生物学的特性）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。本発明の抗体のアミノ酸配列変異体は、本発明の抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、本発明の抗体のアミノ酸配列内の残基の置換、欠失、付加及び/又は挿入を含む。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖又は軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（フレームワーク領域及びCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との結合親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（PNAS, 102:8466-8471(2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21:485-493(2008)、国際公開第2002/051870号、J. Biol. Chem., 280:24880-24887(2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21:345-351(2008)）。

40

【0037】

改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸

50

以内、最も好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。

10

【0038】

また「同等の活性を有する」とは、抗原への親和性が対象抗体（代表的には、後述の実施例において示す、F i b - 0 3 5 5 抗体、F i b - 3 4 3 5 抗体、1 3 - 3 0 抗体、3 4 - 1 0 5 抗体）と同等（例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上）であることを意味する。抗原への親和性は、前述の通り、E L I S A 法により評価することができる。

【0039】

また、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

20

【0040】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であれば、抗原（配列番号：1又は配列番号：2）のアミノ酸配列からなるポリペプチド、その部分ペプチド、またはこれらを発現する細胞等で免疫動物を免疫し、その抗血清から、従来手段（例えば、塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィー等）によって、精製して取得することができる。また、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法や組換えDNA法によって作製することができる。

30

【0041】

ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラー及びミルスタインの方法（K o h l e r & M i l s t e i n , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) ）が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、前記抗原で免疫された動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球等である。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞又はリンパ球等に対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞及びミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでもよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、配列番号：1又は2に示す部位に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。配列番号：1又は2に示す部位に特異的なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

40

【0042】

組換えDNA法は、上記本発明の抗体をコードするDNAをハイブリドーマやB細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞等）に導入し、本発明の抗体を組換え抗体と

50

して産生させる手法である（例えば、P. J. Delves, *Antibody Production: Essential Techniques*, 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean *Monoclonal Antibodies*, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A. M. et al., *Eur. J. Biochem.* 192: 767 - 775 (1990)）。本発明の抗体をコードするDNAの発現においては、重鎖又は軽鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖及び軽鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（国際公開第94/11523号公報 参照）。本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

10

20

30

40

50

【0043】

従って、本発明は、本発明の抗体をコードするDNA、該DNAを含む発現ベクター、前記DNA又は該発現ベクターを含み、本発明の抗体を産生する形質転換体、該形質転換体を培養し、当該形質転換体内又は培養液から抗体を分離・精製するステップを含む、本発明の抗体の製造方法、本発明の抗体を産生する又は本発明の抗体をコードするDNAを含むハイブリドマを提供することができる。

【0044】

また、本発明は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドで免疫、不溶性フィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体の製造方法を提供することもできる。さらに、不溶性フィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体を製造するための、配列番号：1又は配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる抗原を提供することもできる。

【0045】

<免疫学的測定用試薬>

後述の実施例に示す通り、本発明の抗体を用いて、サンプル中の不溶性フィブリンを検出することが可能である。この検出は、抗体を用いる測定方法、すなわち免疫学的測定方法であれば、任意の方法に基づいて実施することができる。例えば、不溶性フィブリンの検出は、免疫組織化学染色法及び免疫電顕法、並びに免疫アッセイ（酵素免疫アッセイ（ELISA）、EIA）、蛍光免疫アッセイ、放射性免疫アッセイ（RIA）、免疫クロマト法及びウエスタンブロット法等）等を利用して実施することができる。

【0046】

対象となるサンプルとしては、特に限定されるものではなく、例えば、組織又は細胞サンプル（胃、十二指腸、大腸、膵、胆嚢、胆管、気管支、肺等の癌の組織又は細胞）、生体液サンプル（胃粘液、十二指腸液、膵液、胆汁、腹水、喀痰、気管支肺胞洗浄液、血液、血清、血漿等）等が挙げられる。例えば、免疫染色の場合には、組織サンプル（生検標本、切除標本）、細胞診サンプルをサンプルとして用いることが好ましい。

【0047】

本発明の免疫学的測定方法においては、サンプル中の不溶性フィブリンを、本発明の抗体と結合させて、その結合を検出することによって、不溶性フィブリンを検出する。本発明において「検出」とは、不溶性フィブリンの存在の有無を検出することだけでなく、不溶性フィブリンを定量的に検出すること、不溶性フィブリンを免疫染色することも含む。

【0048】

不溶性フィブリンについての免疫アッセイは、典型的には、試験対象のサンプルを本発明の抗体と接触させ、当該技術分野で公知の手法を用いて結合した抗体を検出することを

含む。「接触」は、サンプル中に存在する不溶性フィブリンと本発明の抗体とが結合できるように近接することができる状態にすることを意味し、例えば、固形サンプルに対して抗体含有溶液を塗布すること、抗体含有溶液に固形サンプルを浸漬すること、液状サンプルと抗体含有溶液とを混合すること等の操作が含まれる。

【0049】

免疫アッセイは、液相系及び固相系のいずれで行ってもよい。また免疫アッセイの形式も限定されるものではなく、直接固相法その他、サンドイッチ法、競合法等であってもよい。

【0050】

本発明の抗体はまた、免疫組織化学染色法（例えば免疫染色法）又は免疫電顕法のように、不溶性フィブリンの *in situ* 検出のために、組織学的に用いることも可能である。*in situ* 検出は、被験体から組織学的サンプルを切除し（生検組織サンプル、組織のパラフィン包埋切片など）、それに標識した抗体を接触させることにより実施しうる。

10

【0051】

免疫アッセイの操作法は、公知の方法（Ausubel, F. M. 編, Short Protocols in Molecular Biology, Chapter 11 "immunology" John Wiley & Sons, Inc. 1995）により行うことができる。あるいは、不溶性フィブリンと抗体との複合体を、公知の分離手段（クロマト法、塩析法、アルコール沈殿法、酵素法、固相法等）によって分離し、標識のシグナルを検出するようにしてもよい。

20

【0052】

免疫アッセイの一例として、例えば固相系を利用する場合、抗体を固相支持体又は担体（樹脂プレート、メンブレン、ビーズ等）に固定してもよいし、あるいはサンプルを固定してもよい。例えば、抗体を固相支持体に固定し、支持体を適当なバッファーで洗浄した後、サンプルを用いて処理する。次に固相支持体にバッファーを用いた2回目の洗浄を行って、未結合の抗体を除去する。そして固体支持体上の結合した抗体又を、慣用的な手段により検出することによって、サンプル中の不溶性フィブリンと抗体との結合を検出することができる。あるいはまた、固形サンプルを抗体を含む溶液で処理して、続いてバッファーを用いた洗浄を行って未結合の抗体を除去した後、固形サンプル上の結合した抗体を慣用的な手段により検出することができる。

30

【0053】

抗体の結合活性は、周知の方法に従って測定しうる。当業者であれば、採用する免疫アッセイの種類及び形式、使用する標識の種類及び標識の対象等に応じて、各アッセイについての有効且つ最適な測定方法を決定することができる。

【0054】

本発明においては、本発明の抗体と、サンプル中に存在する不溶性フィブリンとの反応を容易に検出するために、本発明の抗体を標識することにより該反応を直接検出するか、又は標識二次抗体若しくはビオチン-アビジン複合体等を用いることにより間接的に検出する。本発明で使用可能な標識の例とその検出方法について以下に記載する。

40

【0055】

酵素免疫アッセイの場合には、例えば、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、アミラーゼ等を用いることができる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、グルタルアルデヒド、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。

【0056】

蛍光免疫アッセイの場合には、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等を用いることができる。これらの蛍光標識は、慣用の手法により抗体と結合させることができる。

50

【 0 0 5 7 】

放射性免疫アッセイの場合には、例えば、トリチウム、ヨウ素 1 2 5 及びヨウ素 1 3 1 等を用いることができる。放射性標識は、クロラミン T 法、ボルトンハンター法等の公知の方法により、抗体に結合させることができる。

【 0 0 5 8 】

例えば、本発明の抗体を上記のように標識で直接標識する場合には、サンプルを標識した本発明の抗体と接触させて、不溶性フィブリン - 抗体の複合体を形成させる。定量の場合には、未結合の標識抗体を分離した後、結合標識抗体量又は未結合標識抗体量よりサンプル中の不溶性フィブリン量を測定することができる。

【 0 0 5 9 】

また例えば、標識二次抗体を用いる場合には、本発明の抗体とサンプルとを反応させ（1 次反応）、得られた複合体にさらに標識二次抗体を反応させる（2 次反応）。1 次反応と 2 次反応は逆の順序で行ってもよいし、同時に行ってもよいし、又は時間をずらして行ってもよい。1 次反応及び 2 次反応により、フィブリン - 本発明の抗体 - 標識二次抗体の複合体、又は本発明の抗体 - フィブリン - 標識二次抗体の複合体が形成される。そして定量を行う場合には、未結合の標識二次抗体を分離して、結合標識二次抗体量又は未結合標識二次抗体量よりサンプル中の不溶性フィブリン量を測定することができる。

10

【 0 0 6 0 】

ビオチン - アビジン複合体系を利用する場合には、ビオチン化した抗体とサンプルとを反応させ、得られた複合体に標識を付加したアビジンを反応させる。アビジンは、ビオチンと特異的に結合することができるため、アビジンに付加した標識のシグナルを検出することによって、抗体と不溶性フィブリンとの結合を測定することができる。アビジンに付加する標識は特に限定されるものではないが、例えば酵素標識（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）が好ましい。

20

【 0 0 6 1 】

標識シグナルの検出もまた、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、酵素標識を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。基質は、使用する酵素の種類に応じて異なり、例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB)、ジアミノベンジジン (DAB) 等を、また酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。蛍光標識は、例えば蛍光顕微鏡、プレートリーダー等を用いて検出及び定量することができる。放射性標識を用いる場合には、放射性標識の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。

30

【 0 0 6 2 】

また、本発明は、本発明の抗体を含む、不溶性フィブリンの免疫学的測定用試薬に関する。本発明の免疫学的測定用試薬において、抗体は標識されていてもよい。また、抗体は、遊離形態であってもよいし、固相支持体（例えば、メンブレン、ビーズ等）に固定化されていてもよい。

40

【 0 0 6 3 】

免疫学的測定用試薬には、本発明の抗体の他、免疫学的測定方法を実施するために有用な成分が含まれてもよい。そのような成分としては、例えば、免疫アッセイにおいて使用するためのバッファー、サンプル処理用試薬、標識、競合物、二次抗体等が挙げられる。本発明の免疫学的測定用試薬を用いることによって、サンプル中の不溶性フィブリンの検出を容易且つ簡便に行うことができる。

【 0 0 6 4 】

< 血栓関連疾患の判定用試薬 >

本発明の抗体は、後述の実施例に示す通り、ヒト不溶性フィブリンと特異的に反応するため、フィブリンに関連する疾患又は障害、例えば血栓関連疾患の判定用試薬において用

50

いることができる。本発明において「血栓関連疾患」とは、その疾患又は障害の状態と血栓の存在との間に相関性がある疾患又は障害を意味する。そのような血栓関連疾患としては、限定されるものではないが、梗塞、例えば心筋梗塞、脳梗塞、脳出血、脳塞栓、脳血栓、くも膜下出血、肺梗塞等、並びに癌、例えば膀胱癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌及び肺癌が含まれる。不溶性フィブリンの存在を検出することによって、血栓関連疾患の有無の判定、血栓関連疾患の進行状況（悪化、良化）の判定、血栓関連疾患の位置の特定を行うことができる。

【0065】

本発明の判定用試薬は、上述した本発明の抗体を含むものである。従って、本発明の判定用試薬を用いて、血栓関連疾患（例えば梗塞又は癌）への罹患又はその存在が疑われる被験体から採取したサンプル中に含まれる不溶性フィブリンを検出することによって、該被験体の血栓関連疾患の存在、該被験体の血栓関連疾患の進行状況及び該被験体における血栓関連疾患の位置を迅速且つ簡便に判定することができる。このような免疫学的測定方法を利用した疾患又は障害の判定用試薬は周知であり、当業者であれば、抗体以外の適当な成分を容易に選択することができる。また本発明の判定用試薬は、免疫学的測定方法を行うための手法であればいずれの手法においても利用することができる。

10

【0066】

< 血栓の可視化 / *in vivo* イメージング、血栓部位への送達 >

本発明の抗体は、被験体に投与した場合に、被験体内の不溶性フィブリンと結合する。従って、本発明の抗体を利用して、被験体における不溶性フィブリン、すなわち血栓を可視化することが可能である。また、本発明の抗体に化合物又は分子を結合させることにより、被験体における不溶性フィブリン、すなわち血栓部位に該化合物又は分子を送達することが可能である。

20

【0067】

本発明の血栓可視化剤は、標識された本発明の抗体を含むことが好ましい。標識は、*in vivo* イメージングの分野において公知の任意の標識を用いることができる。そのような標識としては、蛍光物質、例えばIRDye 800シリーズ、フルオレセイン、FITC、蛍光放出金属（ ^{152}Eu 、ランタン系列等）等；化学又は生物発光物質、例えばルミノール、イミダゾール、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）等；放射性同位体、例えば ^{89}Zr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Cu 、 ^{11}C 、 ^{13}N 等；常磁性同位体、例えば ^{153}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Cr 、 ^{56}Fe 等；造影剤、例えばガドリニウム、ガドリニウム錯体、ヨード造影剤等が挙げられる。抗体と標識との結合は、当該技術分野で公知の方法により行うことができ、例えば直接的に化学結合してもよいし、あるいは適当なリンカーを介して間接的に結合してもよい。かかるリンカーとしては、例えば、*p*-イソチオシアネートベンジルデスフェリオキサミンB、チオカーバメート、アミド、カーバメート、マレイミドが挙げられる。

30

【0068】

また、本発明においては、標識の代わりに薬物若しくはプロドラッグ等の化合物又は分子を本発明の抗体に結合させることにより、該化合物又は分子を被験体の不溶性フィブリン存在部位、すなわち血栓部位に送達することが可能である。そのような薬物又はプロドラッグとしては、公知の血栓溶解剤（例えばウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織型プラスミノゲン活性化因子）等が含まれる。そのような薬物又はプロドラッグの血栓への標的化剤も本発明に包含される。

40

【0069】

さらに本発明は、本発明の抗体と、抗腫瘍性部分との複合体を提供する。本発明の抗体は、上述の通り、腫瘍における血栓部位（フィブリン）に結合するため、抗腫瘍性部分と結合させることによって、抗腫瘍性部分を腫瘍に送達することができる。本発明の抗体と結合させることができる抗腫瘍性部分は、当技術分野で公知の抗腫瘍性部分であれば特に限定されるものではない。抗腫瘍性部分としては、抗癌剤、例えばイリノテカン（CPT

50

- 11)、イリノテカンの代謝産物SN-38(10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシン)、アドリマイシン、タキソール、5-フルオロウラシル、ニムスチン、ラミニスチン等のアルキル化剤、ゲムシタピン、ヒドロキシカルバミド等の代謝拮抗剤、エトポシド、ビンクリスチン等の植物アルカロイド、マイトマイシン、プレオマイシン等の抗癌性抗生物質、シスプラチン等の白金製剤、ソラフェニブ、エルロチニブ等の分子標的剤、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、シクロフォスファミド、イフォスファミド、ブスルファン、MMAE(モノメチルアウリスタチンE)、DM-1(メルタンシン)、カリキアマイシン等;放射性同位体、例えばホウ素10(^{10}B)、インジウム111(^{111}In)やイットリウム90(^{90}Y)などが挙げられる。抗腫瘍性部分は、本発明の複合体が腫瘍組織中の血栓部位に送達された後、該部位において複合体から遊離し、腫瘍組織全体に到達できる程度の分子量であることが好ましい。

10

【0070】

また、抗体と抗腫瘍性部分との結合も、当該技術分野で公知の方法により行うことができ、直接的結合及び間接的結合のいずれでもよい。例えば、直接的な結合として、共有結合を利用することができる。間接的な結合としては、リンカーを介した結合を利用することができる。

【0071】

本発明においては、抗体と抗腫瘍性部分とがリンカーを介して結合していることが好ましい。リンカーを介して2つの分子が結合することにより、抗腫瘍性部分の抗原性を減弱することができ、被験体への投与に好ましい。リンカーについての一般的な技術は、例えばHermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996; Harris, J. M. and Zalipsky, S. 編, *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS Symposium Series, 1997; Veronese, F. and Harris, J. M. 編, *Peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Review* 54(4), 2002に記載されている。

20

【0072】

リンカーとは、2つの化合物を連結する2価以上の基を意味する。本発明において使用することができるリンカーとしては、特に限定されるものではないが、ポリアルキレングリコールリンカー、アルキレン基、ペプチド、糖鎖、及びその他の高分子担体が挙げられる。ポリアルキレングリコールリンカーの構成単位であるアルキレングリコールのアルキレン部分は、炭素数1~3000、好ましくは炭素数2~1000、より好ましくは炭素数2~100である。ポリアルキレングリコールリンカーの分子量は通常30~50000Da、好ましくは500~30000Daである。ポリアルキレングリコールリンカーは、好ましくはポリエチレングリコール(PEG)リンカーである。アルキレン基は、直鎖状又は分枝状のいずれであってもよい。

30

【0073】

またリンカーには、直鎖状のリンカー(2価のリンカー)と分枝状のリンカー(3価以上のリンカー)が含まれる。直鎖状リンカーは、その一端に抗腫瘍性部分を有し、別的一端に本発明の抗体を有する。分枝状リンカーは、通常、その各分枝(各鎖)に抗腫瘍性部分を有し、別的一端に抗体を有する。

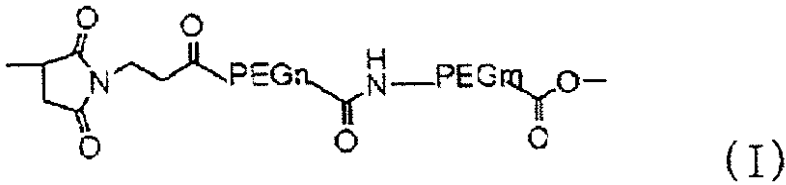
40

【0074】

直鎖状のリンカーの具体的な例としては、下記式Iのリンカー:

【0075】

【化1】



【0076】

〔式中、PEGはポリエチレングリコール鎖であり、n及びmはエチレングリコール単位の数であり、独立して5～100の整数を表す。〕

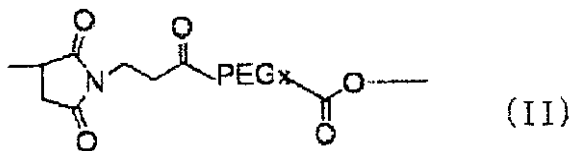
が挙げられる。式Iのリンカーは、通常、スクシンイミジル基を有する末端において抗体と連結し、他の末端において抗腫瘍性部分と連結する。

【0077】

さらに、直鎖状のリンカーの具体的な例としては、式IIのリンカー：

【0078】

【化2】



【0079】

〔式中、PEGはポリエチレングリコール鎖であり、xはエチレングリコール単位の数であり、5～100の整数を表す。〕

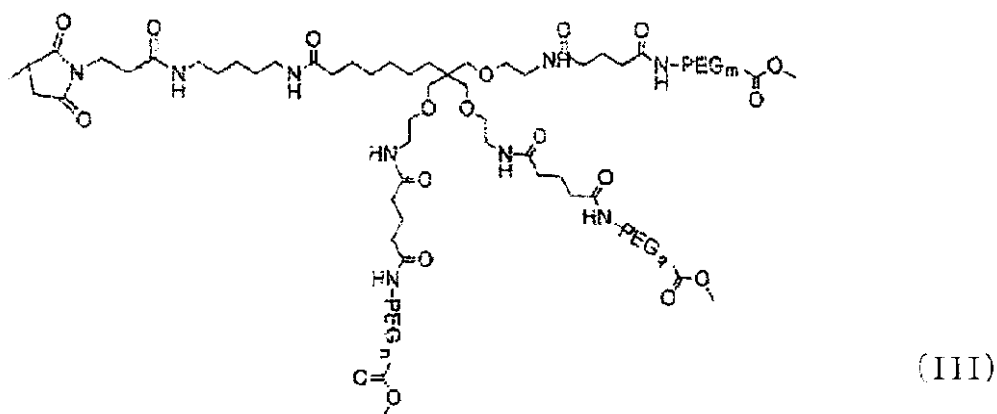
が挙げられる。式IIのリンカーは、通常、スクシンイミジル基を有する末端において抗体と連結し、他の末端において抗腫瘍性部分と連結する。

【0080】

分枝状のリンカーの具体的な例としては、式IIIのリンカー：

【0081】

【化3】



【0082】

〔式中、PEGはポリエチレングリコール鎖であり、n、m及びqはエチレングリコール単位の数であり、独立して5～100の整数を表す。〕

が挙げられる。式IIIのリンカーは、通常、スクシンイミジル基を有する末端において抗体と連結し、他の複数の末端において抗腫瘍性部分と連結する。この分枝状のリンカーは、例えば特許文献7の参考例1に記載のように調製することができる。

【0083】

リンカーを介して抗体と抗腫瘍性部分とを結合する技術は、当技術分野において公知で

10

20

30

40

50

ある。例えば、抗体とリンカーとの結合は、共有結合又は非共有結合（イオン結合、疎水性結合等）であり、好ましくは共有結合である。この結合は、本発明の複合体を被験体へ投与した場合に、血液中では抗腫瘍性部分が遊離しにくい結合であることが好ましい。そのような結合としては、マレイミド基とチオール基との結合、ハロエステルとチオールとを反応させて得られる結合、カルボキシル基とアミノ基とのアミド結合、チオール基とチオール基とのジスルフィド結合、アミノ基とアルデヒド基によるシッフ塩基、チオール基とカルボン酸とのチオエステル結合、水酸基とカルボキシル基とのエステル結合、アミノ基とスクアリン酸誘導体（例えばジメチルスクアリン酸）による結合、ジエニルアルデヒド基とアミノ基との結合等が挙げられる。このような結合の具体例としては、リンカーの一端に存在するマレイミド基と、抗体上のシステイン残基に含まれるチオール基との結合、リンカーの一端に存在するスクシンイミド基と、抗体上のリジン残基に含まれるアミノ基との脱水置換結合（例えばW O 2 0 0 8 / 0 9 6 7 6 0 号）、リンカーの一端に存在するアミノ基と、抗体上のアスパラギン酸又はグルタミン酸に含まれるカルボン酸との脱水縮合結合（例えばW S C D Iを使用する）等が挙げられる。抗体とリンカーとの結合の具体的な方法については、例えばW O / 2 0 1 0 / 0 5 5 9 5 0 号を参照されたい。

10

【 0 0 8 4 】

一方、抗体又はリンカーと抗腫瘍性部分との結合は、共有結合又は非共有結合（イオン結合、疎水結合等）であり、好ましくは共有結合である。特に、抗腫瘍性部分として抗腫瘍性化合物を用いる場合には、該結合は、本発明の複合体を被験体へ投与した場合に、血液中では抗腫瘍性部分が遊離しにくい結合であることが好ましい。このような観点から、抗体又はリンカーと抗腫瘍性部分との結合は、限定されるものではないが、好ましくはエステル結合、カルバメート結合、カーボネート結合、チオカルバメート結合であり、より好ましくはエステル結合である。エステル結合の場合は、腫瘍組織内のカルボキシルエステラーゼにより、又は非酵素的に結合が加水分解されて、本発明の複合体から徐放的に抗腫瘍性部分が遊離することが期待される。カルバメート結合の場合は、細胞内に抗体複合体のままエンドサイトーシスされた後、細胞内のカルボキシルエステラーゼで切断され、本発明の複合体から徐放的に抗腫瘍性部分が遊離することが期待される。カーボネート結合の場合は、非酵素的に結合が加水分解されて、本発明の複合体から徐放的に抗腫瘍性部分が遊離することが期待される。チオカルバメート結合の場合は、非酵素的に結合が加水分解されて、本発明の複合体から徐放的に抗腫瘍性部分が遊離することが期待される。

20

30

【 0 0 8 5 】

本発明の複合体において抗腫瘍性部分として抗腫瘍性化合物を用いる場合、抗体1分子へ結合する抗腫瘍性化合物の数は、理論的には特に限定されないが、複合体の安定性や製造容易性等の観点から、通常1～10個、好ましくは1～8個である。

【 0 0 8 6 】

例示的に抗腫瘍性部分としてS N - 3 8（10 - ヒドロキシー7 - エチルカンプトテシン）を、リンカーとしてポリエチレングリコールリンカーを使用する場合について具体的に説明するが、他の組み合わせを用いた場合であっても、当業者であれば適宜反応条件を変更することにより、目的とする本発明の複合体を製造することができる。

（I）先ず、一方の端にカルボキシル基を有し、他の一方の端にB o c、F m o c等で保護されたアミノ基を有するポリエチレングリコールとS N - 3 8とを脱水縮合させ、S N - 3 8の水酸基にポリエチレングリコールリンカーを導入する。

（II）一方の端にスクシンイミド基を有し、他の一方の端にマレイミド基を有するポリエチレングリコールと（I）の生成物とを混合し、スクシンイミド基と（I）の生成物のアミノ基とを反応させることにより、ポリエチレングリコールリンカーへマレイミド基を導入する。

（III）（II）の生成物と抗体とを混合し、（II）の生成物中のマレイミド基と抗体中のチオール基とを反応させ、（II）の生成物と抗体とを結合させることにより、本発明の複合体を得る。

【 0 0 8 7 】

40

50

本発明の複合体は、腫瘍組織内の不溶性フィブリンに結合して、抗腫瘍性部分を腫瘍に送達することができ、また長い期間にわたり腫瘍組織内に留まり、長い期間にわたって抗腫瘍効果を発揮し続けるという効果を有する。そのため、本発明の複合体は、腫瘍の予防又は治療剤として使用することが可能である。すなわち、本発明の複合体の有効量を被験体に投与することにより、該哺乳動物における腫瘍を予防又は治療することができる。さらに、本発明の複合体は、長い期間にわたり腫瘍組織内に留まり、腫瘍の境界領域で腫瘍に栄養を与える血管の形成を阻害することによっても、長い期間にわたって抗腫瘍効果を発揮し得る。

【0088】

本発明において治療又は予防の対象となる腫瘍は、限定されるものではなく、固形癌、例えば膀胱癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌及び肺癌である。

10

【0089】

本発明の複合体は、癌細胞そのものに標的化するのではなく、腫瘍血管から漏出したところに存在する不溶性フィブリンに対して標的化する。本発明の抗体は、上述したようにフィブリノーゲンには反応せず、不溶性フィブリンへの親和性が極めて高い。そのため、生体親和性の高い抗体-抗腫瘍性部分複合体はEPR効果(enhanced permeation and retention effect)で腫瘍血管から選択的に漏出し(正常血管からは高分子であるゆえに漏出しない)、漏出後腫瘍間質に存在する不溶性フィブリンと結合し、そこで足場を形成する。つまり長期間にわたって、本発明の複合体は間質フィブリンに存在し続ける。例えば、特許文献7に記載の実施例6を参酌するに、抗腫瘍性部分SN-38を本発明の抗体とエステル結合で結合させた場合、腫瘍内のカルボキシルエステラーゼにより、又は自然に、複合体からSN-38が徐放的に遊離する。SN-38は低分子であるために癌組織内を比較的自由に動きまわり、癌全体にいきわたり、癌細胞を効率よく攻撃する可能性が極めて高い。また、SN-38はその抗腫瘍効果が時間依存性であるために、このような長時間にわたる癌細胞のSN-38への暴露は、効率的に癌細胞を死滅させることができる。

20

【0090】

上述した血栓可視化剤、及び腫瘍の予防又は治療剤を含む本発明の薬剤は、抗体の他、薬学的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、薬学的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

30

【0091】

本発明の薬剤の投与方法は特に限定されるものではなく、経口投与、又は非経口投与、例えば皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、経皮投与、直腸投与、経鼻投与により行うことができる。

40

【0092】

本発明の薬剤を経口投与する場合は、錠剤、カプセル剤(硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル等)、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ剤、内用水剤、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等のいずれのものであってもよく、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。また、本発明の薬剤を非経口投与する場合は、例えば静脈内注射(点滴を含む)、筋肉内注射、腹腔内注射及び皮下注射用の注射剤(例えば溶液、乳剤、懸濁剤)、軟膏剤(特に眼軟膏剤)、クリーム剤、座剤、パップ剤、点眼剤、点鼻剤、吸入剤、リニメント剤、エアゾル剤等の外用剤等の製剤形態を選択することができ、注射剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態を提供される。

【0093】

50

これらの各種製剤は、医薬において通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、滑沢剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、pH調整剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、吸収促進剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等を適宜選択し、常法により製造することができる。

【0094】

本発明の薬剤に配合する抗体又は複合体は、抗体の種類、複合体及び複合体に含まれる抗腫瘍性部分の種類、その用途、剤形、投与経路等により異なるが、例えば総重量を基準として1～99重量%、好ましくは5～90%とする。

【0095】

また、本発明の薬剤の投与量及び投与間隔は、薬剤に含まれる抗体の種類、複合体に含まれる抗腫瘍性部分の種類、投与対象、被験体の年齢及び体重、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変更することができる。

【0096】

本発明の薬剤を投与する被験体は、特に限定されるものではなく、哺乳動物、例えばヒト、家畜（ウシ、ブタ等）、愛玩動物（イヌ、ネコ等）、実験動物（マウス、ラット、サル等）が含まれる。特に、血栓関連疾患の存在が疑われる被験体及び血栓関連疾患を有する被験体に使用することが好ましい。また本発明の複合体を含む薬剤については、特に腫瘍の存在が疑われる被験体及び腫瘍を有する被験体に使用することが好ましい。

【0097】

血栓可視化剤の場合には、薬剤の投与後、被験体における抗体の存在又は位置を、標識を指標として可視化する。好ましくは、抗体の存在又は位置は、公知の画像化手法により可視化する。画像化手法は、使用する標識、被験体の種類、画像化する部位などにより異なるが、コンピュータ断層撮影法（CT）、ポジトロン断層法（PET）、核磁気共鳴画像法（MRI）、その他のin vivoイメージングシステムを用いることができる。これにより、抗体の標識に基づいて、被験体内の血栓の存在又は位置を可視化することができる。

【実施例】

【0098】

以下、実施例及び参考例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0099】

先ず、本発明者らは、以前に開発したフィブリンと結合し且つフィブリノーゲンと結合しない抗体、受託番号NITE P-923を有するハイブリドーマ102-10から産生される抗体をキメラ化したもの（以下、この抗体を「102-10抗体」とも称する）について、以下に示す通り、その性状及び機能について評価した。なお、102-10抗体については特許文献7（特開2012-72号公報）参照のこと。

【0100】

（参考例1）

以下に示す方法にて、102-10抗体のフィブリン特異性について解析した。

【0101】

<ELISA>

フィブリノーゲンをウェル上に固相化したプレート（フィブリノーゲンプレート）は、Maxi soapプレート（nunc社製）に、ヒト又はマウス由来のフィブリノーゲン（Sigma社製、PBSにて希釈したもの）を1μg/100μL/ウェルになるよう添加し、該プレートにシールをして、4℃にて一晩静置することにより作製した。

【0102】

フィブリンプレートは、0.05NIHU/mL トロンピン（Sigma社製）、1mM CaCl₂及び7mM L-システイン（Merck社製）を含有するTBS 100μLを、前記フィブリノーゲンプレートのウェルに添加し、TBS-Tによる洗浄を行い、N102（日油社製）にてブロッキングを施すことにより作製した。

10

20

30

40

50

【0103】

また、ペルオキシダーゼラベリングキットNH₂ (DOJINDO社製)を用い、102-10抗体にペルオキシダーゼを標識した。さらに、この標識した102-10抗体をブロックエース (DSファーマバイオ・メディカル社製)にて1μg/mLになるよう調製した。

【0104】

そして、この抗体希釈液100μLを、前記フィブリノーゲンプレート及びフィブリンプレートに添加し、室温で30分振盪した。その後、TBS-Tで洗浄し、1step slow TMB (Thermo社製)100μLを添加して比色を行った。停止反応は2規定のH₂SO₄を100μL加えることによって行った。また、吸光度(O.D.)は、SPECTRA MAX 190 (日本モレキュラーデバイス社製)で吸光波長450nmにおける吸収を測定することにより得た。得られた結果を図1に示す。

10

【0105】

<不溶性フィブリンの酵素処理>

フィブリノーゲン10mg、0.02M CaCl₂、2.5NIHU/mL トロンピン及び7mM L-システインを含有するTBSを、1.5mLチューブ中にて、37、1時間インキュベートすることにより、フィブリンクロットを作製した。

【0106】

このようにして得られたフィブリンクロットに、2μg/mL エラスターゼ (Elastase、Sigma社製)、70μg/mL カリクレイン (Kallikrein、Sigma社製)、10μg/mL カテプシンB (Cathepsin B、Sigma社製)、210Units/mL カテプシンD (Cathepsin D、Sigma社製)、200ng/mL MMP-9 (Sigma社製)又は0.1μM プラスミン (Plasmin、American diagnostica社製)を添加することにより、該フィブリンクロットを分解した。そして、各分解物をELISAプレートに固相化して、前記標識102-10抗体の反応性を解析した。得られた結果を図2に示す。

20

【0107】

<市販抗体との比較>

下記市販の抗フィブリン抗体2種をペルオキシダーゼにて標識した。NYB-T2G1 (Accurate Chemical and Scientific社製)、MH-1 (American Tissue and Cell Culture社製)そして、これら標識抗体及び前記標識102-10抗体について、フィブリン、フィブリノーゲン、D-ダイマー (積水メディカル社製)を各1μg固相化したELISAプレートを用い、各抗体の親和性を解析した。得られた結果を図3に示す。

30

【0108】

図1に示した結果から明らかなように、ヒト及びマウスいずれにおいても、102-10抗体は、不溶性フィブリンに対しては高い親和性を示した一方で、フィブリノーゲンに対する親和性は認められなかった。

40

【0109】

さらに、図2に示す通り、102-10抗体は、不溶性フィブリンとは結合する一方で、不溶性フィブリンを各種酵素にて処理して得られた溶解性フィブリン (FDP:フィブリン分解産物)とは結合しないことが明らかになった。

【0110】

また、図3に示す通り、NYB-T2G1は、そのエピトープがフィブリン重合によって覆われてしまうため、不溶性フィブリン及びD-ダイマーに対する親和性は低かった。また、MH-1は可溶性フィブリン (D-ダイマー)に対しては高い親和性を示すものの、NYB-T2G1同様に、沈着フィブリン (不溶性フィブリン)に対する親和性は低か

50

った。一方、102-10抗体は、フィブリノーゲン及びD-ダイマーとの親和性は認められず、沈着した不溶性フィブリンに対してのみ高い親和性を示した。

【0111】

(参考例2)

以下に示す方法にて、102-10抗体による免疫染色を行い、組織サンプルにおけるフィブリン形成の検出を試みた。

【0112】

<組織免疫染色>

各パラフィン包埋組織サンプルを脱パラフィン処理し、120 で10分間、10mMクエン酸バッファー(pH6)にて抗原賦活した。5%スキムミルク/PBSにてブロック処理を施した後、10µg/mLの102-10抗体と共に、室温で1~2時間インキュベートした。次いで、ペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIgG二次抗体(MBL社製)と共に60分間インキュベートした。そして、DAB(Dako社製)にて染色した後に、ヘマトキシリン(武藤化学社製)にて核を染色した。得られた結果を図4~6に示す。

10

【0113】

図4に示した結果から明らかなように、正常な組織においては102-10抗体によってフィブリン形成は認められなかった。それに対し、癌化した脳組織、肺組織及び膵臓の組織いずれにおいてもフィブリンが形成されていることが102-10抗体によって検出された。また、図5に示す通り、前記脳腫瘍、肺癌及び膵臓癌同様に、大腸癌及び大腸腺腫瘍においても、102-10抗体によりフィブリンが検出された。しかし、反応性リンパ節炎(リンパ腫)においてはフィブリン形成が認められなかった。このように、102-10抗体によって、癌特異的なフィブリン形成(無症状下で持続的に形成されるフィブリン)を検出できることが明らかになった。

20

【0114】

さらに、図には示していないが、脳梗塞及び心筋梗塞、これらの発症時においては102-10抗体によりフィブリンが検出された。一方、図6に示す通り、脳梗塞及び心筋梗塞いずれにおいても発症してから3週間後にはフィブリン形成が認められず、フィブリンの消失が確認された。

【0115】

また、図6に示す通り、急性膵炎においては102-10抗体によりフィブリンが検出されたが、慢性膵炎においてはかかるフィブリン形成が認められなかった。

30

【0116】

(参考例3)

以下に示す方法にて、血栓が生じる疾患のモデル動物を用い、102-10抗体のフィブリン検出能を評価した。

【0117】

<動物モデル>

化学発癌モデルは、メスのFVB/Nマウスを剃毛し、アセトンで希釈したDMBA(250µg/mL、Sigma社製)を1回塗布し、1週間後からアセトンで希釈したPMA(25µg/mL、Sigma社製)を毎週塗布し、32週まで行うことにより、調製した。

40

【0118】

脳梗塞モデルは、メスのSprague-Dawleyラットをイソフルラン(アボット社製)で麻酔して、内頸動脈を暴露して、ポリエチレンチューブ(内径0.5mm)でカニューレ処置し、また中大脳動脈は3-0のナイロンフィラメント(Ethicon社製)で塞栓形成を促すことにより、調製した。

【0119】

炎症モデルの作製においては、メスのDBA/1Jマウスに、抗collagen2抗体(Chondrex社製)と、抗collagen4抗体(クローン35-4、本発明

50

者らが所属する研究室にて樹立)とを腹腔内にday 0で2mg投与した。さらに、50 μ gのLPS(Chondrex社製)を3日後に腹腔内投与した。

【0120】

創傷治癒モデルは、メスのFVB/Nマウスをイソフルランで麻酔して、1cmの傷をマウスの背中につけることにより、調製した。そして、傷の処置はせずに治癒の様子を毎日観察した。

【0121】

以上の3種の血栓形成が生じるモデル動物(脳梗塞モデル、炎症モデル及び創傷治癒モデル)については、102-10抗体を用いた組織免疫染色によっても解析した。得られた結果を図7に示す。

10

【0122】

<PETプローブの作製>

102-10抗体とp-イソチシアネートベンジル-デスフェリオキサミンB(p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine B、DF、Macrocyclics社製)とを、DFと抗体の比(1:1~1:3)にて結合させ、Sephadex G-50(GE)にて精製した。また、 ^{89}Zr -シュウ酸塩(oxalate)はサイクロトロンで作製した。そして、DFを結合した102-10抗体(100 μ g/20 μ L PBS)と5.0-5.6 MBqの ^{89}Zr -oxalate(3.7-5.6 GBq/mL, pH 7-9)とを1時間室温でインキュベートし、Sephadex G-50で精製した。このようにして得られたPETプローブ(図8参照)は、放射化学的収率は73-96%を達成し、純度は96-98%で、50 mM DTPAを用いた薄層クロマトグラフィーによる特異活性は37-44 kBq/ μ gであった。

20

【0123】

<PET/CT>

化学発癌モデルについては、前記PETプローブを用い、PET/CTを行った。すなわち、未標識換算で100 μ g/マウスの抗体投与量にて、3.7 MBqの前記PETプローブを化学発癌モデルマウスに尾静脈から投与した。PETのデータは、小動物用PETシステム「Inveon」(small-animal PET system)を用い、麻酔下で10~20分間撮影することにより得た。体温はランプや恒温パットで37 $^{\circ}\text{C}$ になるよう保った。画像は、減衰補正なしで3D最大事後確率法(3D maximum a posteriori; 18 iterations with 16 subsets, = 0.2 resolution)を用いて処理した。PETスキャンの後、CTイメージは90 kVp, 200 μ AのX線光源を用いて、小動物用PETシステム「R_mCT2」(理学社製)にて撮影した。得られた結果を図9に示す。

30

【0124】

またX線撮影後、腫瘍を取り出し、凍結組織包埋剤(optimal-cutting-temperature(OCT) compound、サクラファインテック社製)を用いて-20 $^{\circ}\text{C}$ で包埋した。20- μ m厚の乾燥切片をイメージングプレート(富士フィルム社製)で露光し、ヘマトキシリン及びエオジン(武藤化学社製)にて染色(H&E染色)した。また、取り出した腫瘍については、102-10抗体による免疫染色及び該抗体をプローブとするオートラジオグラフィーによっても解析した。得られた結果を図10に示す。

40

【0125】

図7に示す通り、図6に示した脳梗塞及び心筋梗塞の解析結果同様に、脳梗塞、関節炎及び皮膚損傷においては、発症時又は創傷時には102-10抗体によってフィブリンが検出されたが、いずれの疾患モデル及び創傷モデルにおいても発症等から2~3週間後にはフィブリンが消失していることが確認された。

【0126】

また、図9及び10に示す通り、化学発癌モデルの体内において、放射性標識した10

50

2 - 10 抗体は腫瘍特異的に集積されることが明らかになった。

【0127】

従って、102 - 10 抗体はインビトロのみならずインビボにおいてもフィブリンを特異的に検出できることが確認された。また、かかるフィブリンの検出を通して、生体内の癌の検出にも102 - 10 抗体が利用できることも明らかになった。また、脳梗塞、心筋梗塞及び炎症性疾患等の良性疾患においては、かかるフィブリンの検出を通して、その疾患の状態（経過情報）も得ることができるとも明らかになった。

【0128】

（参考例4）

以下に示す方法にて、102 - 10 抗体によるフィブリンクロット中のフィブリン分子の検出を試みた。また、102 - 10 抗体と、非還元フィブリノーゲン又は還元フィブリノーゲンとの親和性の有無についても解析した。

【0129】

<ヒトフィブリン切片蛍光免疫染色>

参考例1に記載の方法と同様の方法にて作製したフィブリンクロットを、OCT compoundを用いて凍結し、6 μm厚の凍結切片を調製した。これら凍結切片を風乾させた後、PBSで洗浄し、5%スキムミルク/PBSでブロッキングした。次いで、Alexa Fluor 647 タンパク質ラベリングキット（Invitrogen社製）で標識した102 - 10 抗体を添加し、1時間インキュベートした後、Fluoromount G (Southern Biotech社製)で封入した。そして、このようにして調製したサンプルを蛍光顕微鏡にて観察した。得られた結果を図11に示す。

【0130】

<ウェスタン ブロットイング>

1 μgのヒト及びマウス由来のフィブリノーゲンを、5% 2 -メルカプトエタノール（2 - ME）含有サンプルバッファー（Bio - Rad社製）又は不含サンプルバッファー（Bio - Rad社製）で各々希釈した。そして、2 - ME含有サンプルバッファーで希釈したサンプルのみを96 で5分間熱処理した。次いで、これらサンプルを4 - 20% TGXゲル（Bio - Rad社製）にアプライし、200Vの定電圧で30分間かけ泳動した。泳動後のゲルを、トランスブロッタターボミニPVDF（Bio - Rad社製）に2.5A、25V、7分の条件で転写した。転写後のメンブレンをスナップi.d.（Millipore社製）に移し、0.3%スキムミルク/0.1%PBS - Tでブロッキングした後に、1 μg/mLのペルオキシダーゼ標識した102 - 10 抗体と共にインキュベートし、抗原抗体反応を行った。次いで、PBS - Tにて洗浄した後、ECLプライム（GE社製）にて化学発光を生じさせ、ペルオキシダーゼ標識した102 - 10 抗体が結合した抗原を検出した。得られた結果を図13に示す。

【0131】

また、この検出後、メンブレンをPBS - Tにて洗浄した後、クマシーブリリアントブルー（CBB）にて染色した。得られた結果を図12に示す。

【0132】

なお、フィブリノーゲンを構成する3本鎖の分子量は、A 鎖が約67kDaであり、B 鎖が約56kDaであり、鎖が約48kDaである。

【0133】

図11に示した結果から明らかなように、フィブリンクロットにおいてフィブリン分子どうしが架橋化されている状態を反映し、102 - 10 抗体によってフィブリンクロットは網目状に染色された。

【0134】

また、図12及び13に示す通り、参考例1～3に示した結果同様に、102 - 10 抗体によって非還元状態にあるフィブリノーゲンは検出することは出来なかった。しかし、102 - 10 抗体によって還元状態において、複合体形成が解消されたフィブリノーゲンのB 鎖（分子量：約56kDa）は検出できることが明らかになった。従って、102

10

20

30

40

50

- 10 抗体のエピトープは、変性（還元）されることによって露呈されるフィブリノーゲン B 鎖内の部位にあることが明らかになった。

【0135】

（参考例 5）

102 - 10 抗体のエピトープの同定を以下に示す方法にて試みた。

【0136】

<アミノ酸シーケンス>

参考例 4 に記載の方法にて、還元・熱処理したフィブリノーゲンを SDS - PAGE にて展開した。次いで、イージーステイン・リバーズ及びアトプレップ MF（共に Atto 社製）を用い、ゲルからフィブリノーゲン B 鎖を抽出した。抽出したフィブリノーゲン B 鎖を、リシルエンドペプチダーゼにて切断した。そして、ウェスタンブロッティングにより、切断されたフィブリノーゲン B 鎖ペプチドの中から、102 - 10 抗体に結合する最小分子量のペプチド断片を抽出した。次いで、このペプチド断片についてアミノ酸シーケンスを行った。

10

【0137】

その結果、フィブリノーゲン B 鎖（配列番号：19）の第 179 位のヒスチジン～第 264 位のリジンからなる領域（86 アミノ酸）内に、102 - 10 抗体のエピトープがあることが明らかになった（図 14 参照）。次に、102 - 10 抗体のエピトープを限定すべく、以下に示す方法にて実験を行った。

【0138】

<競争阻害実験>

前記 86 アミノ酸からなる領域をさらに 5 分割して、合成ペプチドを作製した。これらペプチドを用いて、競争阻害実験を行った。すなわち、1 μg/mL の 102 - 10 抗体に対し、0.01 ~ 100 μM で段階希釈した前記合成ペプチドを加え、室温で 30 分インキュベートした。抗体とペプチドとの混合溶液を 100 μL ずつフィブリンプレートに添加し、室温で 30 分インキュベートした。その後、TBS - T で洗浄し、1 step slow TMB（Thermo 社製）100 μL を添加して 5 分間比色を行った。停止反応は 2 規定の H₂SO₄ を 100 μL 加えることにより行った。また、吸光度の測定は、SPECTRA MAX 190（日本モレキュラーデバイス社製）で 450 nm の吸光波長を測定することにより得た。得られた結果の一部を図 15 に示す。なお、図 15 に記載の Fib - 1、Fib - 3、No. 1 及び No. 5 の配列は以下の通りである。

20

Fib - 1 : N I P V V S G K E C E E I I R K G G E T S（フィブリノーゲン B 鎖の第 179 ~ 252 位、配列番号：21）

Fib - 3 : C N I P V V S G K E（フィブリノーゲン B 鎖の第 231 ~ 240 位、配列番号：22）

No. 1 : H Q L Y I D E T V N S N I P T N L R V L R S I L E N L R S K（フィブリノーゲン B 鎖の第 179 ~ 208 位、配列番号：23）

No. 5 : C N I P V V S G K E C E E I I R（フィブリノーゲン B 鎖の第 231 ~ 246 位、配列番号：1）

また、Fib - 1 及び Fib - 3 については、キャリアタンパク質（KLH）をコンジュゲートしたもの（Fib - 1 KLH 及び Fib - 3 KLH）も用意し、競争阻害実験に供した。

30

40

【0139】

図 15 に示した結果から明らかなように、前記 86 アミノ酸からなる領域（フィブリノーゲン B 鎖の第 179 ~ 264 位）において、102 - 10 抗体は、第 231 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位（No. 5）のみと結合し、さらには No. 5 に含まれる第 231 ~ 240 位のアミノ酸からなる部位（Fib - 3 KLH）とは結合しなかった。従って、102 - 10 抗体のエピトープは、フィブリノーゲン B 鎖の第 231 ~ 246 位のアミノ酸（配列番号：1 に記載のアミノ酸）からなる部位であることが明らかになった。

50

【0140】

また、フィブリノーゲン B 鎖の第 44 位のアルギニンと第 45 位のグリシンとの間が トロンピンにより切断され、フィブリノペプチド B (フィブリノーゲン B 鎖の第 1 ~ 44 位のアミノ酸からなるポリペプチド) が除去等されることにより、フィブリノーゲンはフィブリンモノマーとなり、該モノマーが重合、架橋化することによって、不溶性フィブリンは形成される。従って、102 - 10 抗体のエピトープは、不溶性フィブリンにおいて、フィブリノーゲン 鎖 (フィブリノーゲン B 鎖からフィブリノペプチド B を除去したタンパク質) の第 187 ~ 202 位のアミノ酸からなる部位である。

【0141】

また、フィブリノーゲン B 鎖が保持されたまま、フィブリノーゲン A 鎖のみが切断され、フィブリノペプチド A が除去されても、フィブリノーゲンから重合可能なフィブリンモノマーは生成される。従って、不溶性フィブリンにおいても、フィブリノーゲン B 鎖の第 231 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位は、102 - 10 抗体のエピトープとなり得る。

10

【0142】

次に、同定した 102 - 10 抗体のエピトープについてコンピューターシミュレーションにて解析した。その結果、当該エピトープは、フィブリノーゲン分子において 鎖と結合している領域であることが明らかになった (図 16 参照、図中の矢印は 102 - 10 抗体のエピトープを示す)。また、B 鎖に結合している 鎖の部位は、フィブリノーゲン 鎖 (配列番号: 20) の第 232 位のリジン ~ 第 246 位のプロリンからなる領域 (K N W I Q Y K E G F G H L S P、配列番号: 2) であることも明らかになった。

20

【0143】

(実施例 1)

本発明の抗体の作製

参考例 5 に示したコンピューターシミュレーションの結果から、102 - 10 抗体がフィブリノーゲンに結合できないのは、当該抗体のエピトープは分子内に隠れている領域であることが原因であると想定される。また、フィブリノーゲンがトロンピンによって切り出されてフィブリンモノマーを生成し、さらにそれらが重合、架橋化することによって、不溶性フィブリンに変化する。この構造変化によって、フィブリノーゲン分子内に隠れていた前記領域が暴露されることにより、102 - 10 抗体が不溶性フィブリンに結合できるようになると想定される。

30

【0144】

そこで、フィブリノーゲン B 鎖の第 231 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位と、フィブリノーゲン 鎖の第 232 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位とは、不溶性フィブリンに結合し且つフィブリノーゲンに結合しない抗体を作製する上で極めて有用であると考え、これら部位を各々抗原とする抗体の作製を、以下に示す方法にて試みた。

【0145】

< 抗原の調製 >

まず、フィブリノーゲン 鎖の第 231 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位又はフィブリノーゲン 鎖の第 232 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位をコードする抗原遺伝子を、pET21b の制限酵素サイト (Nde I - Hind III) に挿入することにより、ヒスチンタグを融合させた抗原ペプチドを発現させることのできるプラスミド DNA を調製した。そして、これらプラスミド DNA を、大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen 社製) に各々導入した。

40

【0146】

次に、前記大腸菌を LB 培地 200 mL に植菌し、37 °C、100 rpm で培養し、培地の OD₆₀₀ が 0.6 ~ 0.8 になった時に培養を一旦止め、氷上にて 15 分間静置した。その後、終濃度 1 mM になるように IPTG (イソプロピル - 1 - チオ - β - D - ガラクトピラノシド) を培地に添加した後、18 °C、100 rpm にて低温培養を行った。そして、IPTG 添加 (抗原遺伝子の発現誘導) 後 16 時間培養し、48, 820 g、1

50

5 分間遠心し、集菌した。

【0147】

集菌した後、500 mM NaCl 含有 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) に懸濁し、氷上で超音波破碎した。破碎後、48,820 g、60 分間遠心し、上清を回収した。次いで、回収した上清を、500 mM NaCl 含有 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) にて平衡化した 1 mL Ni-NTA アガロース (インビトロジェン社製) に通し、該アガロースを 5 mM イミダゾール及び 500 mM NaCl 含有 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) にて洗浄した。そして、Ni-NTA アガロースに捕捉されている抗原ペプチドを 100 mM イミダゾール含有 PBS (-) にて溶出した。得られた抗原ペプチドは、アミコン ウルトラ-15 10 K (ミリポア社製) を用いた限外ろ過により、PBS (-) にバッファー置換した。また、この抗原ペプチドの精製純度は、SDS-page 10-20% (DRC 社製) を用いた SDS-PAGE にて確認した。

10

【0148】

< 抗体の作製 >

フィブリノーゲン 鎖の第 232 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体 (以下、「抗鎖抗体」とも称する) の作製は、ITM 株式会社 に委託した。すなわち、前記にて調製した鎖由来の抗原ペプチドをマウスの尾根部筋肉内に注射し、該マウスの腸骨リンパ節を用い、モノクローナル抗体を作製した (マウス腸骨リンパ節法、Sado Y. ら、Acta Histochem. Cytochem., 2006 年、39 巻、89 ~ 94 ページ 参照)。フィブリノーゲン B 鎖の第 231 ~ 246 位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体 (以下、「抗鎖抗体」とも称する) は以下の方法にて作製した。

20

【0149】

先ず、前記にて調製した鎖由来の抗原ペプチドのヒスチジンタグを定法に沿って 4 M - タグに置換した。そして、4 M - タグを融合させた抗原ペプチド (免疫原) を、マウス 6 匹に投与した。初回投与においては、FCA と免疫原とを混和したエマルジョンを、免疫原が 50 µg / マウスとなるように調製して腹腔へ投与した。追加免疫は 2 ~ 3 週間おきに行い、Sigma アジュバントシステム 200 µL に免疫原 50 µg を混和し、マウス腹腔に投与した。

30

【0150】

追加免疫 3 回目以降、投与後 7 日目に免疫マウス尾静脈より採血を行った。血液を 12,000 r.p.m.、10 分間遠心して血清成分を分離し、-30 にて測定まで凍結保管した。そして、これら血清成分 (免疫マウス抗血清) に含まれる抗フィブリン抗体の抗体価を、免疫原、フィブリノーゲン又はフィブリンを固相化したプレートを用いた ELISA 法にて評価し、抗体価の推移を検討した。

【0151】

その結果、抗体価の上昇が認められたマウスに、PBS に溶解した免疫原 50 µg を尾静脈より投与し、最終免疫を実施した。そして、最終免疫 4 日後にマウスから脾臓を摘出し、脾細胞を得た。得られた脾細胞全てと、p3.X63 マウスミエローマ細胞とを、PEG 法にて融合した。得られた融合細胞を細胞融合用培地に懸濁し、脾細胞換算で 2.0×10^5 細胞 / ウェルとなるように、96 ウェルプレートに播いて培養した。

40

【0152】

培養して得られたハイブリドーマ培養上清を、免疫原を固相化したプレートを用いた ELISA 法によって評価し、一次スクリーニングを行った。次に、一次スクリーニングにおいて陽性と判定されたハイブリドーマについて、免疫原、フィブリノーゲン又はフィブリンを固相化したプレートを用いた ELISA 法にて評価し、二次スクリーニングを行った。そして、二次スクリーニングにおいて陽性と判定されたハイブリドーマを、フィブリンに結合し且つフィブリノーゲンに結合しない抗体を産生するハイブリドーマとして選択し、さらに限界希釈法にてモノクローン化した。

50

【0153】

(実施例2)

実施例1にて作製した抗鎖抗体及び抗鎖抗体と、102-10抗体とを、以下に示すELISA法にて比較した。なお、実施例1にて樹立したハイブリドーマのうち、Fib-0355及びFib-03435を選択し、これらハイブリドーマが産生する抗体を、抗鎖抗体として以下に示すELISA法に供した。また、実施例1にて樹立したハイブリドーマのうち、13-30及び34-105を選択し、これらハイブリドーマが産生する抗体を、抗鎖抗体として以下に示すELISA法に供した。

【0154】

<ELISA法>

各抗体溶液を10 μ g/mLで100 μ Lずつ、前記フィブリンプレートと前記フィブリノゲンプレートとに添加し、1時間室温で静置した。TBS-Tにて洗浄した後、二次抗体としてbethyl anti-Human IgG-HRP(x1000希釈)又はbethyl anti-mouse IgG-HRP(x10000希釈)を添加した。そして、TBS-Tにて洗浄した後、OPDで10分間比色し、492nmの吸収波長を測定した。得られた結果を図16に示す。

10

【0155】

図17に示した結果から明らかなように、今回作製した抗鎖抗体及び抗鎖抗体はいずれもフィブリノーゲンに対しては結合することなく、不溶性フィブリンに対しては高い親和性を示した。

20

【0156】

また、これら抗体の不溶性フィブリンに対する親和性(492nmにおける吸光度)はいずれも、102-10抗体のそれよりもはるかに高いものであることが明らかになった。すなわち、Fib-0355抗体、Fib-3435抗体、13-30抗体及び34-105抗体の不溶性フィブリンに対する親和性は、102-10抗体のそれぞれの各々12倍、9倍、6倍、16倍であった。

【0157】

さらに、フィブリノーゲンに対する親和性(492nmにおける吸光度)に対する不溶性フィブリンのその比率は、Fib-0355抗体、Fib-3435抗体、13-30抗体、34-105抗体及び102-10抗体において、13倍、18倍、140倍、25倍及び3倍であり、今回作製した抗鎖抗体及び抗鎖抗体はいずれも、102-10抗体よりも不溶性フィブリンに対して高い特異性を示した。

30

【0158】

従って、前記参考例において実証された、インビトロ及びインビボにおける不溶性フィブリン(血栓)の検出、血栓関連疾患の判定、血栓の可視化(例えば、PET/CT)等は、本発明の抗鎖抗体及び抗鎖抗体を利用しても当然行うことができる。さらに、特許文献7において本発明者らが開示した抗腫瘍性化合物等の血栓部位への送達も、本発明の抗鎖抗体及び抗鎖抗体を利用しても当然行うことができる。

【0159】

(実施例3)

前述のFib-0355が産生する抗体(Fib-0355抗体)及び34-105が産生する抗体(34-105抗体)について、以下に示す方法にて可変領域及び相補性決定領域(CDR)の配列を決定した。

40

【0160】

まず、1x10⁶個の各ハイブリドーマより、RNAiso Plus(TAKARA社製)及びRNeasyミニキット(QIAGEN社製)を用い、トータルRNAを抽出した。抽出したmRNAを鋳型として、ハイキャパシティcDNA逆転写キット(Applied Biosystems社製)及び付属のランダムプライマーを用い、逆転写反応によりcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型に混合プライマーを使用してPCRを行い、抗体可変領域をクローニングした。なお、混合プライマーとして、カッパー

50

L鎖可変領域(V)5'のセンスプライマー17種、V3'のリバースプライマー3種、H鎖可変領域(VH)5'のセンスプライマー19種、VH3'のリバースプライマー3種、これらプライマーを一定の割合を混合して使用した。また、このPCRにて、ポリメラーゼはプラチナTaqDNAポリメラーゼハイフィデリティ(Invitrogen社製)を使用し、緩衝液等は付属の試薬を使用した。

【0161】

次に、得られたPCRプロダクトをアガロースゲル電気泳動にて展開し、サイズより目的とするVH及びVL領域と推測されるバンドを切り出した。次いで、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen社製)を用い、ゲルからcDNAを抽出した。抽出したcDNAをpGEM-T Easyベクターシステム(promega社製)にTAクローニングにて挿入し、目的配列を含むクローンを複数取得した。宿主の大腸菌にはJM109又はDH5αを使用し、37℃、ブルーホワイト選択用LB培地(50ug/mlアンピシリン含む)にて、JM109は約12時間、DH5αは約16時間培養した後、ホワイトコロニーを選択した。そして、得られたホワイトコロニーから、QIAprepスピンミニプレップキット(QIAGEN社製)を用いて、プラスミドDNAを抽出した。

10

【0162】

次に、抗体可変部領域を含む複数のクローンについて、ビッグダイターミネーターv3.1サイクルシークエンシングキット(applied Biosystems社製)及びアプライドバイオシステム3130xlジェネティックアナライザー(applied Biosystems/Hitachi社製)を用いてシークエンシングを行い、目的の抗体可変領域の候補配列を取得した。

20

【0163】

そして、取得した候補配列をNCBIのIgBLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)にかけ、抗体配列とミエローマ由来の配列とに選別した。さらに取得した可変領域の配列情報と、ウェブ上のデータベース(IMG T:<http://www.imgt.org>)に収録されている配列情報とを比較し、CDR領域を決定した。得られた結果を図18及び19に示す。また、このようにして同定された34-105抗体及びFib-0355抗体の可変領域及びCDRのアミノ酸配列を、以下に示す配列番号にて配列表においても示す。

30

34-105抗体のL鎖(軽鎖)可変領域のアミノ酸配列:配列番号:3

34-105抗体のL鎖CDR1~3のアミノ酸配列:配列番号:4~6

34-105抗体のH鎖(重鎖)可変領域のアミノ酸配列:配列番号:7

34-105抗体のH鎖CDR1~3のアミノ酸配列:配列番号:8~10。

Fib-0355抗体のL鎖(軽鎖)可変領域のアミノ酸配列:配列番号:11

Fib-0355抗体のL鎖CDR1~3のアミノ酸配列:配列番号:12~14

Fib-0355抗体のH鎖(重鎖)可変領域のアミノ酸配列:配列番号:15

Fib-0355抗体のH鎖CDR1~3のアミノ酸配列:配列番号:16~18。

【産業上の利用可能性】

【0164】

以上説明したように、本発明によれば、フィブリノーゲンと結合せず且つ不溶性フィブリンに対する親和性及び特異性が高い抗体を提供することが可能となる。かかる抗体を用いることにより、高感度に、信頼性をもって、且つ簡便に不溶性フィブリン及び血栓の存在を検出することができ、結果として血栓関連疾患を判定することが可能となる。また、かかる抗体を用いることにより、適当な化合物又は分子を血栓が存在する部位、例えば腫瘍に送達させることが可能となる。従って、本発明は、医療診断分野や医薬分野において有用である。

40

【配列表フリーテキスト】

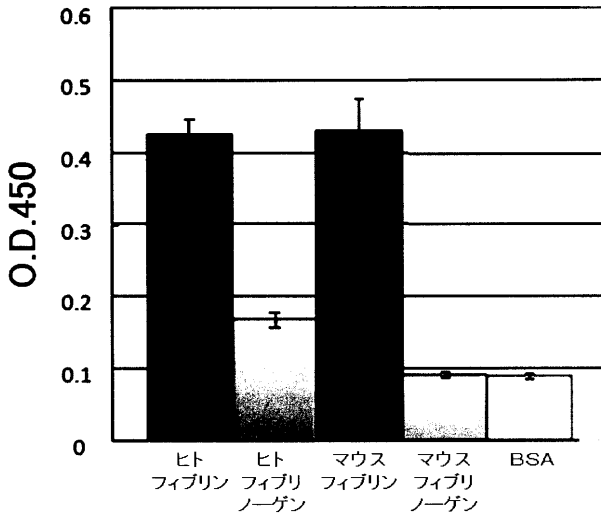
【0165】

配列番号:3

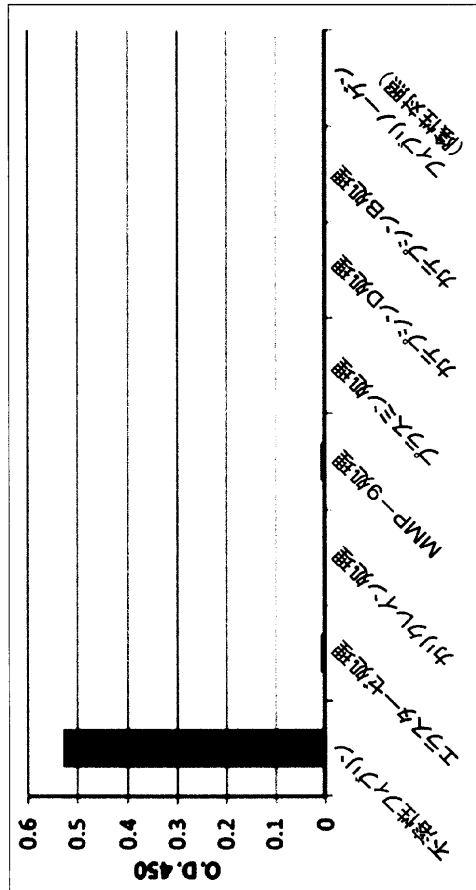
50

- < 2 2 3 > 輕鎖可変領域 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 4
- < 2 2 3 > 輕鎖 C D R 1 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 5
- < 2 2 3 > 輕鎖 C D R 2 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 6
- < 2 2 3 > 輕鎖 C D R 3 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 7
- < 2 2 3 > 重鎖可変領域 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 8 10
- < 2 2 3 > 重鎖 C D R 1 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 9
- < 2 2 3 > 重鎖 C D R 2 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 1 0
- < 2 2 3 > 重鎖 C D R 3 (3 4 - 1 0 5)
配列番号 : 1 1
- < 2 2 3 > 輕鎖可変領域 (F i b - 0 3 5 5)
配列番号 : 1 2
- < 2 2 3 > 輕鎖 C D R 1 (F i b - 0 3 5 5)
配列番号 : 1 3 20
- < 2 2 3 > 輕鎖 C D R 2 (F i b - 0 3 5 5)
配列番号 : 1 4
- < 2 2 3 > 輕鎖 C D R 3 (F i b - 0 3 5 5)
配列番号 : 1 5
- < 2 2 3 > 重鎖可変領域 (F i b - 0 3 5 5)
配列番号 : 1 6
- < 2 2 3 > 重鎖 C D R 1 (F i b - 0 3 5 5)
配列番号 : 1 7
- < 2 2 3 > 重鎖 C D R 2 (F i b - 0 3 5 5)
配列番号 : 1 8 30
- < 2 2 3 > 重鎖 C D R 3 (F i b - 0 3 5 5)

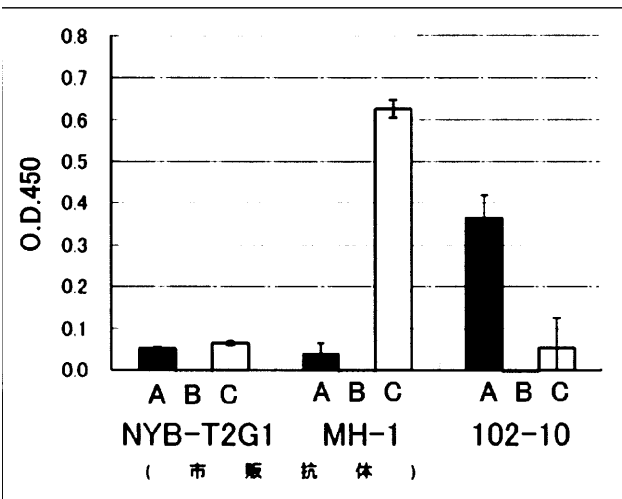
【 図 1 】



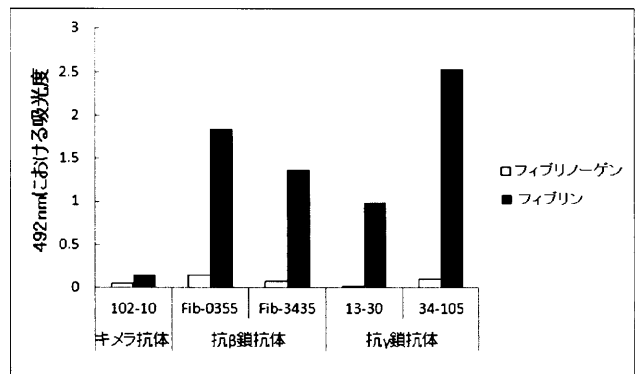
【 図 2 】



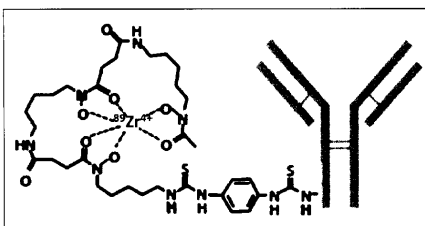
【 図 3 】



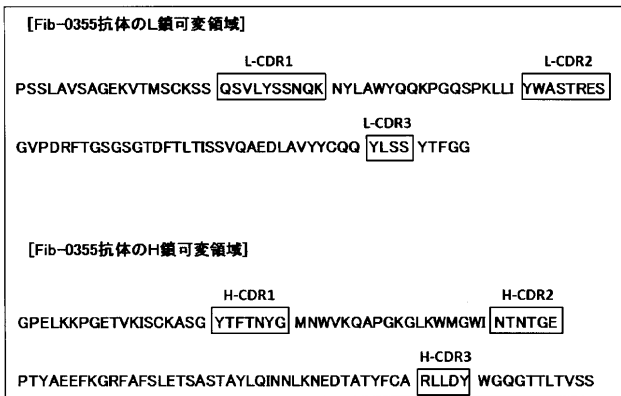
【 図 1 7 】



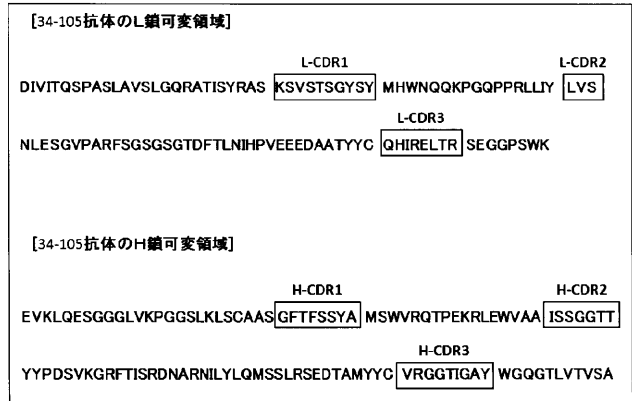
【 図 8 】



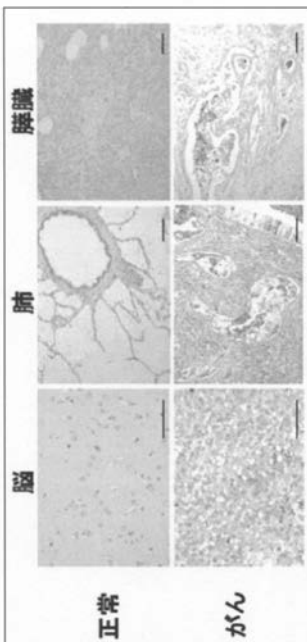
【 図 1 8 】



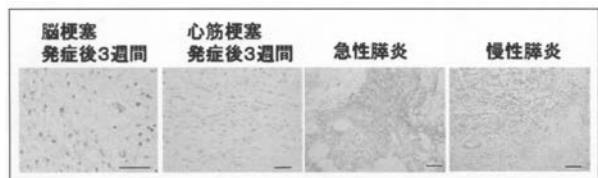
【 図 1 9 】



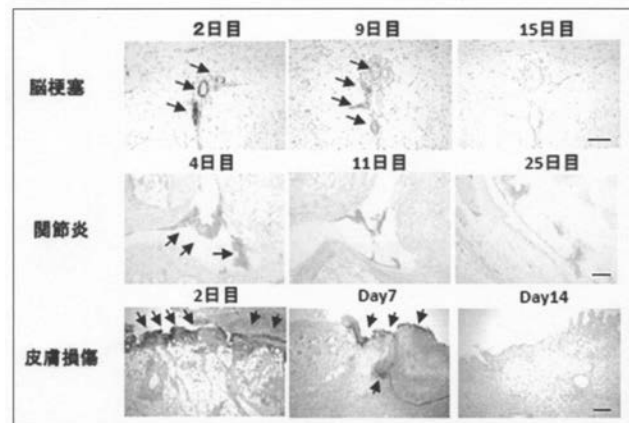
【 図 4 】



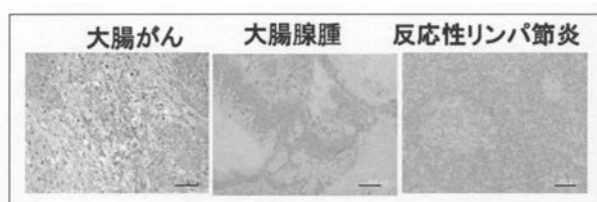
【 図 6 】



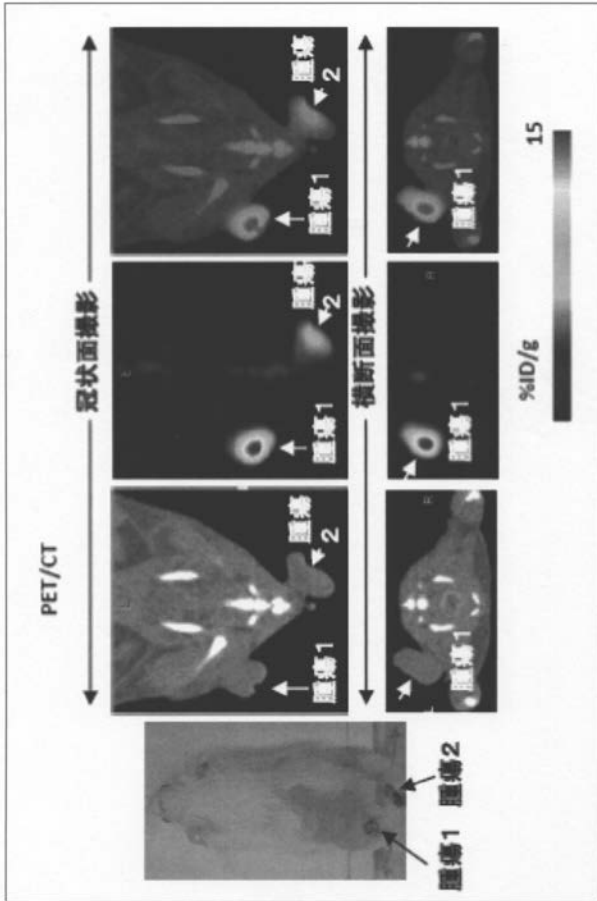
【 図 7 】



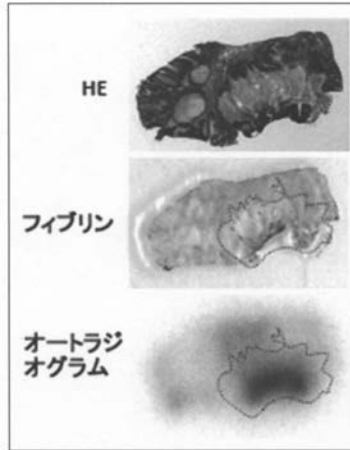
【 図 5 】



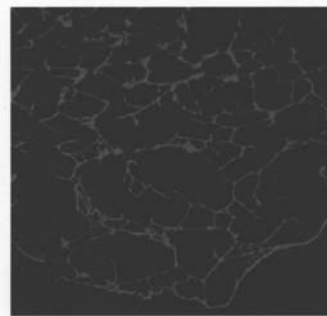
【 図 9 】



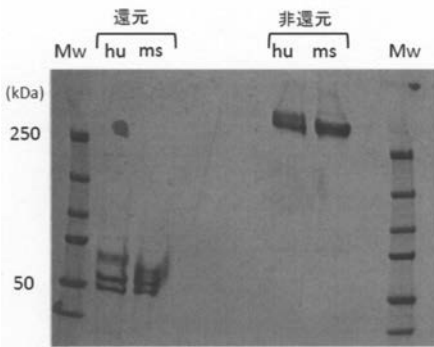
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



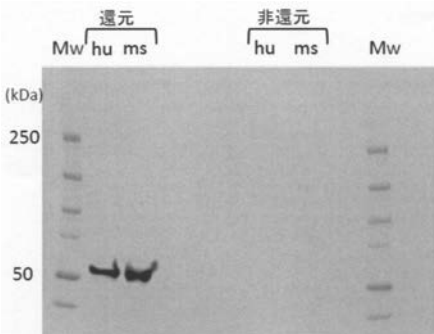
【 図 1 4 】

```

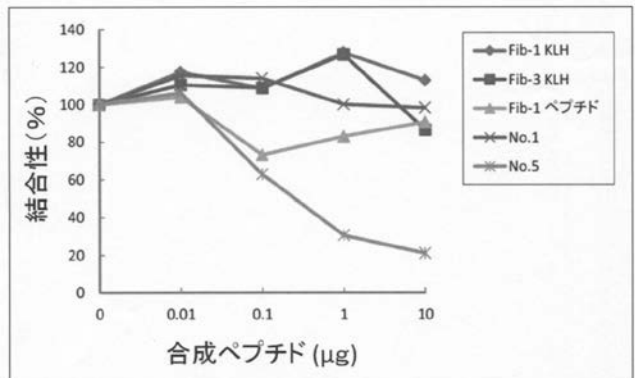
mkrmwswsfh klltkmhlil lllcvflvks qvndneegf fsarghrpld kkreeapslr
pappisggg yrarpakaaa tqkkverkap daggclhadp dlglcptgc qlqeallqge
rpirnsvel nnnveavsqt ssssfqmyl lkdlwkrqk qvkdnevvv eysselekhu
lyidetvnsn iptnlrvlrs ilenlrskiq klesdvsagm eycrtpctvs cnipvvsqke
ceeiirkgge tsemlyiqpd ssvkpyrvyc dmntenggwv viqnrdqsv dfrkwdpyk
qgfgvatnt dgknycgipg eywlgndkis qltrmgptel liemedwkdg kvkahyggft
vqneankyqi svnkryrtag nalmdgasql mgenrtmtih ngmffstyd r dndgwltsp
rkqcskedgg gwwynrcha npngryywg qytwdmakhg tddgvvmmnw kgswymrkn
smkirpfpa q

```

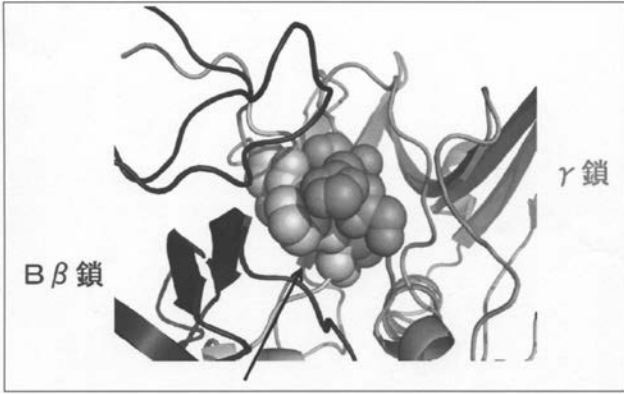
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【圖 16】



【配列表】

2014133093000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/054925
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/36(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2012-72 A (Japan Health Sciences Foundation), 05 January 2012 (05.01.2012), claims; examples & WO 2011/158973 A1	1-11 7, 8, 10
X Y	YASUNAGA et al., New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots, Cancer Science, 2011, Vol.102, No.7, p.1396-1402	1-6, 9, 11 7, 8, 10
P, X	HISADA et al., Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance, Scientific Reports, 2013.09.06, Vol.3, Article No.2604	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 April, 2014 (04.04.14)		Date of mailing of the international search report 22 April, 2014 (22.04.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 4 9 2 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/36(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/ MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	JP 2012-72 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2012.01.05, 特許請求の範囲、実施例 & WO 2011/158973 A1	1-11 7, 8, 10									
X Y	YASUNAGA et al., New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots, Cancer Science, 2011, Vol.102, No. 7, p.1396-1402	1-6, 9, 11 7, 8, 10									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 04.04.2014		国際調査報告の発送日 22.04.2014									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 中根 知大 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4 0 4 7								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2014/054925

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	HISADA et al., Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance, Scientific Reports, 2013.09.06, Vol.3, Article No.2604	1-11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 CA05 DA06 EA04 FA10 GA03 GA09
HA01
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗不溶性纤维蛋白的抗体		
公开(公告)号	JPWO2014133093A1	公开(公告)日	2017-02-02
申请号	JP2015503025	申请日	2014-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	NAT癌症CENT		
申请(专利权)人(译)	国家研究与发展研究所国家癌症研究中心		
[标]发明人	松村保広 安永正浩 久田洋平		
发明人	松村 保広 安永 正浩 久田 洋平		
IPC分类号	C07K16/36 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/86 A61K47/6843 C07K16/18 C07K16/36 C07K2317/33 C07K2317/34 G01N2333/75 G01N2800/226		
FI分类号	C07K16/36.ZNA C12N15/00.C G01N33/53.D G01N33/53.L G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA03 4B024/GA09 4B024/HA01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2013039625 2013-02-28 JP		
其他公开文献	JP6490574B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

为了提供不与血纤蛋白原结合并且对不溶性血纤蛋白具有高亲和力和特异性的抗体，在血纤蛋白原分子中，由血纤蛋白原B β 链的氨基酸231至246和血纤蛋白原 γ 链组成的位点 已发现它与由其的232至246位氨基酸组成的位点结合。此外，揭示了当纤维蛋白原变为不溶性纤维蛋白时，结合被释放并且这些位点被暴露。还发现通过免疫这些位点获得的抗体是不与纤维蛋白原结合的抗体，并且对不溶性纤维蛋白具有高亲和力和特异性。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号
発行日 平成29年2月2日 (2017.2.2)		WO2014/133093
		(43) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014.9.4)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/36 (2006.01)	C07K 16/36 ZNA	4B024
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	
G01N 33/531 (2006.01)	G01N 33/53 L	
	G01N 33/531 A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)	
出願番号 特願2015-503025 (P2015-503025)	(71) 出願人 510097747	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/054925	国立研究開発法人国立がん研究センター	
(22) 国際出願日 平成26年2月27日 (2014.2.27)	東京部中央区築地五丁目1番1号	
(31) 優先権主張番号 特願2013-39625 (P2013-39625)	(74) 代理人 110001047	
(32) 優先日 平成25年2月28日 (2013.2.28)	特許業務法人セントレスト国際特許事務所	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 松村 保広	
	千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がん研究センター東病院内	
	(72) 発明者 安永 正浩	
	千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がん研究センター東病院内	
	(72) 発明者 久田 洋平	
	千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がん研究センター東病院内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 不溶性フィブリンに対する抗体		