

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年8月6日(06.08.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/115656 A1

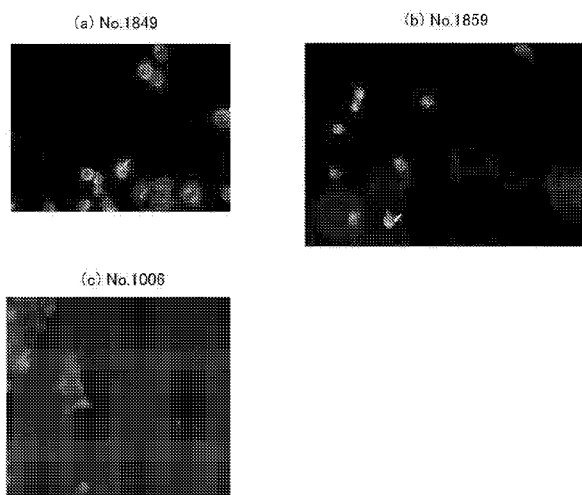
- (51) 国際特許分類:
C07K 16/18 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/052918
- (22) 国際出願日: 2015年2月3日(03.02.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2014-018586 2014年2月3日(03.02.2014) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人国立がん研究センター (NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). ナノキャリア株式会社 (NANOCARRIER CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2770871 千葉県柏市若柴226番地39 中央144街区15 Chiba (JP).
- (72) 発明者: 松村 保広 (MATSUMURA, Yasuhiro); 〒2778577 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 Chiba (JP). 安永正浩 (YASUNAGA, Masahiro); 〒2778577 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 Chiba (JP). 古賀 宣勝 (KOGA, Yoshikatsu); 〒2778577 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 Chiba (JP). 山本 祥之 (YAMAMOTO, Yoshiyuki); 〒2778577 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 Chiba (JP). 佐藤 隆太 (SATO, Ryuta); 〒2778577 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 Chiba (JP). 津村 遼 (TSUMURA, Ryo); 〒2778577 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 Chiba (JP). 片岡 一則 (KATAOKA, Kazunori); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 西山 伸宏 (NISHIYAMA, Nobuhiro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 三浦 裕 (MIURA, Yutaka); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 眞鍋 史乃 (MANABE, Shino); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 加藤 泰己 (KATO, Yasuki); 〒

[続葉有]

(54) Title: ANTI-TISSUE FACTOR MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗 T i s s u e F a c t o r モノクローナル抗体

[図1]



(57) Abstract: Provided is a novel antibody against tissue factor. Also provided is a medicinal composition wherein the aforesaid antibody is used as a target binding factor. The antibody according to the present invention can exert an internalization ability into cells expressing tissue factor.

(57) 要約: 本発明は、T i s s u e F a c t o r に対する新規抗体を提供する。また、本発明は、該抗体を標的結合因子として利用した医薬組成物を提供する。本発明による抗体は、T i s s u e F a c t o r を発現する細胞へのインターナリゼーション能を発揮し得る。

WO 2015/115656 A1



2770871 千葉県柏市若柴 2 2 6 番地 3 9 中央
1 4 4 街区 1 5 ナノキャリア株式会社内
Chiba (JP).

(74) 代理人: 靱井 孝文 (MOMII, Takafumi); 〒
5300004 大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 4 番 4
号 アクア堂島東館 7 階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): 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, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：抗T i s s u e F a c t o rモノクローナル抗体
技術分野

[0001] 本発明は、抗T i s s u e F a c t o rモノクローナル抗体および該抗体を利用した医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2014-18586号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[0003] 一般に、経口や静脈内注射によって薬物を全身投与すると、投薬対象物としての病巣部位だけでなく、正常組織にも薬物が供給される。この結果、薬物投与による副作用が認められ、治療方法の変更や中断が必要になる場合がある。これに対し、副作用の低減を目的として、投薬対象物に固有の受容体、リガンド、酵素等の分子マーカーに特異的に結合する能力を有した、分子標的薬と呼ばれる薬物が開発されている（例えば、特許文献1）。

[0004] 一方、T i s s u e F a c t o r（以下、「TF」と称する場合がある）は外因系凝固の開始因子であり、血管損傷等により産生が促進される。通常反応におけるTF発現は、局所的、かつ、一過性である。しかしながら、膵臓癌、胃癌等の多くの固形癌においては、腫瘍組織内の癌細胞、血管内皮細胞および単球、マクロファージ等の細胞表面でTFが恒常的に発現亢進していることが知られている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許公開公報2012/0039989

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的の一つは、TFに対する新規抗体の提供にある。また、本発明の目的の別の一つは、該抗体を標的結合因子として利用した医薬組成物の提供にある。

課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、細胞へのインターナリゼーション能を有する新規の抗TFモノクローナル抗体を発見し、さらに、該抗体を標的結合因子として用いることにより表面にTFを発現する細胞へ薬物を高い選択性で送達し得ることに想到し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明によれば、T i s s u e F a c t o rに結合する、以下のモノクローナル抗体が提供される。

それぞれ配列番号3、4および5に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号6、7および8に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する軽鎖可変領域と、を含む、抗ヒトT i s s u e F a c t o rモノクローナル抗体；

それぞれ配列番号11、12および13に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号14、15および16に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する軽鎖可変領域と、を含む、抗ヒトT i s s u e F a c t o rモノクローナル抗体；または

それぞれ配列番号19、20および21に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号22、23および24に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する軽鎖可変領域と、を含む、抗マウスT i s s u e F a c t o rモノクローナル抗体。

本発明の別の局面によれば、上記モノクローナル抗体が結合するT i s s u e F a c t o rのエピトープと同じエピトープに結合するモノクローナル抗体が提供される。

本発明のさらに別の局面によれば、上記モノクローナル抗体の一部を含み、Tissue Factorと結合できる、抗体の断片が提供される。

本発明のさらに別の局面によれば、標的結合因子としての上記モノクローナル抗体または抗体の断片と、薬物とを含む医薬組成物が提供される。

本発明のさらに別の局面によれば、標的結合因子としての上記モノクローナル抗体または抗体の断片を含む、薬物送達用組成物が提供される。

発明の効果

[0009] 本発明のモノクローナル抗体は、TFを発現する細胞を認識し、かつ、該細胞へのインターナリゼーション能を有し得る。よって、該抗体を標的結合因子として利用することにより、効率よく該細胞に薬物を送達することができる。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]インターナリゼーションアッセイの結果を示す顕微鏡写真である。
[図2]抗凝固作用評価の結果を示すグラフである。
[図3]殺細胞効果確認試験の結果を示すグラフである。
[図4]抗腫瘍効果確認試験における腫瘍体積の変動を示すグラフである。
[図5]抗腫瘍効果確認試験における体重の変動を示すグラフである。
[図6]インターナリゼーションアッセイの結果を示す顕微鏡写真である。
[図7]マウスB16メラノーマ細胞およびそのTF強制発現細胞におけるGAPDHのmRNA発現量に対するTFのmRNA発現量の割合を示すグラフである。
[図8]FACS解析で得られたヒストグラムである。

発明を実施するための形態

[0011] [A. モノクローナル抗体]

本発明によれば、TFに結合するモノクローナル抗体が提供される。本発明のモノクローナル抗体は、代表的には、TFに結合でき、かつ、TFを発現する細胞へのインターナリゼーション能を有する。TFは、血液凝固の第III因子であり、膜貫通型の糖タンパクとして細胞表面に発現している。

本発明において、TFは、好ましくはヒトTF（hTF）である。hTFの全長アミノ酸配列は、GenBank ACCESSION__AAA61152（配列番号1）として既に知られている。本発明においてはまた、マウスTF（mTF）に対するモノクローナル抗体も提供される。抗mTFモノクローナル抗体を薬物の標的結合因子として利用することは、マウスを用いた試験や研究において有効であり得る。mTFの全長アミノ酸配列は、GenBank ACCESSION__AAA63400（配列番号2）として既に知られている。

[0012] 本明細書において、インターナリゼーションとは、抗体が細胞表面の抗原と免疫複合体を形成後、細胞内に取り込まれる現象を意味する。抗TFモノクローナル抗体がインターナリゼーション能を有するか否かは、例えば、標識物質を結合した抗体を表面にTFを発現する細胞と接触させ、該標識物質が細胞内に移行するか否かを確認する方法、細胞毒性を有する物質を結合した抗体を表面にTFを発現する細胞と接触させた際に、細胞死または細胞の増殖阻害が誘導されるか否かを確認する方法等によって判断することができる。より具体的には、実施例に記載のインターナリゼーションアッセイによって抗体のインターナリゼーション能の有無を確認することができる。

[0013] 上記表面にTFを発現する細胞としては、任意の適切な細胞が用いられ得、例えば、腫瘍組織内の細胞が挙げられる。正常組織におけるTFの発現は、通常、局所的かつ一過性の発現であるのに対し、腫瘍組織内の癌細胞、血管内皮細胞、単球、マクロファージ等の細胞表面においては、TFの発現が恒常的に亢進している。癌細胞の具体例としては、膵臓癌細胞、胃癌細胞等が挙げられる。

[0014] 本明細書において、モノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が産生する抗体である。モノクローナル抗体は、均一な一次構造を有し、同一のエピトープを認識する。本発明のモノクローナル抗体は、相同な重鎖2本と相同な軽鎖2本とがジスルフィド結合によって結合されたテトラマーからなる基本構造を有する。本発明の抗TFモノクローナル抗体は、IgG

、IgA、IgM、IgDまたはIgEのいずれのアイソタイプであってもよく、好ましくはIgGである。

[0015] 本発明の抗TFモノクローナル抗体が認識するエピトープは、好ましくはTFの細胞外領域に存在する。

[0016] 本発明の抗TFモノクローナル抗体のTFに対する解離定数(KD)は、例えば、 5×10^{-9} M以下、さらには 1×10^{-9} M以下、特には 2×10^{-10} M以下にまで達する。解離定数は、例えば、表面プラズモン共鳴法を用いて測定することができる。

[0017] 本発明の抗TFモノクローナル抗体は、抗凝固作用を有していてもよく、有していなくてもよい。抗凝固作用の有無またはその程度はプロトロンビン時間(PT)によって判断することができる。抗凝固作用を有さないまたは抗凝固作用が低い抗TFモノクローナル抗体によれば、血餅等で捕捉され難いことから、薬物の標的結合因子として利用した場合に標的部位への薬物の送達性が向上され得、その結果として、薬効が好適に発揮され得る。本発明の抗TFモノクローナル抗体の抗原抗体複合体を形成した状態における凝固延長時間比(PBS相対比)は、好ましくは3以下、より好ましくは2以下、さらに好ましくは1~1.5である。抗原抗体複合体を形成した状態における凝固延長時間比は、実施例に記載の方法で決定され得る。

[0018] [A-1. 抗hTFモノクローナル抗体]

第1の実施形態において、本発明の抗hTFモノクローナル抗体は、それぞれ配列番号3、4および5に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域(CDR)1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号6、7および8に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を有する軽鎖可変領域と、を含む。その具体例としては、配列番号9に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号10に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む抗hTFモノクローナル抗体が好ましく例示できる。

[0019] 第2の実施形態において、本発明の抗hTFモノクローナル抗体は、それ

ぞれ配列番号 11、12 および 13 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1、2 および 3 を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号 14、15 および 16 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1、2 および 3 を有する軽鎖可変領域と、を含む。その具体例としては、配列番号 17 に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む抗 hTF モノクローナル抗体が好ましく例示できる。

[0020] 上記第 1 または第 2 の実施形態で例示した各モノクローナル抗体の改変体もまた、本発明の抗 hTF モノクローナル抗体に含まれ得る。当該改変体としては、例えば、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域が 1 個または数個（例えば 1～10 個、好ましくは 1～5 個）のアミノ酸の置換、挿入、付加および／または欠失を含むモノクローナル抗体が挙げられる。このような改変体もまた、好適に hTF に結合でき、かつ、hTF を発現する細胞へのインターナリゼーション能を有し得る。

[0021] 上記モノクローナル抗体の改変体の具体例としては、配列番号 9 に記載されるアミノ酸配列と好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列と好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むモノクローナル抗体が挙げられる。また、別の改変体の具体例としては、配列番号 17 に記載されるアミノ酸配列と好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列と好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 98%以上同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むモノクローナル抗体が挙げられる。これらの改変体は、好ましくは、hTF に結合でき、かつ、hTF を発現する細胞へのインターナリゼーション能を有する。

[0022] 上記モノクローナル抗体の改変体は、対応するモノクローナル抗体の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域の少なくとも1つのCDRにおいて、1個または数個、例えば1、2または3個、好ましくは1個または2個、より好ましくは1個のアミノ酸の置換、挿入、付加および／または欠失を含んでいてもよい。改変体の各CDRは、対応するモノクローナル抗体の各CDRと好ましくは90～100%の相同性を有し、より好ましくは95～100%、さらに好ましくは98～100%、最も好ましくは100%の相同性を有する。また、改変体の重鎖および軽鎖のCDR1～3全体は、対応するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のCDR1～3全体と好ましくは90～100%の相同性を有し、より好ましくは95～100%、さらに好ましくは98～100%、最も好ましくは100%の相同性を有する。

[0023] 第3の実施形態において、本発明の抗hTFモノクローナル抗体は、上記第1または第2の実施形態で例示したモノクローナル抗体が結合するhTFのエピトープと同じエピトープに結合するモノクローナル抗体であり得る。該同じエピトープに結合する抗体は、競合ELISA法等の公知の方法により得ることができる。競合ELISA法においては、例えば、被験抗体の非存在下における対照抗体（すなわち、第1または第2の実施形態で例示したモノクローナル抗体）の結合活性と比較して、被験抗体が、30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、対照抗体の結合性を低下させる場合、該被験抗体は対照抗体と実質的に同じエピトープに結合する抗体ということができる。該同じエピトープに結合する抗体は、好ましくはhTFに結合でき、かつ、hTFを発現する細胞へのインターナリゼーションを有する。なお、当該実施形態において、該同じエピトープに結合する抗体は、上記第1または第2の実施形態で例示したモノクローナル抗体の改変体であってもよい。

[0024] 上記で説明した本発明の抗hTFモノクローナル抗体は、ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体であり得る。

[0025] ヒト型キメラ抗体とは、非ヒト哺乳動物由来の抗体の可変領域とヒト由来

の抗体の定常領域とを連結した抗体である。よって、本発明のヒト型キメラ抗体は、上記第1、第2または第3の実施形態で例示したモノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をそれぞれ、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域に連結することによって得られるキメラ抗体であり得る。

[0026] 具体的には、本発明のヒト型キメラ抗体の例としては、重鎖CDR1、2および3としてそれぞれ、配列番号3、4および5に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖CDR1、2および3としてそれぞれ、配列番号6、7および8に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をそれぞれ、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域に連結したキメラ抗体が挙げられる。当該キメラ抗体の具体例としては、配列番号9に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号10に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をそれぞれ、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域に連結したキメラ抗体が挙げられる。

[0027] 本発明のヒト型キメラ抗体の別の例としては、重鎖CDR1、2および3としてそれぞれ、配列番号11、12および13に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖CDR1、2および3としてそれぞれ、配列番号14、15および16に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をそれぞれ、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域に連結したキメラ抗体が挙げられる。当該キメラ抗体の具体例としては、配列番号17に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号18に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をそれぞれ、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域に連結したキメラ抗体が挙げられる。

[0028] ヒト型キメラ抗体の重鎖定常領域は、ヒトイムノグロブリン（以下、hlgと表記する）に属するものであればよく、好ましくはhlgGクラスに属する。同様に、ヒト型キメラ抗体の軽鎖定常領域は、hlgに属するものであればよく、κクラスまたはλクラスのいずれであってもよい。

[0029] ヒト化抗体とは、非ヒト哺乳動物由来の抗体のCDRをヒト由来の抗体の可変領域の適切な位置に移植した抗体である。よって、本発明のヒト化抗体

は、重鎖および軽鎖のCDR 1～3として上記第1、第2または第3の実施形態で例示したモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のCDR 1～3を有し、その他の領域がヒト抗体に由来するヒト抗体であり得る。

[0030] 本発明のヒト化抗体の具体例としては、重鎖のCDR 1、2および3がそれぞれ、配列番号3、4および5に記載されるアミノ酸配列からなり、軽鎖のCDR 1、2および3がそれぞれ、配列番号6、7および8に記載されるアミノ酸配列からなり、その他の領域がヒト抗体に由来するヒト化抗体、重鎖のCDR 1、2および3がそれぞれ、配列番号11、12および13に記載されるアミノ酸配列からなり、軽鎖のCDR 1、2および3がそれぞれ、配列番号14、15および16に記載されるアミノ酸配列からなり、その他の領域がヒト抗体に由来するヒト化抗体が挙げられる。

[0031] ヒト化抗体の重鎖は、hlgに属するものであればよく、好ましくはhlg Gクラスに属する。同様に、ヒト化抗体の軽鎖は、hlgに属するものであればよく、κクラスまたはλクラスのいずれであってもよい。

[0032] [A-2. 抗mTFモノクローナル抗体]

1つの実施形態において、本発明の抗mTFモノクローナル抗体は、それぞれ配列番号19、20および21に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号22、23および24に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1、2および3を有する軽鎖可変領域とを含む。その具体例としては、配列番号25に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号26に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む抗mTFモノクローナル抗体が好ましく例示できる。

[0033] 上記で例示したモノクローナル抗体の改変体もまた、本発明の抗mTFモノクローナル抗体に含まれ得る。当該改変体としては、例えば、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域が1個または数個（例えば1～10個、好ましくは1～5個）のアミノ酸の置換、挿入、付加および／または欠失を含むモノクローナル抗体が挙げられる。このような改変体もまた、好適にmTF

に結合でき、かつ、mTFを発現する細胞へのインターナリゼーション能を有し得る。

[0034] 上記モノクローナル抗体の改変体の具体例としては、配列番号25に記載されるアミノ酸配列と好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号26に記載されるアミノ酸配列と好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むモノクローナル抗体が挙げられる。このような改変体は、好ましくは、mTFに結合でき、かつ、mTFを発現する細胞へのインターナリゼーション能を有する。

[0035] 上記モノクローナル抗体の改変体は、対応するモノクローナル抗体の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域の少なくとも1つのCDRにおいて、1個または数個、例えば1、2または3個、好ましくは1個または2個、より好ましくは1個のアミノ酸の置換、挿入、付加および／または欠失を含んでもよい。改変体の各CDRは、対応するモノクローナル抗体の各CDRと好ましくは90～100%の相同性を有し、より好ましくは95～100%、さらに好ましくは98～100%、最も好ましくは100%の相同性を有する。また、改変体の重鎖および軽鎖のCDR1～3全体は、対応するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のCDR1～3全体と好ましくは90～100%の相同性を有し、より好ましくは95～100%、さらに好ましくは98～100%、最も好ましくは100%の相同性を有する。

[0036] 別の実施形態において、本発明の抗mTFモノクローナル抗体は、上記で例示したモノクローナル抗体が結合するmTFのエピトープと同じエピトープに結合するモノクローナル抗体であり得る。該同じエピトープに結合する抗体は、好ましくはmTFに結合でき、かつ、mTFを発現する細胞へのインターナリゼーション能を有する。当該実施形態において、該同じエピトープに結合する抗体は、上記で例示したモノクローナル抗体の改変体であってもよい。なお、該同じエピトープに結合する抗体の取得方法は上述のとおり

である。

[0037] [B. モノクローナル抗体の製造方法]

B-1. ハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られるハイブリドーマから目的の抗体を産生するものを選択し、選択されたハイブリドーマに抗体を産生させることによって得られ得る。

[0038] B-1-1. 抗原の調製

動物の免疫に用いる抗原としては、例えば、TF（全長TF）またはその部分ペプチドあるいはTFを表面に発現する細胞が用いられ得る。hTFは、例えば、特開平9-302000号に記載の方法等に準じてヒト胎盤由来のhTFを精製して得ることができる。また、例えば、遺伝子工学的方法または化学合成法によってTFまたはその部分ペプチドを得ることができる。部分ペプチドは、必要に応じて任意の適切なキャリアタンパク質と結合させて用いられ得る。なお、hTFのmRNA配列は、GenBank NM_001993.4（配列番号27）において公知である。また、mTFのmRNA配列は、GenBank M57896.1（配列番号28）において公知である。

[0039] B-1-2. 抗体産生細胞の調製

上記のようにして得られた抗原を任意の適切なアジュバントと混合して、マウス、ラット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジ等の非ヒト哺乳動物に投与して免疫する。免疫した動物の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価の高い動物に対して最終免疫を施す。最終免疫日から数日後に脾臓細胞、リンパ節細胞等の抗体産生細胞を採取する。免疫方法および抗体産生細胞の採取方法の詳細は、当業者に周知であるのでその詳細な説明は省略する。抗体価は、例えば、動物から採取した血液を用いて、ELISA法等の酵素免疫測定法（EIA）、放射性免疫測定法（RIA）等によって測定することができる。

[0040] B-1-3. 細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、マウス、ラット等の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な任意の適切な細胞株を用いることができる。好ましくは、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地（例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン含有培地（HAT培地））で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質を有するミエローマ細胞が用いられる。細胞融合は、PEG法、電気融合法等の任意の適切な方法を用いて行われ得る。次いで、細胞融合処理後の細胞を選択培地（例えば、HAT培地）に懸濁および希釈し、培養プレートの各ウェルにて培養を行う。

[0041] B-1-4. ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

上記細胞融合後の培養の結果、コロニーを形成した細胞をハイブリドーマとして選択する。次いで、選択したハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、得られた培養上清を採取して抗原に対する反応性を測定する。抗原に対する反応性は、EIA、RIA等によって測定することができる。該測定の結果、抗原に対して反応性を示すものを選択し、限界希釈法等によってモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを単離する。

[0042] B-1-5. ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、上記ハイブリドーマを任意の適切な培地で培養し、得られた培養上清から精製する方法、マウス、ラット等の非ヒト哺乳動物の腹腔内にハイブリドーマを注入して腹水中で培養し、得られた腹水から精製する方法等によって調製され得る。抗体の精製は、例えば、硫酸塩析法、ゲルろ過クロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、抗イムノグロブリンカラム、プロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィー法等を必要に応じて組み合わせて用いることによって行うことができる。

[0043] B-2. 遺伝子工学的手法によるモノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、上記ハイブリドーマ等の抗体産

生細胞からクローニングされた抗体遺伝子を利用して、遺伝子工学的手法によって作製され得る。

[0044] B-2-1. 可変領域をコードする遺伝子のクローニング

目的の抗体を産生するハイブリドーマから全mRNAを抽出し、得られた全mRNAから逆転写酵素を用い、抗体遺伝子に共通な配列をプライマーとして抗体可変領域をコードするcDNAを合成する。当該cDNAの合成および増幅は、例えば、5'-RACE法を用いて行うことができ、その際、cDNAの両末端に任意の適切な制限酵素サイトを導入することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結して大腸菌等に導入することによって所望の組換えベクターを調製する。次いで、目的とする抗体遺伝子の塩基配列をデオキシ法等の公知の方法によって確認する。

[0045] B-2-2. 宿主細胞への抗体遺伝子の導入

上記のようにしてクローニングした可変領域をコードするDNAを所望の抗体定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。あるいは、可変領域をコードするDNAを所望の定常領域をコードするDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。このようにして得られた発現ベクターを任意の適切な宿主細胞に導入し、これにより、抗体を発現させることができる。このとき、重鎖または軽鎖を別々に発現ベクターに組み込み、これら2つの発現ベクターを同じ宿主細胞に同時に導入してもよいし、あるいは重鎖または軽鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞に導入してもよい。なお、可変領域をコードするDNAは、B-2-1項で決定した塩基配列に基づいて人工遺伝子合成サービス等を利用して全合成を行うことによっても得られ得る。宿主細胞としては、例えば、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母、細菌等が挙げられる。

[0046] B-2-3. 宿主細胞からのモノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、上記発現ベクターを組み込まれた宿主細胞を任意の適切な培地で培養し、得られた培養上清から精製することによって得られ

得る。抗体の精製方法は、上述のとおりである。

[0047] B-3. キメラ抗体の作製

ヒト型キメラ抗体は、例えば、上記と同様にして得たモノクローナル抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し、発現させることにより得られ得る（例えば、WO 95/14041）。

[0048] B-4. ヒト化抗体の作製

ヒト化抗体は、いわゆるCDRグラフティング技術を用いて、非ヒト哺乳動物の抗体のCDRをヒト抗体のフレームワーク領域に連結するようにヒト抗体に移植することによって得られ得る。非ヒト哺乳動物（例えば、マウス）の抗体のCDRをヒトのフレームワーク領域に移植する方法は公知であり、例えば、オーバーラップエクステンションPCR法が挙げられる。

[0049] 一般に、CDRグラフティングにおいては、非ヒト哺乳動物の抗体のフレームワーク領域と相同性の高いヒトフレームワーク領域を選択することが、CDRの機能の維持において有利である。よって、移植するCDRに隣接するフレームワーク領域のアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列からなるヒトフレームワーク領域を利用することが好ましい。

[0050] [C. 抗体断片]

本発明はまた、A項に記載のモノクローナル抗体の一部を含み、Tissue Factorと結合できる、抗体の断片を提供する。本発明の抗体の断片は、代表的には、Tissue Factorを発現する細胞へのインターナリゼーション能を有する。当該抗体断片としては、例えば、Fab、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化抗体(dsFv)、2量体V領域断片(Diabody)、CDRを含むペプチド等が挙げられる。

[0051] Fabは、上記モノクローナル抗体をパパイン処理して得ることができる。また、上記モノクローナル抗体のFabをコードするDNAを任意の適切な発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、発現させること

によって得ることもできる。

[0052] $F(a b')_2$ は、上記モノクローナル抗体をペプシン処理して得ることができる。また、上記モノクローナル抗体の $F(a b')_2$ をコードする DNA を任意の適切な発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、発現させることによって得ることもできる。

[0053] $F a b'$ は、 $F(a b')_2$ のヒンジ間の S - S 結合を切断して得られる抗体断片である。 $F a b'$ は、上記 $F(a b')_2$ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。また、 $F a b'$ をコードする DNA を任意の適切な発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、発現させることによって得ることもできる。

[0054] $s c F v$ は、重鎖と軽鎖の可変領域のみを適切なペプチドリンカーで連結したものである。 $s c F v$ は、上記モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする DNA に基づいて $s c F v$ 発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、発現させることによって得ることができる。

[0055] $d s F v$ は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを S - S 結合を介して結合したものである。各領域におけるシステイン残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。 $d s F v$ は、上記モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする DNA に基づいて $d s F v$ 発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、発現させることによって得ることができる。

[0056] $D i a b o d y$ は、8 アミノ酸残基以下の短いペプチドリンカーで連結された $s c F v$ の 2 量体であり、2 価の抗原結合活性を有する。2 価の抗原結合活性は、同一であってもよく、互いに異なっていてもよい。 $D i a b o d y$ は、上記モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする DNA に基づいて 8 アミノ酸残基以下のペプチドリンカーで連結された $s c F v$ の発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、発現さ

せることによって得ることができる。

[0057] CDRを含むペプチドは、重鎖可変領域または軽鎖可変領域のCDRの少なくとも1つを含む。CDRを含むペプチドは、複数のCDRを直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させたものであってもよい。CDRを含むペプチドは、上記モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域におけるCDRをコードするDNAを任意の適切な発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、発現させることによって得ることができる。また、Fmoc法、tBoc法等の化学合成法によって得ることもできる。

[0058] [D. 医薬組成物]

本発明の医薬組成物は、標的結合因子としてのA項に記載のモノクローナル抗体またはC項に記載の抗体の断片と、薬物とを含む。上記モノクローナル抗体または該抗体の断片（以下、「モノクローナル抗体等」と称する場合がある）を標的結合因子として利用することにより、表面にTFを発現する細胞内に効率よく薬物を送達することができる。

[0059] 第1の実施形態において、上記モノクローナル抗体等は薬物と結合された状態であり得る。また、当該実施形態においては、必要に応じて、モノクローナル抗体等に高分子化合物がさらに結合されていてもよい。

[0060] 上記薬物としては、治療対象の疾患等に応じて任意の適切な薬物が選択される。例えば、核酸医薬、抗体医薬、遺伝子治療薬等のバイオ薬物およびサイトキシン、細胞傷害性薬物等の細胞傷害分子が挙げられる。

[0061] 核酸医薬としては、例えば、プラスミドDNA、siRNA、microRNA、shRNA、アンチセンス核酸、デコイ核酸、アプタマーおよびリボザイムサイトが挙げられる。

[0062] サイトキシンとしては、例えば、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジハイドロキシアントラシンジオン、ミトキサント

ロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、マイタンシン、オーリスタチンまたはそれらの誘導体が挙げられる。

[0063] 細胞傷害性薬物としては、例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン等の代謝拮抗物質、メクロレタミン、チオエパクロラムブチル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロソスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、シス-ジクロロジアミン白金 (II) 等のアルカリ化剤、ダウノルビシン、ドキシソルビシン等のアントラサイクリン、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アンスラマイシン (AMC) 等の抗生物質およびビンクリスチン、ビンブラスチン等の有糸分裂剤が挙げられる。

[0064] 薬物または高分子化合物とモノクローナル抗体等との結合は、当該技術分野において公知の方法で行われ得る。例えば、各々が有する官能基または必要に応じて導入された官能基を反応させることによって行われ得る。当該官能基の組み合わせとしては、例えば、アミノ基とカルボキシル基、カルボキシル基とヒドロキシル基、マレイミド基とチオール基、チオール基とチオール基、ヒドラジド基とケトン基、ヒドラジド基とアルデヒド基、アミノ基とアルデヒド基、チオール基とカルボキシル基、アミノ基とスクアリン酸誘導体、ジエニルアルデヒド基とアミノ基、ハロエステルとチオール基、アジドとアルキン等が挙げられる。また、例えば、薬物がタンパク質またはペプチドである場合には、遺伝子工学的手法によりモノクローナル抗体等との融合タンパク質であってもよい。さらにまた、薬物が電荷を有する場合には、イオン結合を介して結合していてもよい。

[0065] 上記高分子化合物としては、任意の適切な高分子化合物が選択される。具体例としては、ポリエチレングリコール、アルブミン、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等が挙げられる。このような高分

子化合物が結合されることにより、血中安定性が向上し得る。

[0066] 高分子化合物の結合部位は、モノクローナル抗体等の抗原結合活性およびインターナリゼーション能を損なわない限りにおいて任意の適切な部位であり得る。

[0067] 第2の実施形態において、上記モノクローナル抗体等はDDSキャリア素材と結合された状態であり得る。当該DDSキャリア素材としては、薬物を内包したナノ粒子（例えば、平均粒子径が好ましくは10nm~400nm、より好ましくは20nm~300nm、さらに好ましくは30nm~150nmの粒子）を形成し得るものが好ましく用いられ得る。このようなDDSキャリア素材によれば、薬物を内包したナノ粒子が形成され得るので、生体内での該薬物の安定性が向上され得、また、徐放化が可能となる。さらに、モノクローナル抗体等による標的細胞内への確実な薬物送達が可能となる。

[0068] モノクローナル抗体等は、DDSキャリア素材の任意の適切な位置に結合される。標的結合性を好適に発揮させる観点から、好ましくは、モノクローナル抗体等は、DDSキャリア素材が形成するナノ粒子の外表面に露出するように結合される。モノクローナル抗体等とDDSキャリア素材との結合は、例えば、それぞれが有する官能基または必要に応じて導入した官能基を反応させることによって行われ得る。官能基の好ましい組み合わせについては上記のとおりである。

[0069] 上記DDSキャリア素材としては、例えば、親水性セグメントと疎水性セグメントとを有するブロックコポリマー等のポリマーミセル形成材料、リン脂質等のリポソーム形成材料、ゼラチン、コラーゲン、ヒアルロン酸、アルギン酸等の天然高分子、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール等の合成高分子等のナノハイドロゲルカプセル形成材料、ポリグリコール酸、ポリ乳酸およびこれらの共重合体等のナノスフェア形成材料が挙げられる。なかでも、親水性セグメントと疎水性セグメントとを有するブロックコポリマーを用いることが好ましい。親水性セグメントと疎水性セグメントとを有

するブロックコポリマーの親水性セグメントにモノクローナル抗体等を結合して標的結合性ブロックコポリマーとすることにより、薬物を標的細胞内へ高い確実性で送達可能なポリマーミセルが得られ得る。

[0070] 上記薬物としては、第1の実施形態と同様の薬物が用いられ得る。第2の実施形態においては、薬物は、そのまま用いてもよく、親水性セグメントと疎水性セグメントとを有するブロックコポリマーの疎水性セグメントに結合されて、薬物結合ブロックコポリマーの形態で用いられてもよい。

[0071] [E. 薬物送達用組成物]

本発明の薬物送達用組成物は、A項に記載のモノクローナル抗体またはC項に記載の抗体の断片を含む。上記モノクローナル抗体または該抗体の断片はTFを発現する細胞への標的結合因子として利用され得、さらには、該細胞へのインターナリゼーション能を発揮し得る。よって、本発明の薬物送達用組成物を用いて薬物を投与することにより、表面にTFを発現する細胞内に効率よく薬物を送達することができる。

[0072] [F. 本発明の抗TFモノクローナル抗体の用途]

本発明の抗TFモノクローナル抗体は、代表的には、T i s s u e F a c t o rが関与する疾患（例えば、組織や細胞表面にてT i s s u e F a c t o rの発現の亢進を伴う疾患）の治療に用いられる。T i s s u e F a c t o rが関与する疾患としては、例えば、癌、炎症、血栓症等が挙げられる。TFは、種々の癌組織において発現が恒常的に亢進していることから、癌の種類に関わらずその治療に用いることができる。また、例えば、膵臓癌においては、TFを高発現する患者の予後が悪いことが報告されており、このような患者を対象とする治療においても有効に利用され得る。

[0073] 本発明の医薬組成物の投与ルートは、皮下、静脈、動脈、局所等の非経口投与が好ましく、静脈内注射が特に好ましい。投与量は、薬物の種類、用法、患者の年齢、性別、患者の健康状態等に応じて適切に決定され得る。

実施例

[0074] 以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。本発明はこれらの

実施例により何ら限定されるものではない。なお、「部」および「%」は、「重量部」および「重量%」を意味する。

[0075] [実施例1 抗hTFモノクローナル抗体およびその断片]

[抗原の調製]

hTF全長アミノ酸配列の33位~251位までのアミノ酸配列を含む組み換え蛋白質を大腸菌で発現させ、ニッケルカラムで精製して得られたレコンビナントhTF（配列番号29）を抗原として用いた。

[0076] [ラットへの免疫]

レコンビナントhTF50 μ gをフロイント完全アジュバント（Difco）と共に6週令のWister雌ラット3匹に腹腔内投与し、初回免疫とした。その14日後にレコンビナントhTF50 μ gをSigma Adjuvant System（Sigma）と共に投与し、追加免疫とした。以降、21日毎に同様の追加免疫を5回行った。さらに126日後にPBSで希釈したレコンビナントhTF10 μ gを腹腔投与し、レコンビナントhTF40 μ gを尾静脈投与することで最終免疫とした。

[0077] [ハイブリドーマの調製]

最終免疫の3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を回収した。脾臓細胞とマウスミエローマ細胞（p3X63Ag8.653）を50%濃度のポリエチレングリコール4000（Merck）を用いて融合させ、HAT培地で選択した。

[0078] [抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング]

細胞融合8日後に抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。スクリーニングに用いたイムノアッセイは以下のとおりである。ELISA法を行うにあたり、96穴マイクロタイタープレート（ヌンク社製）の各ウェルにレコンビナントhTFを1 μ g/mL含む50mM炭酸緩衝液（pH8）を50 μ L/wellで添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩もしくは室温で2時間固定した。これらのウェルを300 μ Lの洗浄液（0.05% Tween20/25mM Tris/140mM NaCl/2.5mM KCl、pH7

4) で3回洗浄した後、ブロッキングバッファー (0.05% Tween 20 / 1% BSA / 100 mM NaH_2PO_4 / 140 mM NaCl、pH 5) を200 μL で加えて4°Cで一晩もしくは室温で1時間静置してブロッキングを行った。このようにして得たhTF固相化プレートの各ウェルに50 μL のハイブリドーマ培養上清を添加して室温で1時間反応させた。各ウェルを300 μL の洗浄液で3回洗浄後、ブロッキングバッファーで5,000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体 (Bethyl) を50 μL で加えて30分反応させた。反応後、各ウェルを300 μL の洗浄液で3回洗浄し、3.7 mM o-フェニレンジアミン / 25 mM クエン酸 / 130 mM Na_2HPO_4 / 0.006% H_2O_2 (pH 5.0) を100 μL で添加し、呈色させた。10~15分後に2規定硫酸を30 μL / well で添加して反応を停止し、吸光度 (490 nm) を吸光プレートリーダーで測定した。また免疫沈降ELISA法はレコンビナントhTFとハイブリドーマ培養上清とを混合し、混合液中の未結合hTFの量をhTF定量サンドイッチELISAで測定することで実施した。さらに、フローサイトメトリー法を定法に従って実施し、hTF発現細胞に対するハイブリドーマ培養上清の反応性を測定した。

[0079] 上記測定の結果、hTFと強い親和性を示したハイブリドーマを選択し、これらのクローンについて限界希釈法を2回行うことでhTFと結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを樹立した。

[0080] [抗体の調製]

樹立した各ハイブリドーマを牛由来IgGを除去した牛血清を5%量含むRPMI 1640培地等で大量培養し、培養上清を得た。もしくは、各ハイブリドーマをICRヌードマウスの腹腔内で大量培養し、腹水を採取した。得られた培養上清もしくは腹水をProtein Gアフィニティカラムクロマトグラフィーに供してIgGモノクローナル抗体を精製した。

[0081] [インターナリゼーションアッセイ]

上記のようにして得られた各モノクローナル抗体を以下のインターナリゼ

ーションアッセイに供した。

カルチャースライド4チャンバー (BD) にTF高発現のヒト膵臓癌細胞 BxPC3 を 5×10^4 cells / チャンバーで播種し、RPMI 1640 培地で 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下、12時間培養した。PBSで3回洗浄した後にAlexa647 蛍光ラベルkit (Invitrogen) で標識した $30 \mu\text{g}$ の抗体を1mlのRPMI 1640 培地で希釈し各チャンバーに投与し、3時間培養した。当該3時間の培養においては、培養開始から2時間経過後に、終濃度 75nM となるようにLysoTracker RED-DND99 (Invitrogen) を培養液に加え、その後さらに1時間培養した。次いで、PBSで3回洗浄後、 4% パラホルムアルデヒドで固定し、DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) で核染色後、Fluoromount G (Southern Biotech) で封入した。次いで、蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて各細胞を観察した。観察の結果を図1に示す。

[0082] 図1 (a) および (b) に示すように、2つのモノクローナル抗体 (No. 1849、No. 1859) においては、細胞内に標識物質が移行していることから、これらのモノクローナル抗体がインターナリゼーション能を有することが確認された。一方、図1 (c) に示す抗体に関してはインターナリゼーション能が確認されなかった。なお、これらの抗体について、マウスモノクローナル抗体アイソタイプングELISAキット (BDバイオサイエンス社製) を用いて、抗体のサブクラスを決定した結果、No. 1849はIgG2b、No. 1859はIgG2aであった。

[0083] [可変領域をコードするDNA配列、アミノ酸配列およびCDR配列の決定]

1. 抗hTFモノクローナル抗体 (No. 1849)

抗hTFモノクローナル抗体 (No. 1849) を産生するハイブリドーマから常法に従って全RNAを抽出し、次いで、得られた全RNAからcDNAを合成した。

[0084] 合成したcDNAを鋳型として、PCR法にて、抗hTFモノクローナル抗体（No. 1849）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするDNA断片を得た。具体的には、下記のプライマー一覧の中から、重鎖可変領域クローニング用のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして、それぞれ、以下のプライマー1～19の混合プライマーおよびプライマー20を用い、軽鎖可変領域クローニング用のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして、それぞれ、以下のプライマー22～38の混合プライマーおよびプライマー39を用いてPCRを行った。

[プライマー一覧]

プライマー1（配列番号30）

NNCCATGGCCGAGGTRMAGCTTTCAGGAGTC

プライマー2（配列番号31）

NNCCATGGCCGAGGTBCAGCTBCAGCAGTC

プライマー3（配列番号32）

NNCCATGGCCGAGGTGCAGCTGAAGSASTC

プライマー4（配列番号33）

NNCCATGGCCGAGGTCCARCTGCAACARTC

プライマー5（配列番号34）

NNCCATGGCCGAGGTYCAGCTBCAGCARTC

プライマー6（配列番号35）

NNCCATGGCCGAGGTYCARCTGCAGCAGTC

プライマー7（配列番号36）

NNCCATGGCCGAGGTCCACGTGAAGCAGTC

プライマー8（配列番号37）

NNCCATGGCCGAGGTGAASSTGGTGGAAATC

プライマー9（配列番号38）

NNCCATGGCCGAGGTGAWGYTGGTGGAGTC

プライマー10（配列番号39）

NNCCATGGCCGAGGTGCAGSKGGTGGAGTC

プライマー 11 (配列番号 40)

NNCCATGGCCGAGGTGCAMCTGGTGGAGTC

プライマー 12 (配列番号 41)

NNCCATGGCCGAGGTGAAGCTGATGGARTC

プライマー 13 (配列番号 42)

NNCCATGGCCGAGGTGCARCTTGTTGAGTC

プライマー 14 (配列番号 43)

NNCCATGGCCGAGGTRAAGCTTCTCGAGTC

プライマー 15 (配列番号 44)

NNCCATGGCCGAGGTGAARSTTGAGGAGTC

プライマー 16 (配列番号 45)

NNCCATGGCCGAGGTTACTCTRAAAGWGTSTG

プライマー 17 (配列番号 46)

NNCCATGGCCGAGGTCCAAC TVCAGCARCC

プライマー 18 (配列番号 47)

NNCCATGGCCGAGGTGAACTTGGAAGTGTC

プライマー 19 (配列番号 48)

NNCCATGGCCGAGGTGAAGGTCATCGAGTC

プライマー 20 (配列番号 49)

TGTGCAGACCCTCGTGGACCACGGAGCA

プライマー 21 (配列番号 50)

GGACTCTGGGRTCATTTACCMGGAGAGT

プライマー 22 (配列番号 51)

NNNNGTCGACGCTCGAYATCCAGCTGACTCAGCC

プライマー 23 (配列番号 52)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTTCTCWCCCAGTC

プライマー 24 (配列番号 53)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTGMTMACTCAGTC

プライマー25 (配列番号54)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTGYTRACACAGTC

プライマー26 (配列番号55)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTRATGACMCAGTC

プライマー27 (配列番号56)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTMAGATRAMCCAGTC

プライマー28 (配列番号57)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTCAGATGAYDCAGTC

プライマー29 (配列番号58)

NNNNGTCGACGCTCGAYATYCAGATGACACAGAC

プライマー30 (配列番号59)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTTCTCAWCCAGTC

プライマー31 (配列番号60)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGWGCTSACCCAATC

プライマー32 (配列番号61)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTSTRATGACCCARTC

プライマー33 (配列番号62)

NNNNGTCGACGCTCGAYRTTKTGATGACCCARAC

プライマー34 (配列番号63)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTGATGACBCAGKC

プライマー35 (配列番号64)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTGATAACYCAGGA

プライマー36 (配列番号65)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTGATGACCCAGWT

プライマー37 (配列番号66)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTGTGATGACACAACC

プライマー38 (配列番号67)

NNNNGTCGACGCTCGAYATTTTGCTGACTCAGTC
プライマー39（配列番号68）

CCTTAGGAGGGAAGATTGGAAGGAGCT

なお、上記塩基配列中、RはGまたはA、YはTまたはC、MはAまたはC、KはGまたはT、SはGまたはC、WはAまたはT、BはG、CまたはT、DはA、GまたはT、VはA、GまたはC、NはA、T、GまたはCを意味する。

[0085] 上記で得られた各PCR産物を常法に従ってベクターにクローニングし、塩基配列を決定した。

[0086] 上記のようにして決定した抗hTFモノクローナル抗体（No. 1849）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の塩基配列はそれぞれ、配列番号69および70に記載のとおりである。また、該重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号9および10に記載されるのとおりである。また、これらのアミノ酸配列を既知の抗体のアミノ酸配列のデータベース（IMGTのウェブサイト：<http://www.imgt.org/>）と比較して相同性を調べることにより、CDRのアミノ酸配列を以下のとおり決定した。

[表1]

No. 1849		アミノ酸配列	配列番号
重鎖可変領域	CDR 1	DYNMA	3
	CDR 2	A I I Y D G T R T Y Y R D S V R G	4
	CDR 3	G D S Y T N F A Y	5
軽鎖可変領域	CDR 1	R A S S S L S Y M H	6
	CDR 2	E T S K L A S	7
	CDR 3	Q Q G N S Y P R T	8

[0087] 2. 抗hTFモノクローナル抗体（No. 1859）

抗hTFモノクローナル抗体（No. 1859）を産生するハイブリドーマから全RNAを抽出したこと、および、重鎖可変領域クローニング用のア

ンチセンスプライマーとしてプライマー 21 を用いたこと以外は、上記と同様にして抗 h T F モノクローナル抗体 (N o . 1 8 5 9) の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の塩基配列を決定した。

[0088] 決定された抗 h T F モノクローナル抗体 (N o . 1 8 5 9) の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の塩基配列はそれぞれ配列番号 7 1 および 7 2 に記載のとおりである。また、該重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 1 7 および 1 8 に記載されるのとおりである。また、これらの可変領域における C D R のアミノ酸配列を以下のとおり決定した。

[表2]

N o . 1 8 5 9		アミノ酸配列	配列番号
重鎖可変領域	CDR 1	D Y S V H	1 1
	CDR 2	V M W S G G T T T F N S G L K S	1 2
	CDR 3	E R A G S P L N W F A Y	1 3
軽鎖可変領域	CDR 1	Q A S Q D I G N Y L S	1 4
	CDR 2	S S T S L A D	1 5
	CDR 3	L Q H Y S G S R T	1 6

[0089] [表面プラズモン共鳴法による結合活性評価]

B i a c o r e 社の CM 5 チップ表面に抗 h T F モノクローナル抗体 (N o . 1 8 4 9 、 N o . 1 8 5 9) を固相化した。各抗体を固相化した CM 5 チップを S P R 装置にセットし、その流路に精製 h T F を含有した抗原含有 b u f f e r を流した。この測定系により各抗体と h T F との解離定数を求めた。なお、測定条件は以下のとおりである。

S P R 装置 : B i a c o r e 2 0 0 0 (ビアコア社)

抗原含有 b u f f e r : h T F を最終濃度 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ で含む 10mM 酢酸緩衝液 (p H 5 . 0)

R u n n i n g b u f f e r : H B S - E P b u f f e r (10mM H E P E S , p H 7 . 5 , 0.15M N a C l , 3mM E D T A , 0.005% s u r f a c t a n t P 2 0 (T w e e n 2 0)

, pH 7.4)。

[0090] 上記測定の結果、各抗体のhTFに対する解離定数(KD)は、No. 1849が 9.139×10^{-11} 、No. 1859が 1.894×10^{-10} であった。

[0091] [抗凝固作用評価]

以下のようにして、抗hTFモノクローナル抗体(No. 1849およびNo. 1859)のプロトロンビン時間を測定した。

リコンビナントhTF抗原350ngに抗体3 μ gを添加し、全量が5 μ lになるまでPBSを加えた。37 $^{\circ}$ C、600rpmで振とうさせながら15分抗原抗体反応をさせた。反応液に3.8%クエン酸ナトリウムで抗凝固処理をしたヒト血漿50 μ l、25mM CaCl₂100 μ lを添加すると同時に37 $^{\circ}$ C、600rpmで振とうさせながら培養し、フィブリン塊が形成されるまでの時間(プロトロンビン時間)を計測した。反応液の代わりにPBSを用いた対照におけるプロトロンビン時間を1としたときの各抗体の凝固延長時間比(プロトロンビン時間比)を表3および図2に示す。

[表3]

	No. 1849	No. 1859	対照(PBS)
凝固延長時間比	5.535	1.222	1

[0092] 表3および図2に示されるとおり、No. 1859の凝固延長時間比は1.222であり、抗凝固作用が極めて小さいことがわかる。

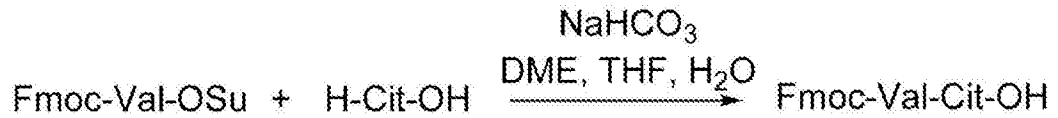
[0093] [実施例2 医薬組成物]

[モノクローナル抗体と薬物との結合]

以下のようにしてモノメチルオーリスタチンE(MMAE)が結合された抗hTFモノクローナル抗体(No. 1849)(以下、「hTF-MMAE」と称する)を得た。

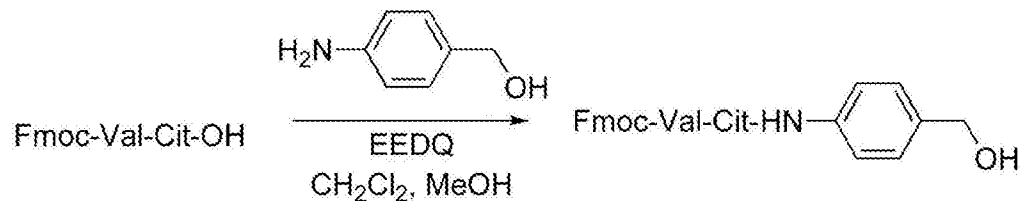
[0094]

[化1]



H-Cit-OH (1.18 g, 6.74 mmol) と NaHCO₃ (566 mg, 6.74 mmol) の水溶液 (18 mL) に Fmoc-Val-OSu (2.80 g, 6.42 mmol) の DMF (18 mL) 溶液を加え、さらに THF (9 mL) を加えて、終夜撹拌した。反応を 15% クエン酸水溶液 (40 mL) により停止させ、水層を AcOEt / i-PrOH (9/1) 混合溶液 (100 mL, 20 mL × 2) により抽出した。あわせた有機層を水 (70 mL) で洗浄し、減圧濃縮した。残渣の固体をジエチルエーテルにより洗浄し、ジペプチド (3.11 g, 97%) を白色固体として得た。

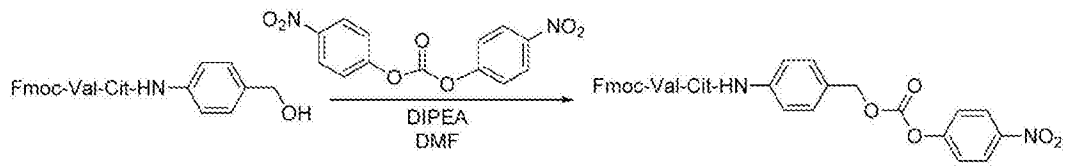
[0095] [化2]



Fmoc-Val-Cit-OH (3.00 g, 6.04 mmol) と p-アミノベンジルアルコール (1.49 g, 12.1 mmol) のジクロロメタン (70 mL) とメタノール (30 mL) の溶液に 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (EEDQ) (2.99 g, 12.1 mmol) を加えた。1日後、さらに EEDQ (1.50 g, 6.04 mmol) を加え、終夜撹拌した。反応液を濃縮し、残渣をジエチルエーテルにより洗浄し、目的物 (2.51 g, 69%) を得た。

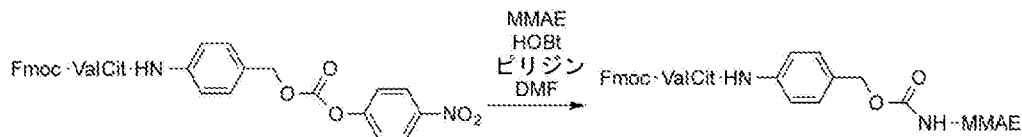
[0096]

[化3]



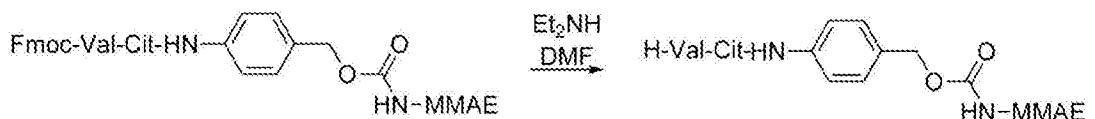
Fmoc-Val-Cit-PAB-OH (2.00 g, 3.32 mmol) をジメチルホルムアミド (20 mL) に溶かし、ビス-p-ニトロフェニルカーボネート (2.02 mg, 6.65 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (0.87 mL, 4.98 mmol) を加えた。終夜攪拌した後、反応溶液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルとジエチルエーテルにより洗浄し、p-ニトロフェニルカーボネート体 (1.73 g, 68%) を得た。

[0097] [化4]



p-ニトロフェニルカーボネート体 (1.28 g, 1.67 mmol) と HOBt (376 mg, 2.78 mmol) のジメチルホルムアミド (3.4 mL) とピリジン (0.85 mL) の溶液に MMAE (1.00 g, 1.39 mmol) を加えた。24時間後、反応液を Sephadex LH20 (溶媒 CHCl_3 : MeOH = 1 : 1) により精製し、Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAE (1.44 g, 77%) を得た。

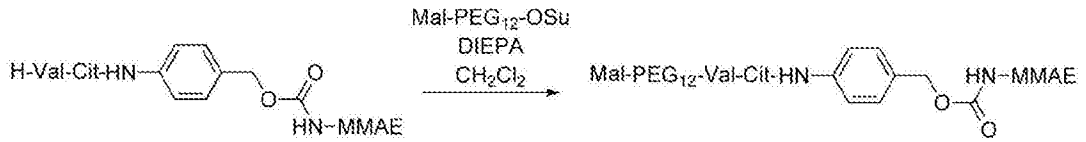
[0098] [化5]



Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAE (1.44 g, 1.07 mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) に Et_2NH (5 mL)

を加えた。終夜攪拌後、反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルとジエチルエーテルにて洗浄し、淡黄色固体（960mg，80%）を得た。

[0099] [化6]



H-Val-Cit-PABC-MMAE（960mg，0.855mmol）のジクロロメタン溶液（20mL）にN末端にマレイミド基を有するMal-PEG₁₂-OSu（814mg，0.94mmol）とジイソプロピルエチルアミン（0.45mmol，2.57mmol）を加えた。終夜攪拌し、反応液をSephadex LH20（CHCl₃：MeOH=1：1）と分子ふるいHPLCにより精製し、Mal-PEG₁₂-Val-Cit-PABC-MMAE（以下、「マレイミドMMAE化合物」と称する場合がある）を無色オイル（769mg，48%）として得た。

[0100] 5mM EDTA含有PBSと150mM NaClおよび5mM EDTA含有100mMリン酸緩衝液（pH6.0）とを用いてpH6.4の緩衝液を調製し、得られた緩衝液を用いて抗体濃度が1.0mg/mlになるよう抗体溶液を調製した。該抗体溶液にジチオトレイトール（DTT）を最終濃度1～10mMになるように加えて、26～37℃で30～45分反応させた。次いで、Amicon Ultra（MWCO：30,000）で反応液から反応試薬を除去した。吸収測定したところ抗体の回収率は80～99%であった。また、5,5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）（DTNB）によるSH基の定量結果から、1抗体あたり3～5個のSH基が得られたことがわかった。

[0101] 次に、5mM EDTA含有PBSと150mM NaClおよび5mM EDTA含有100mMリン酸緩衝液（pH6.0）とを用いてpH6.4の緩衝液を調製し、得られた緩衝液を用いて上記反応液をタンパク質濃度

0.5 mg/mlとなるように希釈した。該希釈液に上記マレイミドMMAE化合物を1:4のモル比（抗体：マレイミドMMAE化合物）で混合した後、室温1時間、その後4℃で一晩反応させた。

[0102] その後、Amicon Ultra (MWCO:30,000)で反応液から反応試薬を除去した後、溶媒をPBSに置換した。Amicon Ultraでタンパク質を回収したところ60~90%の回収率であった。

[0103] 上記のようにして、抗体1個あたり3~5個のMMAEが付加されたhTF-MMAEを得た。

[0104] [殺細胞効果確認試験]

96well plateにヒト膵臓癌細胞(BxPC3)を 3×10^3 個ずつ加え、10%FCS、ペニシリン(100U/ml)、およびストレプトマイシン(100 μ g/ml)を含むRPMI培地で培養した。各ウェルに種々の薬物濃度となるようにhTF-MMAEを添加し、添加後72時間における細胞生存率を算出した。

[0105] なお、比較試験として、hTF-MMAEの代わりに、ヒト癌細胞に発現していないマウスTFに対するモノクローナル抗体(mTF)に上記と同様にしてMMAEを結合したmTF-MMAEを用いて同様の試験を行い、細胞生存率を算出した。ネガティブコントロール（薬物サンプルの添加なし）の細胞生存率を100%とした場合における各細胞生存率の割合(%)を図3に示す。

[0106] 図3に示されるとおり、hTF-MMAEは、mTF-MMAEに比べて顕著に優れた殺細胞効果を示した。このことから、薬物が抗hTFモノクローナル抗体(No.1849)に結合されることによって、表面にhTFを発現する細胞内への移行性が向上し、高い薬効を発揮し得ることがわかる。

[0107] [抗腫瘍効果確認試験]

4週齢ヌードマウス(BALBc nu/nu、メス)の背部皮下に 1×10^7 個/100 μ Lのヒト膵臓癌細胞(BxPC3)を移植し、腫瘍体積(腫瘍径に基づいて算出)が約200mm³となった時点から治療を開始した。

治療開始当日をDay 0とし、Day 0、4および8に1回ずつ薬物を尾静脈投与した（計3回投与）。薬物としては、hTF-MMAEを用い、対照として生理食塩水を投与した（各群：N=7）。薬物の投与量は、1回あたり10mg/kg（抗体量：約200μg/匹）であった。以後、Day 30まで腫瘍径および体重を週2回計測した。Day 0における腫瘍体積および体重に対する腫瘍体積および体重の比をそれぞれ図4および5に示す。

[0108] 図4に示されるとおり、hTF-MMAEは顕著に優れた抗腫瘍効果を示した。該結果は*in vitro*で確認された殺細胞効果に一致するものである。また、図5に示されるとおり、hTF-MMAEを投与した群において体重の減少は確認されなかった。

[0109] [実施例3 抗mTFモノクローナル抗体およびその断片]

[抗原の調製]

mTF全長アミノ酸配列の30位～251位までのアミノ酸配列を含む組み換え蛋白質を大腸菌で発現させ、ニッケルカラムで精製して得られたレコンビナントmTF（配列番号73）を抗原として用いた。

[0110] [ラットへの免疫]

レコンビナントmTF50μgをフロイント完全アジュバント（Difco）と共に6週令のWister雌ラット3匹に腹腔内投与し、初回免疫とした。その14日後にレコンビナントmTF50μgをSigma Adjuvant System（Sigma）と共に投与し、追加免疫とした。以降、21日毎に同様の追加免疫を7回行った。さらに207日後にPBSで希釈したレコンビナントmTF10μgを腹腔投与し、レコンビナントmTF40μgを尾静脈投与することで最終免疫とした。

[0111] [ハイブリドーマの調製]

最終免疫の3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を回収した。脾臓細胞とマウスミエローマ細胞（p3X63Ag8.653）を50%濃度のポリエチレングリコール4000（Merck）を用いて融合させ、HAT培地で選択した。

[0112] [抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング]

細胞融合8日後に抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。スクリーニングに用いたイムノアッセイは以下のとおりである。ELISA法を行うにあたり、96穴マイクロタイタープレート（ヌンク社製）の各ウェルにレコンビナントmTFを1 μ g/mL含む50mM炭酸緩衝液（pH8）を50 μ L/wellで添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩もしくは室温で2時間固定した。これらのウェルを300 μ Lの洗浄液（0.05% Tween20/25mM Tris/140mM NaCl/2.5mM KCl、pH7.4）で3回洗浄した後、ブロッキングバッファー（0.05% Tween20/1% BSA/100mM NaH₂PO₄/140mM NaCl、pH5）を200 μ Lで加えて4 $^{\circ}$ Cで一晩もしくは室温で1時間静置してブロッキングを行った。このようにして得たmTF固相化プレートの各ウェルに50 μ Lのハイブリドーマ培養上清を添加して室温で1時間反応させた。各ウェルを300 μ Lの洗浄液で3回洗浄後、ブロッキングバッファーで5,000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体（Bethyl）を50 μ Lで加えて30分反応させた。反応後、各ウェルを300 μ Lの洗浄液で3回洗浄し、3.7mM o-フェニレンジアミン/25mM クエン酸/130mM Na₂HPO₄/0.006% H₂O₂（pH5.0）を100 μ Lで添加し、呈色させた。10～15分後に2規定硫酸を30 μ L/wellで添加して反応を停止し、吸光度（490nm）を吸光プレートリーダーで測定した。また免疫沈降ELISA法はレコンビナントmTFとハイブリドーマ培養上清とを混合し、混合液中の未結合mTFの量をmTF定量サンドイッチELISAで測定することで実施した。さらに、フローサイトメトリー法を定法に従って実施し、hTF発現細胞に対するハイブリドーマ培養上清の反応性を測定した。

[0113] 上記測定の結果、mTFと強い親和性を示したハイブリドーマを選択し、これらのクローンについて限界希釈法を2回行うことでmTFと結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを樹立した。

[0114] [抗体の調製]

樹立した各ハイブリドーマを牛由来 IgG を除去した牛血清を 5% 量含む RPMI 1640 培地等で大量培養し、培養上清を得た。もしくは、各ハイブリドーマを ICR ノードマウスの腹腔内で大量培養し、腹水を採取した。得られた培養上清もしくは腹水を Protein G アフィニティカラムクロマトグラフィーに供して IgG モノクローナル抗体を精製した。

[0115] [インターナリゼーションアッセイ]

上記のようにして得られた各モノクローナル抗体を以下のインターナリゼーションアッセイに供した。

カルチャースライド 4 チャンバー (BD) にマウス B16 メラノーマ細胞とその TF 強制発現細胞を 5×10^4 cells / チャンバーで播種し、RPMI 1640 培地で 37°C、5% CO₂ 環境下、12 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後に Alexa 647 蛍光ラベル kit (Invitrogen) で標識した 30 μg の抗体を 1 ml の RPMI 1640 培地で希釈し各チャンバーに投与し、3 時間培養した。当該 3 時間の培養においては、培養開始から 2 時間経過後に、終濃度 75 nM となるように LysoTracker RED-DND99 (Invitrogen) を培養液に加え、その後さらに 1 時間培養した。次いで、PBS で 3 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) で核染色後、Fluoromount G (Southern Biotech) で封入した。次いで、蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて各細胞を観察した。観察の結果を図 6 に示す。

[0116] 図 6 に示すように、モノクローナル抗体 (No. 1157) においては、細胞内に蛍光標識された抗体 (赤色) が移行していることから、当該モノクローナル抗体が mTF を発現する細胞へのインターナリゼーション能を有することが確認された。なお、図 6 において、蛍光標識された抗体 (赤色) が内部に移行している細胞は、TF 強制発現のマウス B16 メラノーマ細胞であり、内部に抗体が移行していない細胞は、通常のマウス B16 メラノーマ

細胞と推測される（参考として、TF強制発現のマウスB16メラノーマ細胞におけるTF発現量の増強レベルを図7に示す。図7は、マウスB16メラノーマ細胞およびそのTF強制発現細胞におけるGAPDHのmRNA発現量に対するTFのmRNA発現量の割合を示すグラフである）。

[0117] [可変領域をコードするDNA配列、アミノ酸配列およびCDR配列の決定]

抗mTFモノクローナル抗体（No. 1157）を産生するハイブリドーマから全RNAを抽出したこと以外は、抗hTFモノクローナル抗体（No. 1849）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の塩基配列の決定方法と同様にして、抗mTFモノクローナル抗体（No. 1157）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の塩基配列を決定した。

[0118] 決定された抗mTFモノクローナル抗体（No. 1157）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の塩基配列はそれぞれ配列番号74および75に記載のとおりである。また、該重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号25および26に記載されるとおりである。また、これらの可変領域におけるCDRのアミノ酸配列を以下のとおり決定した。

[表4]

No. 1157		アミノ酸配列	配列番号
重鎖可変領域	CDR 1	T D Y G M	19
	CDR 2	S I T V R N Y I Y Y A D T V K	20
	CDR 3	R T E G M D Y	21
軽鎖可変領域	CDR 1	K V S Q N I N G Y L N	22
	CDR 2	N T D N L Q T	23
	CDR 3	L Q H Y S W P L T	24

[0119] [実施例4 キメラ抗体の作製]

実施例1でクローニングした抗hTFモノクローナル抗体（No. 1849）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするDNA断片をPCRで増幅した。重鎖の可変領域DNA断片をヒトIgG1重鎖定常領域を発現す

るクローニングベクター (pFUSEss_CHlg-hG1e2 (invivoGen)) に挿入し、軽鎖の可変領域DNA断片をヒトkappa軽鎖定常領域を発現するクローニングベクター (pFUSE2ss_CLlg_hk (invivoGen)) に挿入して、発現ベクターを得た。得られた発現ベクターをLipofectamine LTX Reagent (Invitrogen) を用いてCHO-K1細胞にトランスフェクションした。次いで、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ Blastcidin S (科研製薬) および $300\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin (Invitrogen) を用いて薬剤選択を行い、両耐性細胞株を得た。

[0120] 得られた細胞株をHam's F12K (wako)、10%FBS、1%penicillin、streptomycin (Invitrogen)、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ Blastcidin Sおよび $300\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocinを含む培地で維持培養した。次いで、96wellプレートを用いた限界希釈法により抗hTFヒト型キメラ抗体の定常発現細胞株 (No. 1849キメラクローン) をクローニングした。

[0121] クローニングした細胞株 (No. 1849キメラクローン) の培養上清をELISAに供したところ、hTFとの反応性が確認できた。また、クローニングした細胞株の培養上清をフローサイトメトリー解析 (FACS) に供したところ、ヒト結腸腺癌細胞 (DLD-1) に対する反応性が確認できた。具体的には、図8に示されるとおり、培養上清は、hTF発現細胞であるDLD-1に対して特異的な反応性を示した (図8中、(1)、(2)および(3)はそれぞれ、ラット抗hTFモノクローナル抗体 (No. 1849)、No. 1849キメラクローンの培養上清およびラットのアイソタイプ・コントロールを用いた解析結果を示す)。

[0122] [キメラ抗体をコードするDNA配列およびアミノ酸配列の決定]

No. 1849キメラクローンからベクターを抽出し、常法に従って該ベクターにコードされている抗hTFヒト型キメラ抗体 (No. 1849) の重鎖および軽鎖の塩基配列ならびにアミノ酸配列を決定した。決定されたキ

メラ抗体の重鎖および軽鎖の塩基配列はそれぞれ配列番号76および77に記載のとおりである。また、決定されたキメラ抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号78および79に記載のとおりである。

産業上の利用可能性

[0123] 本発明のモノクローナル抗体またはその断片は、DDSの分野において好適に利用され得る。

請求の範囲

[請求項1] Tissue Factorに結合するモノクローナル抗体であって、

それぞれ配列番号3、4および5に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号6、7および8に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する軽鎖可変領域と、を含む、抗ヒトTissue Factorモノクローナル抗体；

それぞれ配列番号11、12および13に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号14、15および16に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する軽鎖可変領域と、を含む、抗ヒトTissue Factorモノクローナル抗体；または

それぞれ配列番号19、20および21に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する重鎖可変領域と、それぞれ配列番号22、23および24に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1、2および3を有する軽鎖可変領域と、を含む、抗マウスTissue Factorモノクローナル抗体；

である、モノクローナル抗体。

[請求項2] 配列番号9に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と90%以上同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号10に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と90%以上同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む抗ヒトTissue Factorモノクローナル抗体；

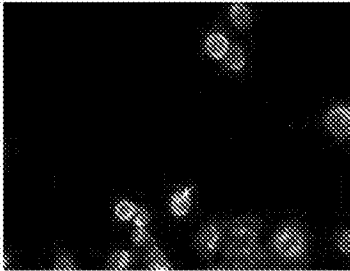
配列番号17に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と90%以上同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号18に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と90%以上同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む抗ヒトTissu

e Factorモノクローナル抗体；または
配列番号25に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と90%以上同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号26に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と90%以上同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む抗マウスTissue Factorモノクローナル抗体；
である、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

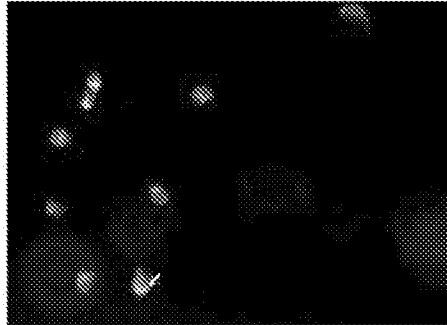
- [請求項3] 請求項1に記載のモノクローナル抗体が結合するTissue Factorのエピトープと同じエピトープに結合する、モノクローナル抗体。
- [請求項4] Tissue Factorを発現する細胞へのインターナリゼーション能を有する、請求項1から3のいずれかに記載のモノクローナル抗体。
- [請求項5] ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項1から4のいずれかに記載のモノクローナル抗体。
- [請求項6] 請求項1から5のいずれかに記載のモノクローナル抗体の一部を含み、Tissue Factorと結合できる、抗体の断片。
- [請求項7] Tissue Factorを発現する細胞へのインターナリゼーション能を有する、請求項6に記載の抗体の断片。
- [請求項8] 標的結合因子としての請求項1から5のいずれかに記載のモノクローナル抗体あるいは請求項6または7に記載の抗体の断片と、薬物とを含む医薬組成物。
- [請求項9] 標的結合因子としての請求項1から5のいずれかに記載のモノクローナル抗体あるいは請求項6または7に記載の抗体の断片を含む、薬物送達用組成物。

[図1]

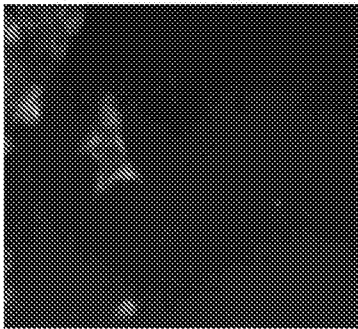
(a) No.1849



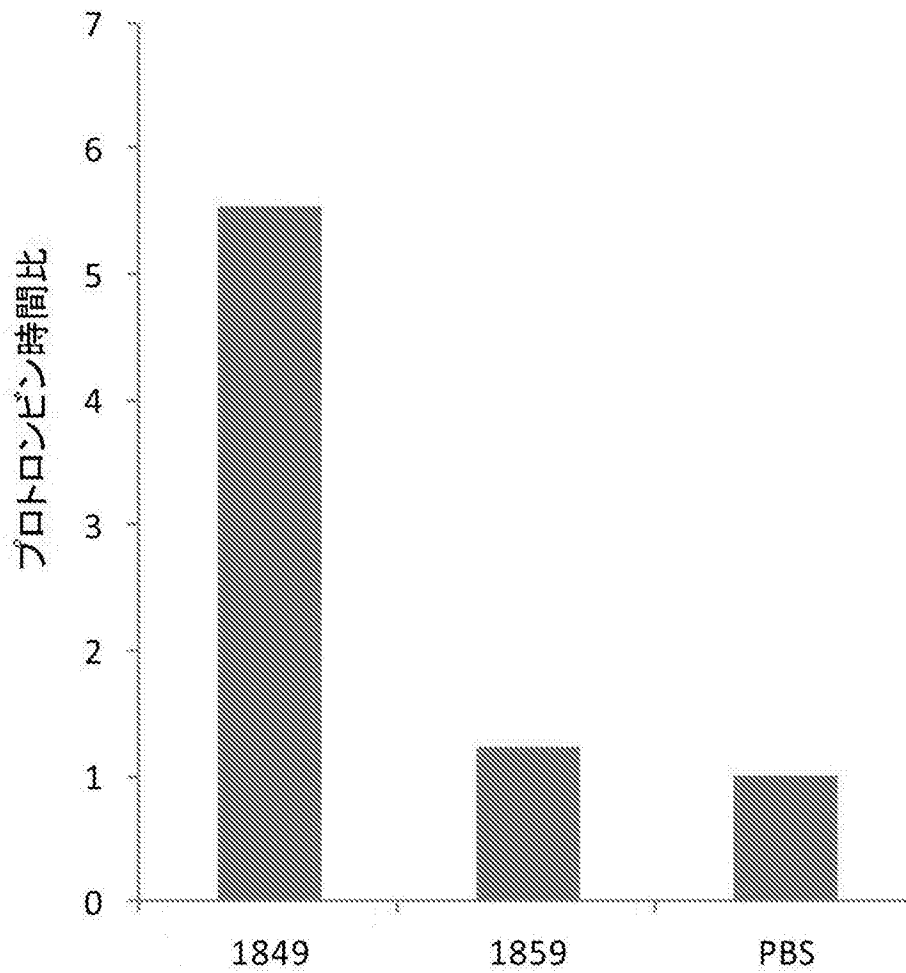
(b) No.1859



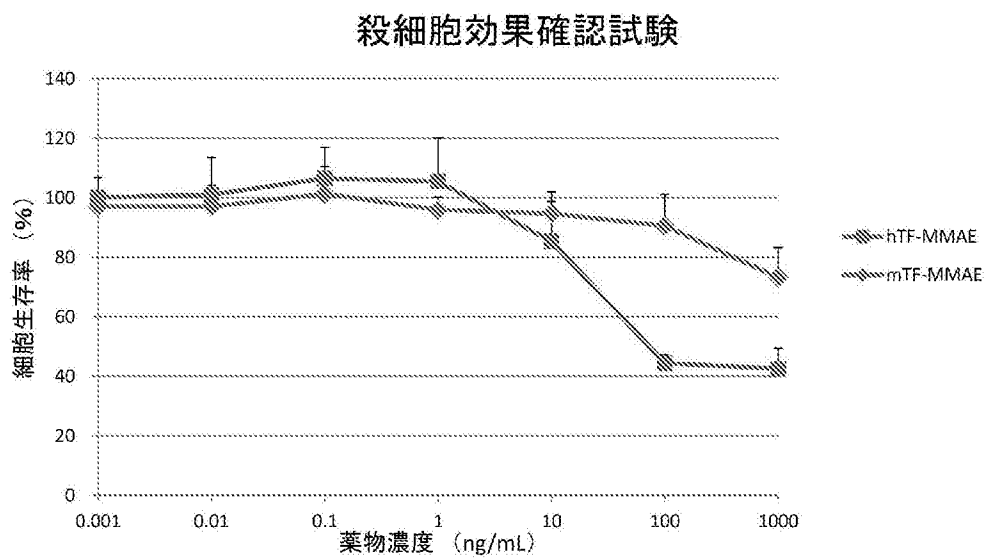
(c) No.1006



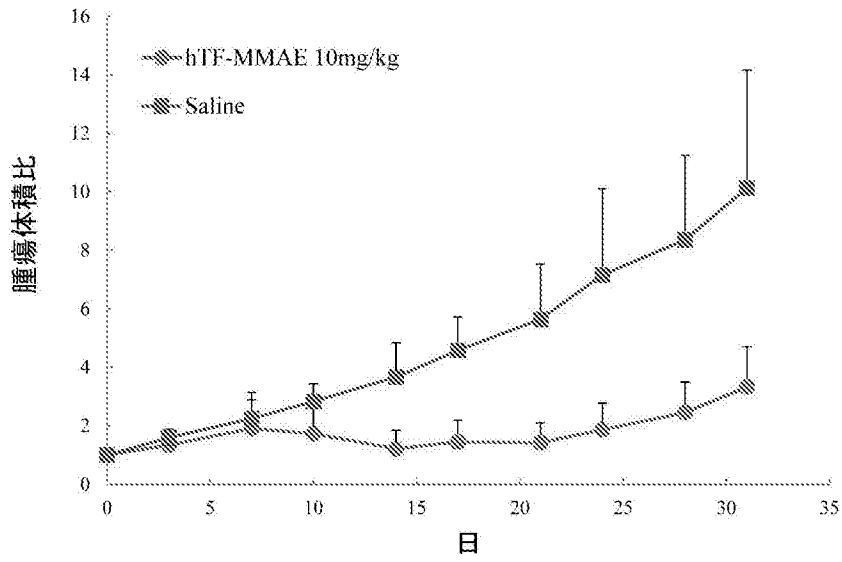
[図2]



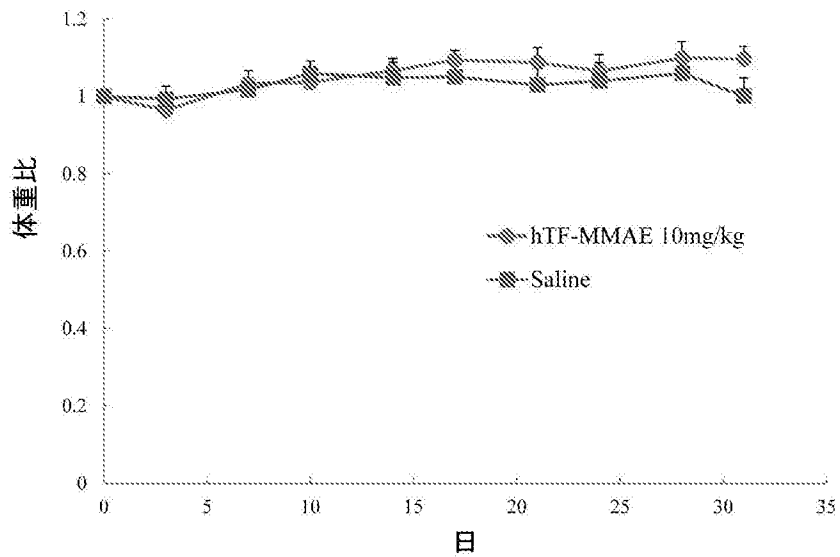
[図3]



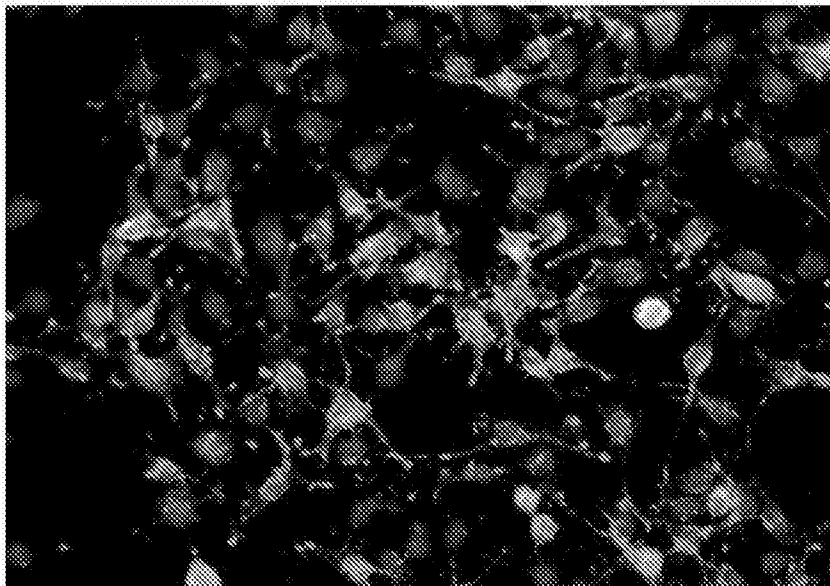
[図4]



[図5]

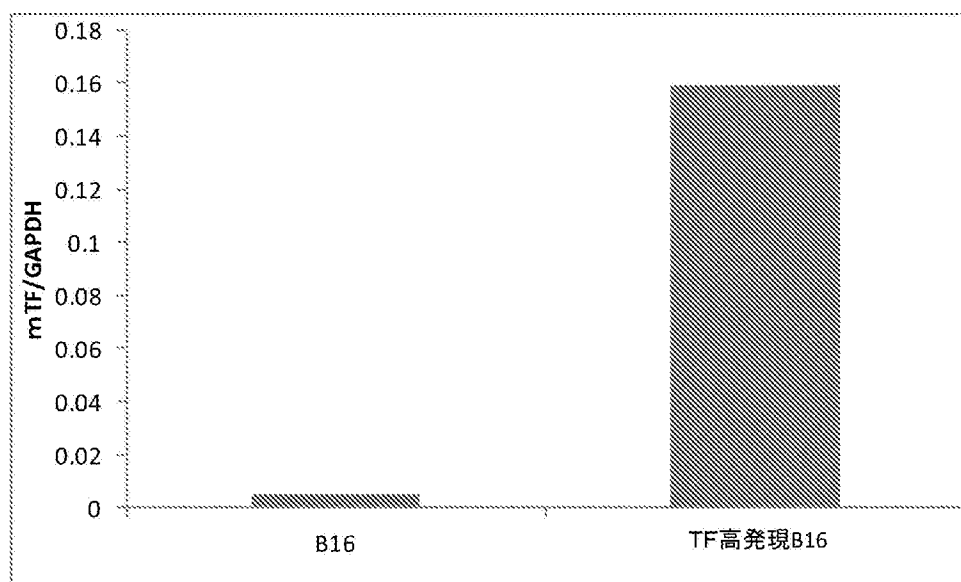


[図6]

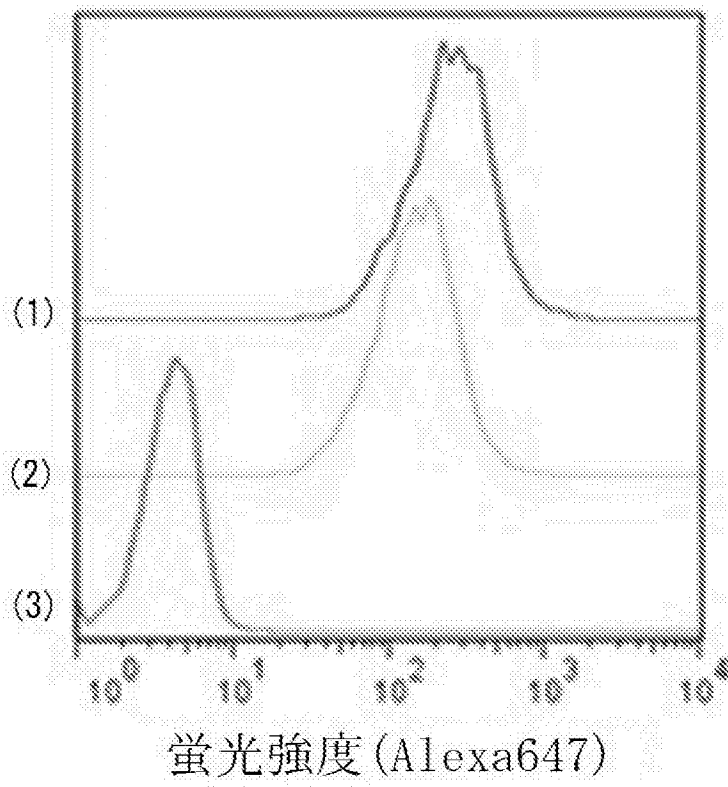


[図7]

mTFのmRNA発現量の比較



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/052918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/18(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P7/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

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)
C07K16/18, A61K39/395, A61K45/00, A61P7/02, A61P29/00, A61P35/00, C12P21/08

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/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	BREIJ E. C. W., et al., An Antibody-Drug Conjugate That Targets Tissue Factor Exhibits Potent Therapeutic Activity against a Broad Range of Solid Tumors, Cancer Research, 2013.12, Vol.74, No.4, P.1214-1226	1-9
X	JP 2003-527861 A (Genentech, Inc.), 24 September 2003 (24.09.2003), claims 1, 2; paragraph [0001]; example 1 & US 2003/0119075 A1 & US 2003/0124117 A1 & US 2004/0126816 A1 & US 2003/0143225 A1 & WO 2001/070984 A2 & WO 2003/103711 A1 & EP 1263960 A2	1-6, 8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 09 April 2015 (09.04.15)	Date of mailing of the international search report 21 April 2015 (21.04.15)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P7/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/18, A61K39/395, A61K45/00, A61P7/02, A61P29/00, A61P35/00, C12P21/08</p>											
<p>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</p> <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>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015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	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年	
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>BREIJ E. C. W., et al., An Antibody-Drug Conjugate That Targets Tissue Factor Exhibits Potent Therapeutic Activity against a Broad Range of Solid Tumors, Cancer Research, 2013.12, Vol.74, No.4, P.1214-1226</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2003-527861 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.09.24, 請求項1、2、段落[0001]、実施例1 & US 2003/0119075 A1 & US 2003/0124117 A1 & US 2004/0126816 A1 & US 2003/0143225 A1 & WO 2001/070984 A2 & WO 2003/103711 A1 & EP 1263960 A2</td> <td>1-6, 8</td> </tr> </tbody> </table>			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	BREIJ E. C. W., et al., An Antibody-Drug Conjugate That Targets Tissue Factor Exhibits Potent Therapeutic Activity against a Broad Range of Solid Tumors, Cancer Research, 2013.12, Vol.74, No.4, P.1214-1226	1-9	X	JP 2003-527861 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.09.24, 請求項1、2、段落[0001]、実施例1 & US 2003/0119075 A1 & US 2003/0124117 A1 & US 2004/0126816 A1 & US 2003/0143225 A1 & WO 2001/070984 A2 & WO 2003/103711 A1 & EP 1263960 A2	1-6, 8
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	BREIJ E. C. W., et al., An Antibody-Drug Conjugate That Targets Tissue Factor Exhibits Potent Therapeutic Activity against a Broad Range of Solid Tumors, Cancer Research, 2013.12, Vol.74, No.4, P.1214-1226	1-9									
X	JP 2003-527861 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.09.24, 請求項1、2、段落[0001]、実施例1 & US 2003/0119075 A1 & US 2003/0124117 A1 & US 2004/0126816 A1 & US 2003/0143225 A1 & WO 2001/070984 A2 & WO 2003/103711 A1 & EP 1263960 A2	1-6, 8									
<p><input 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。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>09.04.2015</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>21.04.2015</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>吉岡 沙織</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<table border="1"> <tr> <td>4B</td> <td>3646</td> </tr> </table>	4B	3646							
4B	3646										