(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
2016 年 10 月 20 日(20.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/167227 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/36 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061727

(22) 国際出願日: 2016 年 4 月 11 日(11.04.2016)

(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 2015-082032 2015 年 4 月 13 日(13.04.2015) JP

(71) 出願人: 国立研究開発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５－１－１ Tokyo (JP). 株式会社凜研究所 (RIN INSTITUTE INC.) [JP/JP]; 〒1020076 東京都千代田区五番町２番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 松村　保広 (MATSUMURA Yasuhiro); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目５番１号　国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所 (CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋２－８－２１　喜久家ビル９階 Tokyo (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), ユーラシア (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)）

WO 2016/167227 A1

(54) **Title**: ANTIBODY AGAINST INSOLUBLE FIBRIN

(54) 発明の名称 : 不溶性フィブリンに対する抗体

(57) **Abstract**: An antibody incapable of binding to fibrinogen and having high affinity and specificity for and to insoluble fibron, said antibody being produced by immunizing with a peptide that comprises amino acid residues lying between position-231 to position-242 in a fibrinogen Bβ chain.

(57) 要約: フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸からなるペプチドを免疫して得られる、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。

明　細　書

発明の名称 ： 不溶性フィブリンに対する抗体

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又は血栓溶解機能部分とを含む複合体に関する。

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。

[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。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ビ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態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。したがって、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、さらにはこれら疾患部位特異的に薬剤を送達するための手段の開発が望まれている。

[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及び８）。

[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。したがって、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。

[0007] この点に関し、特許文献８において、本発明者らは、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ている。そして、その結果、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（Ａα鎖、Ｂβ鎖、γ鎖）のうち、Ｂβ鎖には結合でき、さらに、１０２－１０抗体のエピトープがフィブリノーゲンＢβ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ている。

[0008] フィブリノーゲンは、それを構成するフィブリノーゲンＢβ鎖のアミノ末

端が切断され、フィブリノーゲンβ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。

[0009] 本発明者らによる更なる解析の結果、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Ｂβ鎖においてフィブリノーゲンγ鎖と結合している部位であることが明らかになっている。そして、本発明者らは、かかる結果に基づき、フィブリノーゲンＢβ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γ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、得られた抗体が、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すことを見出している。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すれも、１０２－１０抗体のそれよりもはるかに高いものであり、例えば、フィブリノーゲンγ鎖の第２３２～２４６位のアミノ酸からなる部位をエピトープとする抗体（３４－１０５抗体）に至っては、１０２－１０抗体における不溶性フィブリンに対する親和性と比較して、１６倍も高いものであった（特許文献８）。

先行技術文献

特許文献

[0010] 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

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

特許文献8：国際公開第２０１４／１３３０９３号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 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

[0012] 本発明者は、特許文献８において示した通り、フィブリノーゲンγ鎖の第２３２～２４６位のアミノ酸からなる部位をエピトープとする抗体（以下、「抗γ鎖抗体」とも称する）が、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して高い親和性及び特異性を示したことから、かかる抗体の有用性について更なる解析を行った。その結果、抗γ鎖抗体は、ヒト由来のフィブリノーゲンと結合しないものの、マウス由来のフィブリノーゲンに対しては結合できてしまうことが明らかになった。そのため、抗γ鎖抗体に関し、動物実験を行うことができず、当該抗体の医薬用途開発は困難なものとなった。

[0013] そこで、本発明者は、フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなる部位をエピトープとする抗体（特許文献７に記載の１０２－１０抗体等）は、マウス由来のフィブリノーゲンとは交差反応を示さないことを鑑み（特許文献８　参照のこと）、再度フィブリノーゲンＢβ鎖の当該部位を抗原としてマウスに免疫することで、より不溶性フィブリンに対して高い親和性及び特異性を示す抗体の取得を試みた。

[0014] しかしながら、このようにして得られた抗体は、従前のフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなる部位をエピトープとする抗体（特許文献８に記載のＦｉｂ－３４３５抗体、Ｆｉｂ－０３５５抗体）と比較して、不溶性フィブリンへの親和性は弱いか又は同程度である一方で、フィブリノーゲンへの非特異的結合性をある程度示す抗体しか得ることができなかった。

[0015] そこで、本発明者は、更なる研究を鋭意重ねた結果、フィブリノーゲンとは交差反応を示さず且つ不溶性フィブリンに対して高い親和性及び特異性を

示す抗体は、前記抗原のＣ末端側を４アミノ酸狭めたものを抗原として用いて免疫することにより得られ易くなることを見出した。このようにして得られた抗体においては、ＫＤ値が１０$^{-9}$オーダーという抗原に対して極めて高い親和性を示すものもあり、特に、そのうちの一つ（４４３－２抗体）に至っては、不溶性フィブリンに対する親和性において、１０２－１０抗体と比較して１００倍も高いものであった。このことから、フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなる部位は不溶性フィブリンにおける当該部位のネイティブな構造を保てていなかった可能性が示唆されると共に、Ｃ末端の４アミノ酸を欠失させることにより、ペプチドが、意外にも、不溶性フィブリンにおける当該ペプチド部分のネイティブな立体構造を取り戻した可能性があり、これにより不溶性フィブリンへの結合能が向上したと考えられる。

[0016] また、このようにして作製して得られた３種の抗体はいずれも、機能的にも有用であり、インビトロ及びインビボにおいて不溶性フィブリン（血栓）を特異性高く検出することができることを明らかにした。さらに、これら抗体は血栓部位への高い集積性も発揮することも見出し、腫瘍や心筋梗塞等の血栓関連疾患を判定するための試薬及び方法、並びに当該疾患の治療薬及び治療方法においても有用であることを明らかにした。また、前記３種の抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域及び相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列を決定した。

[0017] 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＞～＜８＞を提供するものである。

＜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に示される部位に結合する抗体であり、下記（ｉ）～（iii）のうちのいずれか一に記載の特徴を有する抗体

（ｉ） 配列番号：５～７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：１１～１３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
（ii）　配列番号：１７～１９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：２３～２５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
（iii）　配列番号：２９～３１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：３５～３７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。
＜２＞　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、フィブリノーゲンの配列番号：１に示される部位に結合する抗体であり、下記（ｉ）～（iii）のうちのいずれか一に記載の特徴を有する抗体
（ｉ）　配列番号：４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：１０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

（ｉｉ）　配列番号：１６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：２２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

（ｉｉｉ）　配列番号：２８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：３４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。

＜３＞　＜１＞又は＜２＞に記載の抗体と、抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能部分とを含む、複合体。

＜４＞　＜１＞又は＜２＞に記載の抗体を含む、免疫学的測定用試薬。

＜５＞　＜１＞又は＜２＞に記載の抗体を含む、血栓関連疾患の判定用試薬。

＜６＞　＜１＞又は＜２＞に記載の抗体を含む、血栓可視化剤。

＜７＞　（ａ）＜１＞又は＜２＞に記載の抗体とサンプルとを接触させるステップと、

（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と

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。

＜８＞　（ａ）＜１＞又は＜２＞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と、

（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

ステップと

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。

発明の効果

[0018] 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

[0019] [図1]ラット腸骨リンパ節法にて作製したフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体（４４３－２抗体、１５５５－２抗体、１８３１－５抗体）と、特許文献８にて作製されたフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体（Ｆｉｂ６－３４３５抗体、Ｆｉｂ６－０３５５抗体）と、特許文献７にて作製されたフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体（１０２－１０抗体）との、ヒトに由来する不溶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。なお、グラフの横軸は抗体の添加濃度を示し、縦軸は不溶性フィブリンに対する親和性（波長４５０ｎｍにおける吸光度）を示す。さらに、各棒は、左から順に、４４３－２抗体、１５５５－２抗体、１８３１－５抗体、Ｆｉｂ６－３４３５抗体、Ｆｉｂ６－０３５５抗体及び１０２－１０抗体の結果を示す。また、図中、Ｆｉｂ６－３４３５抗体及びＦｉｂ６－０３５５抗体は、各々特許文献８に記載のＦｉｂ－３４３５抗体及びＦｉｂ－０３５５抗体のことである。

[図2]４４３－２抗体、１５５５－２抗体、１８３１－５抗体、Ｆｉｂ６－３４３５抗体、Ｆｉｂ６－０３５５抗体及び１０２－１０抗体の、ヒトに由来

する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、図中の表記については、縦軸がフィブリノーゲンに対する親和性（波長４５０ｎｍにおける吸光度）を示すことを除き、他は図１と同様である。

[図3]４４３－２抗体、１５５５－２抗体及び１８３１－５抗体の、ヒト由来の不溶性フィブリン、ヒト由来のフィブリノーゲン、マウス由来の不溶性フィブリン、マウス由来のフィブリノーゲン、可溶性フィブリン及びＤ－ダイマー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、グラフの縦軸は各ペプチドに対する親和性（波長４５０ｎｍにおける吸光度）を示す。さらに、各棒は、左から順に、４４３－２抗体、１５５５－２抗体及び１８３１－５抗体の結果を示す。

[図4]４４３－２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。図中、左側は明視野観察の結果を示し、右側は蛍光観察の結果を示す。上から順に、フィブリンクロットへの抗体添加濃度が１μｇ／ｍＬ、５μｇ／ｍＬ及び１０μｇ／ｍＬの結果を示す。また、各写真右下に付したスケールバーは５００μｍを示す（図中の表記については、図５～７においても同様）。

[図5]１５５５－２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6]１８３１－５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7]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8]化学発癌モデルマウスに蛍光色素にて標識した４４３－２抗体を投与し、当該マウスから摘出した腫瘍をＨＥ染色して観察した結果を示す、顕微鏡写真である。図中、上部は明視野観察の結果を示し、下部は蛍光観察の結果を示す。また、各写真右下に付したスケールバーは２００μｍを示す（図中の表記については、図９～１１においても同様）。

[図9]化学発癌モデルマウスに蛍光色素にて標識した１５５５－２抗体を投与し、当該マウスから摘出した腫瘍をＨＥ染色して観察した結果を示す、顕微鏡写真である。

[図10]化学発癌モデルマウスに蛍光色素にて標識した１８３１－５抗体を投与し、当該マウスから摘出した腫瘍をＨＥ染色して観察した結果を示す、顕微鏡写真である。

[図11]化学発癌モデルマウスに蛍光色素にて標識した１０２－１０抗体を投与し、当該マウスから摘出した腫瘍をＨＥ染色して観察した結果を示す、顕微鏡写真である。

[図12]抗不溶性フィブリン抗体（４４３－２抗体）の、シグナルペプチド及び軽鎖（Ｌ鎖）可変領域、シグナルペプチド及び重鎖（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。なお、４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域をコードする塩基配列は、配列番号：２に記載の塩基配列であり、４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号：３に記載の配列であり、４４３－２抗体のＬ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列は、配列番号：５～７に記載の配列であり、４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域をコードする塩基配列は、配列番号：８に記載の塩基配列であり、４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号：９に記載の配列であり、４４３－２抗体のＨ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列は、配列番号：１１～１３に記載の配列である。

[図13]抗不溶性フィブリン抗体（１５５５－２抗体）の、シグナルペプチド及び軽鎖（Ｌ鎖）可変領域、シグナルペプチド及び重鎖（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。なお、１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域をコードする塩基配列は、配列番号：１４に記載の塩基配列であり、１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号：１５に記載の配列であり、１５５５－２抗体のＬ鎖ＣＤＲ１～３の配列は、配列番号：１７～１９

に記載の配列であり、１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域をコードする塩基配列は、配列番号：２０に記載の塩基配列であり、１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号：２１に記載の配列であり、１５５５－２抗体のＨ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列は、配列番号：２３～２５に記載の配列である。

[図14]抗不溶性フィブリン抗体（１８３１－５抗体）の、シグナルペプチド及び軽鎖（Ｌ鎖）可変領域、シグナルペプチド及び重鎖（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。なお、１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域をコードする塩基配列は、配列番号：２６に記載の塩基配列であり、１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号：２７に記載の配列であり、１８３１－５抗体のＬ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列は、配列番号：２９～３１に記載の配列であり、１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域をコードする塩基配列は、配列番号：３２に記載の塩基配列であり、１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号：３３に記載の配列であり、１８３１－５抗体のＨ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列は、配列番号：３５～３７に記載の配列である。

発明を実施するための形態

[0020] ＜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Ｂβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸（配列番号：１に記載のアミノ酸配列）からなるペプチドを、ラットに免疫し、当該ラットのリンパ節から調製された３種の抗体（４４３－２抗体、１５５５－２抗体及び１８３１－５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して、高い親和性及び特異性を示すことを明らかにした。

[0021] したがって、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に示される部位に結合する抗体であり、下記（ｉ）～（iii）のうちのいずれか一に記載の特徴を有する抗体を

提供する。

（ｉ）　４４３－２抗体の軽鎖可変領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号：５～７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、

４４３－２抗体の重鎖可変領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号：１１～１３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

（ii）　１５５５－２抗体の軽鎖可変領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号：１７～１９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、

１５５５－２抗体の重鎖可変領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号：２３～２５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

（iii）　１８３１－５抗体の軽鎖可変領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号：２９～３１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、

１８３１－５抗体の重鎖可変領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号：３５～３７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。

[0022] また、本発明の抗体のより好ましい態様としては、以下の抗体が挙げられる。

[0023] 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、フィブリノーゲンの配列番号：１に示される部位に結合する抗体であって、下記（ｉ）～（iii）のうちのいずれか一に記載の特徴を有する抗体

（ｉ） ４４３－２抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：４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、

４４３－２抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：１０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

（ii） １５５５－２抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：１６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、

１５５５－２抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：２２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

（iii） １８３１－５抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：２８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、

１８３１－５抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：３４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。

[0024] なお、アミノ酸の改変（置換、欠失、付加及び／又は挿入）については後述を参照のこと。また、これら抗体のうち、抗原に対するＫＤ値が極めて低いという観点から、前記（ｉ）又は（ｉｉ）の特徴を有する抗体がより好ましく、前記（ｉ）の特徴を有する抗体がさらに好ましい。

[0025] 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、可溶性のフィブリンモノマー及びフィブリンポリマー、並びに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。

[0026] 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Ａα鎖と、２つのフィブリノーゲンＢβ鎖と、２つのフィブリノーゲンγ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Ｂβ鎖」は、ヒト由来のものであれば典型的には、配列番号：３８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γ鎖」は、ヒト由来のものであれば典型的には、配列番号：３９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β鎖」とは、トロンビンの作用によりフィブリノーゲンＢβ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：３８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。また、本発明の抗体のエピトープが含まれる配列番号：１に記載のアミノ酸配列は、ヒトフィブリノーゲンＢβ鎖の第２

３１～２４２位のアミノ酸配列又はヒトフィブリノーゲンβ鎖の第１８７～１９８位のアミノ酸配列である。

[0027] 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。

[0028] 本発明における、「結合する」及び「結合しない」には、各々「実質的に結合する」及び「実質的に結合しない」ことが含まれる。ここで「実質的に結合する」とは、抗体とその抗原とは異なる分子間とで生じる非特異的結合とは異なる、抗体と抗原との特異的結合を意味する。一方、「実質的に結合しない」とは前記非特異的結合を含むが、前記特異的結合とは異なるレベルでの結合を意味する。さらに、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ＥＬＩＳＡ法が挙げられる。また、例えば、かかる公知の方法により解析して得られる被験抗体と不溶性フィブリンとの結合性（ＥＬＩＳＡ法における吸光度等のシグナル）が、不溶性フィブリンと結合しないことが確認されている抗体（例えば、アイソタイプコントロール抗体）と不溶性フィブリンとのそれよりも有意に高いときに、該被験抗体は「不溶性フィブリンに結合する」抗体であると判断することができる。一方、例えば、かかる公知の方法により解析して得られる被験抗体とフィブリノーゲンとの結合

性が、フィブリノーゲンと結合しないことが確認されている抗体（例えば、アイソタイプコントロール抗体）とフィブリノーゲンとのそれと有意な差が認められないときに、該被験抗体は「フィブリノーゲンに結合しない」抗体であると判断することができる。なお、有意な差の有無については、公知の統計学的手法を適宜用いることにより、当業者であれば判断することができる。

[0029] 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。

[0030] 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。したがって、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。

[0031] また、本発明の抗体の好ましい別の態様は、フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなるペプチドとの親和性が、ＫＤ値において、３×１０$^{-8}$以下である抗体が好ましく、１×１０$^{-8}$以下である抗体がより好ましく、８×１０$^{-9}$以下である抗体がさらに好ましく、７×１０$^{-9}$以下である抗体がより好ましく、６×１０$^{-9}$以下である抗体がさらに好ましく、５×１０$^{-9}$以下である抗体が特に好ましい。なお、前記ペプチドとのＫＤ値は、後述の実施例に示すような表面プラズモン共鳴解析法により得ることができる。

[0032] また、本発明の抗体の好ましい別の態様は、後述の実施例に記載のように、ＥＬＩＳＡ法において、フィブリノーゲンを固相化して更にトロンビン処理を施したプレートに、ペルオキシダーゼにて標識した当該抗体を１０μｇ／ｍＬの濃度にて、室温下３０分間反応させた後、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）を添加して測定される、不溶性フィブリン

に対する親和性（波長４５０ｎｍにおける吸光度）が、１．５以上（より好ましくは１．６以上、さらに好ましくは１．７以上、特に好ましくは１．８以上）である抗体である。

[0033] また、本発明の抗体の好ましい別の態様は、前記ＥＬＩＳＡにおいて、不溶性フィブリンに対する親和性（波長４５０ｎｍにおける吸光度）が、特許文献７に記載の１０２－１０抗体のそれと比較して、２０倍以上（より好ましくは５０倍以上、さらに好ましくは７０以上、特に好ましくは１００以上）である抗体である。

[0034] また、本発明の抗体の好ましい別の態様は、後述の実施例に記載のように、ＥＬＩＳＡ法において、フィブリノーゲンを固相化したプレートに、ペルオキシダーゼにて標識した当該抗体を１０μｇ／ｍＬの濃度にて、室温下３０分間反応させた後、ＴＭＢを添加して測定される、フィブリノーゲンに対する親和性（４５０ｎｍにおける吸光度）が、前記不溶性フィブリンに対するそれの６倍以上（より好ましくは１０倍以上）である抗体である。

[0035] 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。

[0036] 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グラフティング）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、ヒト抗体のレパー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）。

[0037] 本発明において抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部分（部分断片）であって、配列番号：１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。

[0038] 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。

[0039] 「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。

[0040] 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（２

００８））。

[0041] 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。

[0042] 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、４４３－２抗体、１５５５－２抗体、１８３１－５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、ＥＬＩＳＡ法により評価することができる。

[0043] 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。

[0044] 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に記載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、従来の手段（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。

[0045] 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（Ｋｏｈｌｅｒ&Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５））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、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ）のリンパ節細胞、脾臓細胞、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、抗原で免疫されたラット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。

[0046] 特に、後述の実施例において示す通り、ハイブリドーマ法としては、ラット腸骨リンパ節法が好ましい、すなわち、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をラットに免疫する工程と、該ラットから腸骨リンパ節、腋窩リンパ節及び鼠径リンパ節を摘出し、前記リンパ節のＢ細胞とミエローマとを融合させ、ハイブリドーマを樹立する工程と、該ハイブリドーマ又はその培養液から抗体を分離、精製する工程とを含む、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が、好適に用いられる。

[0047] 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。

[0048] したがって、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・精製する工程を含む、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を含むハイブリドーマを提供することができる。

[0049] ＜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。

[0050] 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。

[0051] 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はなく、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。

[0052] 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。

[0053] 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、直接固相法の他、サンドイッチ法、競合法等であってもよい。

[0054] 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。

[0055] 免疫アッセイの操作法は、公知の方法（Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら編，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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 酵素免疫アッセイの場合には、例えば、ペルオキシダーゼ、β－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。

[0060] 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）、Ａｌｅｘａ（登録商標）Ｆｌｕｏｒ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。

[0061] 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１２５及びヨウ素１３１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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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、ＴＭＢ、ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）等を、また酵素としてアルカリフォ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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] ＜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、不溶性フィブリンの存在部位に選択的に集積し得、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いることができる。ここで、「選択的」とは、他の部位と比較して不溶性フィブリンの部位により多く集積する意味で用いられる。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、例えば膵癌、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。

[0069] 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。

[0070] ＜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。

[0071] 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、例えばインドシアニングリーン、ＩＲＤｙｅ８００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}ｍＴｃ、^{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。

[0072] 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。したがって、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。

[0073] より具体的に、本発明は、本発明の抗体と、抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能部分とを含む複合体を提供する。本発明の抗体は、上述の通り、フィブリン、すなわち腫瘍における血栓部位に特異性高く結合できるため、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。また、本発明の抗体は、腫瘍に限らず、心筋梗塞や脳梗塞等の他の血栓関連疾患において生じた血栓部位（フィブリン）に結合するため、血栓溶解機能部分と結合させることによって、当該部分を血栓部位に送達し、その血栓を溶解させることができる。

[0074] 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－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）、アドリアマイシン、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、ゲムシタビン、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、ブ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、メトトレキセート、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。

[0075] 本発明の抗体と結合させることができる血栓溶解機能部分は、当技術分野で血栓を溶解する活性を有する分子であれば特に限定されるものではない。血栓溶解機能部分としては、例えば、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織型プラスミノーゲン活性化因子が挙げられる。

[0076] 本発明の複合体において、抗体１分子へ結合する抗腫瘍性化合物又は血栓溶解機能部分の数は、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。

[0077] また、抗体と抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能部分との結合も、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。

[0078] 本発明においては、抗体と抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能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、抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能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。

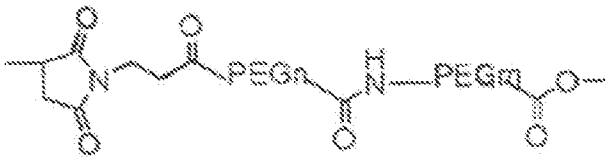
[0079] リンカーとは、２つの化合物を連結する２価以上の基を意味する。本発明において使用することができるリンカーとしては、特に限定されるものではないが、ポリアルキレングリコールリンカー、アルキレン基、ペプチド、糖鎖、及びその他の高分子担体が挙げられる。ポリアルキレングリコールリンカーの構成単位であるアルキレングリコールのアルキレン部分は、炭素数１～３０００、好ましくは炭素数２～１０００、より好ましくは炭素数２～１００である。ポリアルキレングリコールリンカーの分子量は通常３０～５００００Ｄａ、好ましくは５００～３００００Ｄａである。ポリアルキレングリコールリンカーは、好ましくはポリエチレングリコール（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。

[0080] 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、別の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）に抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能部分を有し、別の一端に抗体を有する。

[0081] 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：

[0082] [化1]



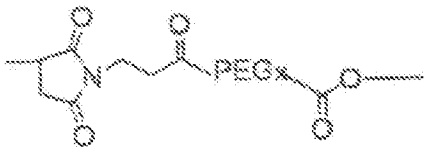
(I)

[0083] 〔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又は血栓溶解機能部分と連結する。

[0084] 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：

[0085] [化2]



(II)

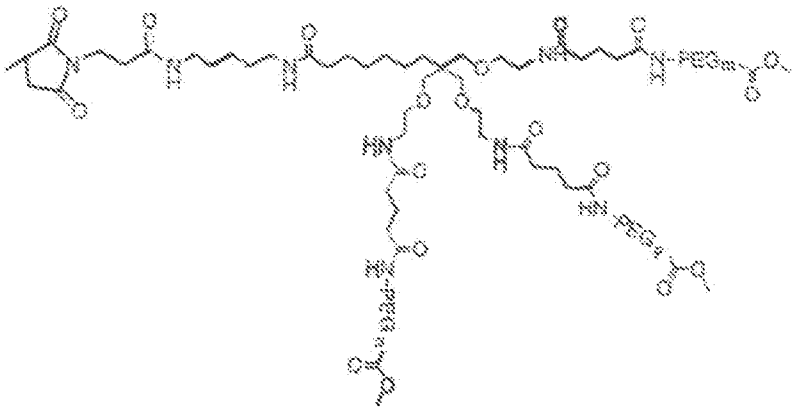
[0086] 〔式中、ＰＥＧはポリエチレングリコール鎖であり、ｘはエチレングリコール単位の数であり、５～１００の整数を表す。〕

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又は血栓溶解機能部分と連結する。

[0087] 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：

[0088]

[化3]



(III)

[0089] 〔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。

[0090] リンカーを介して抗体と抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能部分とを結合する技術は、当技術分野において公知である。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又は血栓溶解機能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ＷＯ２００８／０９６７６０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ＷＳＣＤＩ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ＷＯ２０１０／０５５９５０号を参照されたい。

[0091] 一方、抗体又はリンカーと、抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能部分との結合は、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、当該結合は、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又は血栓溶解機能部分が遊離しにくい結合であることが好ましい。

[0092] 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。

[0093] 例示的に抗腫瘍性部分としてＳＮ－３８（１０－ヒドロキシ－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Ｂｏｃ、Ｆｍｏｃ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ＳＮ－３８とを脱水縮合させ、ＳＮ－３８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。

[0094] 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。

[0095] 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、例えば膵癌、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。

[0096] 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。

[0097] また、本発明の複合体は、血栓部位における不溶性フィブリンに結合して、血栓溶解機能部分を当該部位に送達し、当該部位を溶解させることができる。そのため、本発明の複合体は、腫瘍以外の血栓関連疾患の予防又は治療剤として使用することも可能である。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血栓関連疾患を予防又は治療することができる。

[0098] 本発明において治療又は予防の対象となる腫瘍以外の血栓関連疾患は、限定されるものではなく、上述の通り、各種梗塞が挙げられる。

[0099] 上述した血栓可視化剤、及び血栓関連疾患（腫瘍を含む）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、キサンタンガム、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。

[0100] 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。

[0101] 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で提供される。

[0102] 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。

[0103] 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又は血栓溶解機能部分の種類、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％としうる。

[0104] 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又は血栓溶解機能部分の種類、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。

[0105] 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。

[0106] 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

[0107] 以下、実施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。

[0108] 本発明者らは、フィブリノーゲンγ鎖の第２３２～２４６位のアミノ酸からなる部位を抗原としてマウスに免疫することにより、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取得することに成功している（特許文献８参照のこと）。

[0109] しかしながら、このようにして得られた、フィブリノーゲンγ鎖の前記部位をエピトープとする抗体（以下、「抗γ鎖抗体」とも称する）は、ヒト由来のフィブリノーゲンと結合しないものの、マウス由来のフィブリノーゲンに対しては結合できてしまうことが明らかになった。そのため、抗γ鎖抗体に関し、動物実験を行うことができず、当該抗体の医薬用途開発は困難なものとなった。

[0110] そこで、本発明者は、フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のア

ミノ酸からなる部位をエピトープとする抗体（特許文献７に記載の１０２－１０抗体等）は、マウス由来のフィブリノーゲンとは交差反応を示さないことを鑑み、特許文献８に記載の方法と同様の方法にて、再度フィブリノーゲンＢβ鎖の当該部位を抗原としてマウスに免疫することで、より不溶性フィブリンに対して高い親和性及び特異性を示す抗体の取得を試みた。

[0111] その結果、図には示さないが、このようにして得られた抗体は、従前のフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなる部位をエピトープとする抗体（特許文献８に記載のＦｉｂ－３４３５抗体、Ｆｉｂ－０３５５抗体）と比較して、不溶性フィブリンへの親和性は弱いか又は同等程度である一方で、フィブリノーゲンへの非特異的結合性をある程度示す抗体しか得ることができなかった。

[0112] （実施例１）

本発明者は、以下の通り、１０２－１０抗体よりも不溶性フィブリンに対して高い親和性及び特異性を示す抗体の取得を試み、前記抗原のＣ末端側を４アミノ酸狭めたものを免疫すると、不溶性フィブリンに対して高い親和性及び特異性を示す抗体の取得が可能となることを見出した。

[0113] ＜抗原の調製＞

先ず、フィブリノーゲンβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸からなる部位をコードするＤＮＡが制限酵素サイト（ＸｂａＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ）に挿入されたプラスミドＤＮＡ　ｐＥＴ－２１ａ－ｄ（＋）を調製した。そして、このプラスミドＤＮＡを、大腸菌　ＢＬ２１（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に各々導入した。

[0114] 次に、前記大腸菌をＬＢ培地２００ｍＬに植菌し、３７℃、１００ｒｐｍで培養し、培地のＯ．Ｄ．６００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１ｍＭ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℃、１００ｒｐｍ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、４８，８２０ｇ、１５分

間遠心し、集菌した。

[0115] 集菌した後、５００ｍＭ ＮａＣｌ含有５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）に懸濁し、氷上で超音波破砕した。破砕後、４８，８２０ｇ、６０分間遠心し、上清を回収した。次いで、回収した上清を、５００ｍＭ ＮａＣｌ含有５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）にて平衡化した１ｍＬ 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５ｍＭ イミダゾール及び５００ｍＭ ＮａＣｌ含有５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）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１００ｍＭ 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 １０Ｋ（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。

[0116] ＜抗体の作製＞

フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体は、ラット腸骨リンパ節法（Ｍａｒｉａ．Ｉ．Ｈａｒｅｌｌら、Ｊ ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００８年、３３２（１－２）、１７０～１７４ページ 参照）にて作製した。すなわち、前記にて調製した抗原ペプチドをラットの尾根部筋肉内に注射した。次いで、その２週間後に、腸骨リンパ節（ｉｌｉａｃ ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅ）、腋窩リンパ節（ａｘｉｌｌａｒｙ ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅ）及び鼠径リンパ節（ｉｎｇｕｉｎａｌ ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅ）を摘出した。そして、これらリンパ節のＢ細胞とミエローマとを融合させ、ハイブリドーマを樹立した。次いで、ハイブリドーマの培養上清を、前記抗原ペプチド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、前記抗原ペプチド、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（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法については、後記を参照のこと）、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。そして、このようにして調製したハイブリドーマの培養上清から、プロテインＧを用いて、モノクローナル抗体を精製した。なお、フィブリノーゲンに結合しない等の評価は、コントロール抗体（マウスＩｇＧ１アイソタイプコントロール抗体、Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ社製、クローン名：ＭＯＰＣ－２１）とフィブリノーゲン等との後記ＥＬＩＳＡ法において得られる吸光度を基準として、それとの有意差の有無に基づき行った。なお、有意差はスチューデントｔ検定（Ｎ＝３、Ｐ値＝０．０５を基準）にて解析した。

[0117] （実施例２）

前記にて作製したモノクローナル抗体を、以下に示すＥＬＩＳＡ法による解析に供し、既存の抗β鎖抗体　１０２－１０、Ｆｉｂ６－３４３５及びＦｉｂ６－０３５５と比較した。得られた結果を図１及び２に示す。なお、これらの抗体については、特許文献８を参照のこと。また、Ｆｉｂ６－３４３５及びＦｉｂ６－０３５５は、特許文献８に記載のＦｉｂ－３４３５及びＦｉｂ－０３５５と同じ抗体である。

[0118] ＜ＥＬＩＳＡ法＞

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。

[0119] フィブリンプレートは、０．０５ＮＩＨＵ／ｍＬ　トロンビン（Ｓｉｇｍａ社製）、１ｍＭ　$CaCl_2$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。

[0120] また、ペルオキシダーゼラベリングキットNH_2（ＤＯＪＩＮＤＯ社製）を用い、前記抗体にペルオキシダーゼを標識した。さらに、これら標識した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０．１μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ及び１０μｇ／ｍＬになるよう調製した。

[0121] そして、これらの抗体希釈液を各１００μＬずつ、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H_2SO_4を１００μＬ加えることによって行った。また、吸光度（Ｏ．Ｄ．）は、ＳＰＥＣＴＲＡ ＭＡＸ１９０（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。

[0122] 図１及び２に示した結果から明らかなように、不溶性フィブリンに対する親和性及び特異性において、既存の抗β鎖抗体と比較して同等又は高い抗体を得ることができた。特に、図１において、４４３－２抗体の０．１μｇ／ｍＬと１０２－１２抗体の１０μｇ／ｍＬとが同程度であったことから、４４３－２抗体に至っては、既存の１０２－１２抗体と比較して、１００倍も高い不溶性フィブリンに対する親和性を示すことが明らかになった。

[0123] （実施例３）

ラット腸骨リンパ節法にて作製したフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体３種について、これら抗体がマウス由来のフィブリノーゲンに対しては結合しないということを、以下に示す方法にて確認した。

[0124] ＜ＥＬＩＳＡ法＞

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。

[0125] フィブリンプレートは、０．０５ＮＩＨＵ／ｍＬ トロンビン（Ｓｉｇｍａ社製）、１ｍＭ $CaCl_2$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。

[0126] また、可溶性フィブリン（フィブリンモノマー、積水メディカル社製）、Ｄ－ダイマー（積水メディカル社製）及びＢＳＡ 各１μｇを固相化したＥＬＩＳＡプレートも作製した。

[0127] さらに、ペルオキシダーゼラベリングキットNH_2（ＤＯＪＩＮＤＯ社製）を用い、前記抗体にペルオキシダーゼを標識した。さらに、これら標識した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０．１μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ及び１０μｇ／ｍＬになるよう調製した。

[0128] そして、これらの抗体希釈液を各１００μＬずつ、前記各プレートに添加し、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H_2SO_4を１００μＬ加えることによって行った。また、吸光度（Ｏ．Ｄ．）は、ＳＰＥＣＴＲＡ ＭＡＸ１９０（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。このようにして得られた、前記３種の抗体のフィブリン特異性についての解析結果を、図３に示す。

[0129] 図３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、前記３種の抗体（４４３－２抗体、１５５５－２抗体、１８３１－５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。また、前記３種の抗体は、不溶性フィブリが分解して生じた溶解性フィブリン（ＦＤＰ：フィブリン分解産物）である、可溶性フィブリン及びＤ－ダイマーに対しても、親和性は認め

られなかった。

[0130] このように、フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸からなる部位で免疫して抗体を得ることにより、不溶性フィブリンに対して高い親和性を有し、フィブリノーゲンに対して低い親和性を有する抗体を複数得ることができた。

[0131] なお、従前のフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなるペプチドを免疫した場合には、不溶性フィブリンに対して高い親和性及び特異性を示す抗体（Ｆｉｂ－３４３５抗体又はＦｉｂ－０３５５抗体と同等又はそれ以下の抗体）は、０．０６％にて取得された（３５５２クローンをスクリーニングして２クローンが選抜された）。一方、今回の前記ペプチドのＣ末端側を４アミノ酸狭めたもので免疫した場合には、その取得効率は約２．５倍に向上した（３２１１２クローンをスクリーニングして３クローンが選抜された。取得効率：０．１４％）。結果、フィブリノーゲンとは交差反応を示さず且つ不溶性フィブリンに対して高い親和性及び特異性を示す抗体（Ｆｉｂ－３４３５抗体又はＦｉｂ－０３５５抗体と同等又はそれ以上の抗体）は、フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４２位からなるペプチドを抗原として用いて免疫することにより、効率よく得られることが明らかになった。

[0132] （実施例４）

次に、以下に示す方法にて、前記抗体３種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。

[0133] ＜ヒトフィブリン切片蛍光免疫染色＞

フィブリノーゲン１０ｍｇ、０．０２Ｍ $CaCl_2$、２．５ＮＩＨＵ／ｍＬ トロンビン及び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。

[0134] そして、このようにして調製したフィブリンクロットを、ＯＣＴｃｏｍｐｏｕｎｄを用いて凍結し、６μｍ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　Ｆｏｌｕｒ　６４７タンパク質ラベリングキット（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）で標識した前記３種の抗体を、１μｇ／ｍＬ、５μｇ／ｍＬ及び１０μｇ／ｍＬにて添加し、１時間インキュベートした後、Ｆｌｕｏｒｏｍｏｕｎｔ　Ｇ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃ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４～７に示す。

[0135] 図４～７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、前記３種の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。

[0136] （実施例５）

次に、前記３種の抗体及び１０２－１０抗体の抗原結合度を、表面プラズモン共鳴解析装置Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）を用い、以下に示す方法にて測定した。

[0137] すなわち、先ず、カルボキシメチルデキストランコート処理が施されたセンサーチップＣＭ５上にアミンカップリング法を用いて、フィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４６位のアミノ酸からなるペプチドを固定化し、固定化量７９．１ＲＵであるリガンド固定化セルを作製した。また、当該ペプチドの代わりに、ＧＳＴタグペプチドのみを固定化したリファレンスセル（固定化量：７７．０ＲＵ）も用意した。

[0138] そして、２５℃、３０μＬ／ｍｉｎの流速の条件下、ＨＢＳ－Ｎバッファー（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）を流路に満たした。次いで、ＨＢＳ－Ｎバッファーにて、前記３種の抗体及び１０２－１０抗体を、４６ｎＭ、９３ｎＭ、１８７ｎＭ、３７５ｎＭ、７５０ｎＭ及び１５００ｎＭになるよう調整し、これら抗体溶液を各々、前記リガンド固定化セル及びリファレンスセルに１２０秒間流し、結合反応を観察した。さらに、ＨＢＳ－Ｎバッファーを１８０秒間流して解離反応を観察した。

[0139] そして、このようにして得られたセンサーグラムをもとにＢｉａｃｏｒｅ

Ｔ２００評価用ソフトウェアを用いて解析を行い、解離定数ＫＤ値を算出した。得られた結果を表１に示す。

[0140] [表1]

抗フィブリン抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
102-10	44562	0.001882	4.22×10^{-8}
443-2	21577	0.000117	5.42×10^{-9}
155-2	17261	0.000106	6.18×10^{-9}
1831-5	16874	0.000417	2.47×10^{-8}

[0141] 表１に示した結果から明らかなように、従前の１０２－１０抗体と比較して、前記３種の抗体はいずれも、低い解離定数を示した。特に、４４３－２抗体及び１５５５－２抗体に至っては、10^{-9}オーダーという、抗原に対して極めて高い親和性を有していることも明らかになった。

[0142] （実施例６）

浸潤がんでは、周囲の血管の破壊、出血、凝固によって不溶性フィブリンが形成される。そして、コラーゲンによる置換が、がんが存在する限り繰り返し起こり続け、これらが、腫瘍間質の形成に寄与すると考えられている。

[0143] そこで、不溶性フィブリンに対して高い親和性を示す前記３種の抗体を、担がんマウスに投与することによって、これら抗体が各々腫瘍間質特異的に集積できるかどうかを、以下に示す方法にて解析した。

[0144] ＜動物モデル＞

ヒト腫瘍に類似した間質形成をもつマウスとして、化学発癌モデルを調製した。すなわち、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。

[0145] そして、このようにして調製した化学発癌モデルマウスに、前記Ａｌｅｘａ　Ｆｏｌｕｒ　６４７にて標識した抗体３種を、尾静脈から１ｍｇ／ｍＬ抗体溶液を１００μＬ投与した。当該投与７日後に腫瘍を摘出し、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℃で包埋した。２０μｍ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、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８～１１に示す。

[0146] 図８～１１に示した結果から明らかなように、化学発がんモデルにおいて、いずれの抗体も、フィブリン陽性腫瘍間質部に特異的に集積していること

が明らかになった。

[0147] 以上の通り、ラット腸骨リンパ節法にて作製したフィブリノーゲンＢβ鎖の第２３１～２４２位のアミノ酸からなる部位に結合する抗体３種（４４３－２抗体、１５５５－２抗体及び１８３１－５抗体）が、インビトロ及びインビボにおいて不溶性フィブリン（血栓）を特異性高く検出することができる。また、これら抗体は血栓部位への高い集積性も発揮するため、腫瘍等の血栓関連疾患における当該部位への薬剤送達も可能となる。

[0148] （実施例７）

前記３種の抗体　４４３－２抗体、１５５５－２抗体及び１８３１－５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。

[0149] 先ず、各抗体を産生するハイブリドーマより、ＲＮＡ　ｉｓｏ　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、ＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ増幅キット（ＴＡＫＡＲＡ社製）及び下記プライマーを用い、５’－ＲＡＣＥ法により、各抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするｃＤＮＡを取得した。

（重鎖可変領域クローニング用）

フォワードプライマー：ＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＣＡＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧＴ（配列番号：４０）

フォワードプライマー：ＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＣ（配列番号：４１）

リバースプライマー：ＴＣＴＡＣＣＡＣＡＡＣＡＣＡＣＧＴＧＡＣＣＴＴＡＧＧＡＧ（配列番号：４２）

（軽鎖可変領域クローニング用）

フォワードプライマー：ＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＣＡＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧＴ（配列番号：４０）

フォワードプライマー：ＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＣ（

配列番号：４１）

リバースプライマー：ＡＴＧＣＴＧＴＡＣＧＴＧＣＴＧＴＣＴＴＴＧＣＴＧＴＣＣ（配列番号：４３）。

[0150] 次に、得られたｃＤＮＡをｐＴＡ２ベクター（東洋紡績株式会社製）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。そして、抗体可変部領域を含む複数のクローンについて、シークエンシング解析を行い、目的の抗体可変領域の候補配列を取得した。

[0151] 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（ＩＭＧＴ：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１２～１４に示す。

[0152] また、このようにして同定された４４３－２抗体、１５５５－２抗体及び１８３１－５抗体の可変領域及びＣＤＲのアミノ酸配列等を、以下に示す配列番号にて配列表においても示す。

４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖（軽鎖）可変領域をコードする塩基配列：配列番号：２

４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：３

４４３－２抗体のＬ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：４

４４３－２抗体のＬ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列：配列番号：５～７

４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖（重鎖）可変領域をコードする塩基配列：配列番号：８

４４３－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：９

４４３－２抗体のＨ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：１０

４４３－２抗体のＨ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列：配列番号：１１～１３

１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖（軽鎖）可変領域をコードする塩基配列：配列番号：１４

１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：１５

１５５５－２抗体のＬ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：１６

１５５５－２抗体のＬ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列：配列番号：１７～１９

１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖（重鎖）可変領域をコードする塩基配列：配列番号：２０

１５５５－２抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：２１

１５５５－２抗体のＨ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：２２

１５５５－２抗体のＨ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列：配列番号：２３～２５

１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖（軽鎖）可変領域をコードする塩基配列：配列番号：２６

１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：２７

１８３１－５抗体のＬ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：２８

１８３１－５抗体のＬ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列：配列番号：２９～３１

１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖（重鎖）可変領域をコードする塩基配列：配列番号：３２

１８３１－５抗体のシグナルペプチド及びＨ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：３３

１８３１－５抗体のＨ鎖可変領域のアミノ酸配列：配列番号：３４

１８３１－５抗体のＨ鎖ＣＤＲ１～３のアミノ酸配列：配列番号：３５～３７。

産業上の利用可能性

[0153] 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。

配列表フリーテキスト

[0154] 配列番号：２

＜２２３＞ シグナルペプチド及び軽鎖可変領域（４４３－２）

配列番号：４

＜２２３＞ 軽鎖可変領域（４４３－２）

配列番号：５

＜２２３＞ 軽鎖ＣＤＲ１（４４３－２）

配列番号：６

＜２２３＞ 軽鎖ＣＤＲ２（４４３－２）

配列番号：７

＜２２３＞ 軽鎖ＣＤＲ３（４４３－２）

配列番号：８

＜２２３＞ シグナルペプチド及び重鎖可変領域（４４３－２）

配列番号：１０

＜２２３＞ 重鎖可変領域（４４３－２）

配列番号：１１

＜２２３＞ 重鎖ＣＤＲ１（４４３－２）

配列番号：１２

＜２２３＞ 重鎖ＣＤＲ２（４４３－２）

配列番号：１３

＜２２３＞　重鎖ＣＤＲ３（４４３－２）

配列番号：１４

＜２２３＞　シグナルペプチド及び軽鎖可変領域（１５５５－２）

配列番号：１６

＜２２３＞　軽鎖可変領域（１５５５－２）

配列番号：１７

＜２２３＞　軽鎖ＣＤＲ１（１５５５－２）

配列番号：１８

＜２２３＞　軽鎖ＣＤＲ２（１５５５－２）

配列番号：１９

＜２２３＞　軽鎖ＣＤＲ３（１５５５－２）

配列番号：２０

＜２２３＞　シグナルペプチド及び重鎖可変領域（１５５５－２）

配列番号：２２

＜２２３＞　重鎖可変領域（１５５５－２）

配列番号：２３

＜２２３＞　重鎖ＣＤＲ１（１５５５－２）

配列番号：２４

＜２２３＞　重鎖ＣＤＲ２（１５５５－２）

配列番号：２５

＜２２３＞　重鎖ＣＤＲ３（１５５５－２）

配列番号：２６

＜２２３＞　シグナルペプチド及び軽鎖可変領域（１８３１－５）

配列番号：２８

＜２２３＞　軽鎖可変領域（１８３１－５）

配列番号：２９

＜２２３＞　軽鎖ＣＤＲ１（１８３１－５）

配列番号：３０

＜２２３＞　軽鎖ＣＤＲ２（１８３１－５）

配列番号：３１

＜２２３＞　軽鎖ＣＤＲ３（１８３１－５）

配列番号：３２

＜２２３＞　シグナルペプチド及び重鎖可変領域（１８３１－５）

配列番号：３４

＜２２３＞　重鎖可変領域（１８３１－５）

配列番号：３５

＜２２３＞　重鎖ＣＤＲ１（１８３１－５）

配列番号：３６

＜２２３＞　重鎖ＣＤＲ２（１８３１－５）

配列番号：３７

＜２２３＞　重鎖ＣＤＲ３（１８３１－５）

配列番号：４０～４３

＜２２３＞　人工的に合成されたプライマーの配列

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に示される部位に結合する抗体であり、下記（ｉ）～（iii）のうちのいずれか一に記載の特徴を有する抗体

（ｉ） 配列番号：５～７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：１１～１３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

（ii） 配列番号：１７～１９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：２３～２５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

（iii） 配列番号：２９～３１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：３５～３７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2] 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、フィブリノーゲンの配列番号：１に示される部位に結合する抗体であり、下記（ｉ）～（iii）のうちのいずれか一に記載の特徴を有する抗体

（ｉ） 配列番号：４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：１０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

（ii） 配列番号：１６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：２２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

（iii） 配列番号：２８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：３４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3] 請求項１又は２に記載の抗体と、抗腫瘍性部分又は血栓溶解機能部分とを含む、複合体。

[請求項4] 請求項１又は２に記載の抗体を含む、免疫学的測定用試薬。

[請求項5] 請求項１又は２に記載の抗体を含む、血栓関連疾患の判定用試薬。

[請求項6] 請求項１又は２に記載の抗体を含む、血栓可視化剤。

[請求項7] （ａ）請求項１又は２に記載の抗体とサンプルとを接触させるステップと、

（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と

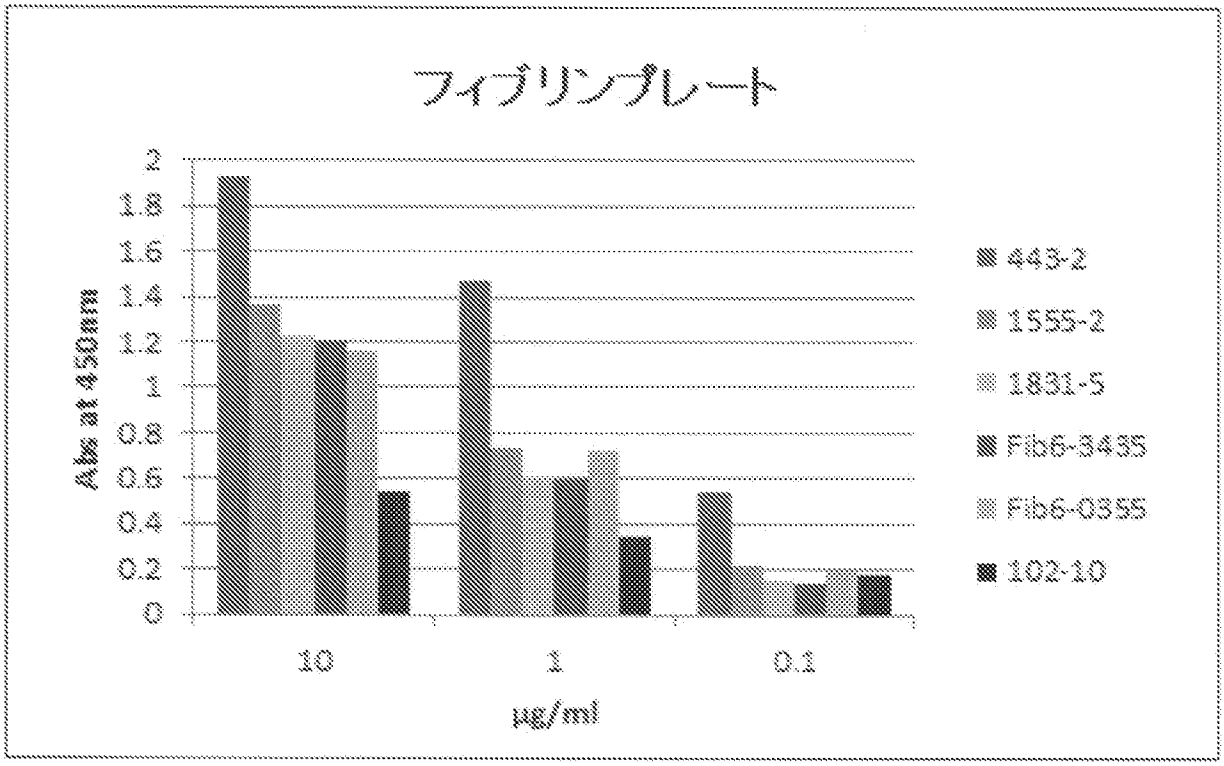
を含む、サンプル中の不溶性フィブリンを検出するための方法。

[請求項8] （ａ）請求項１又は２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と、

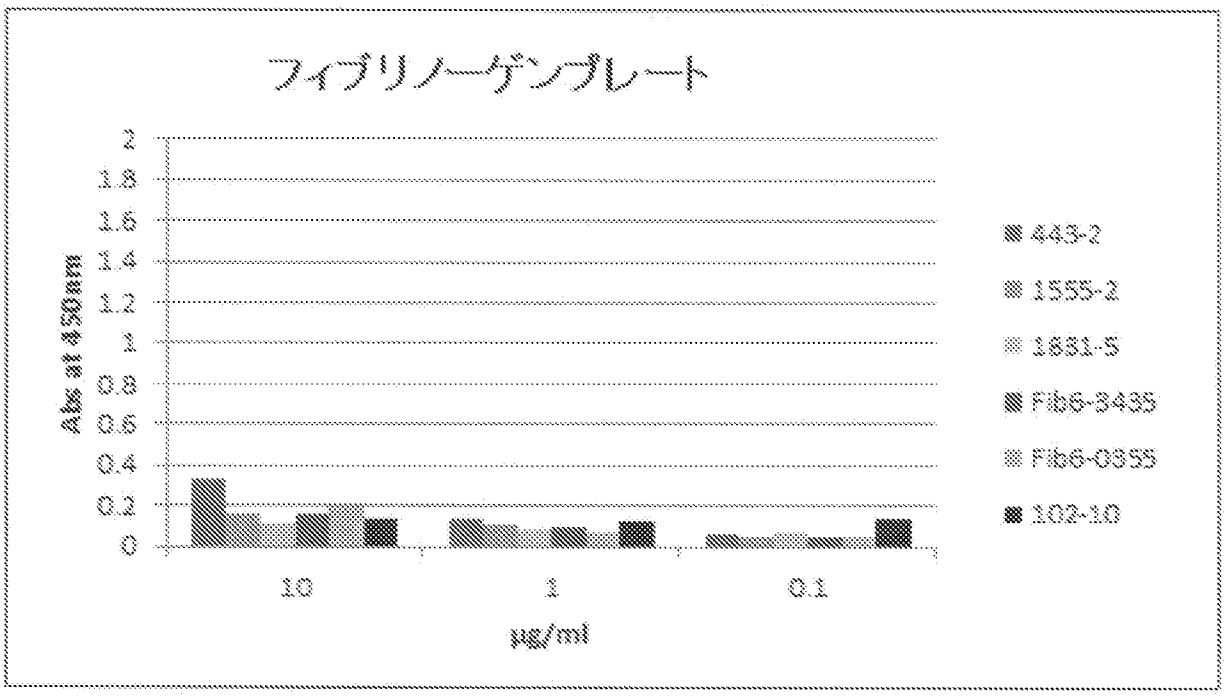
（ｂ）該抗体がサンプル中の不溶性フィブリンと結合したか否かを検出するステップと

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。

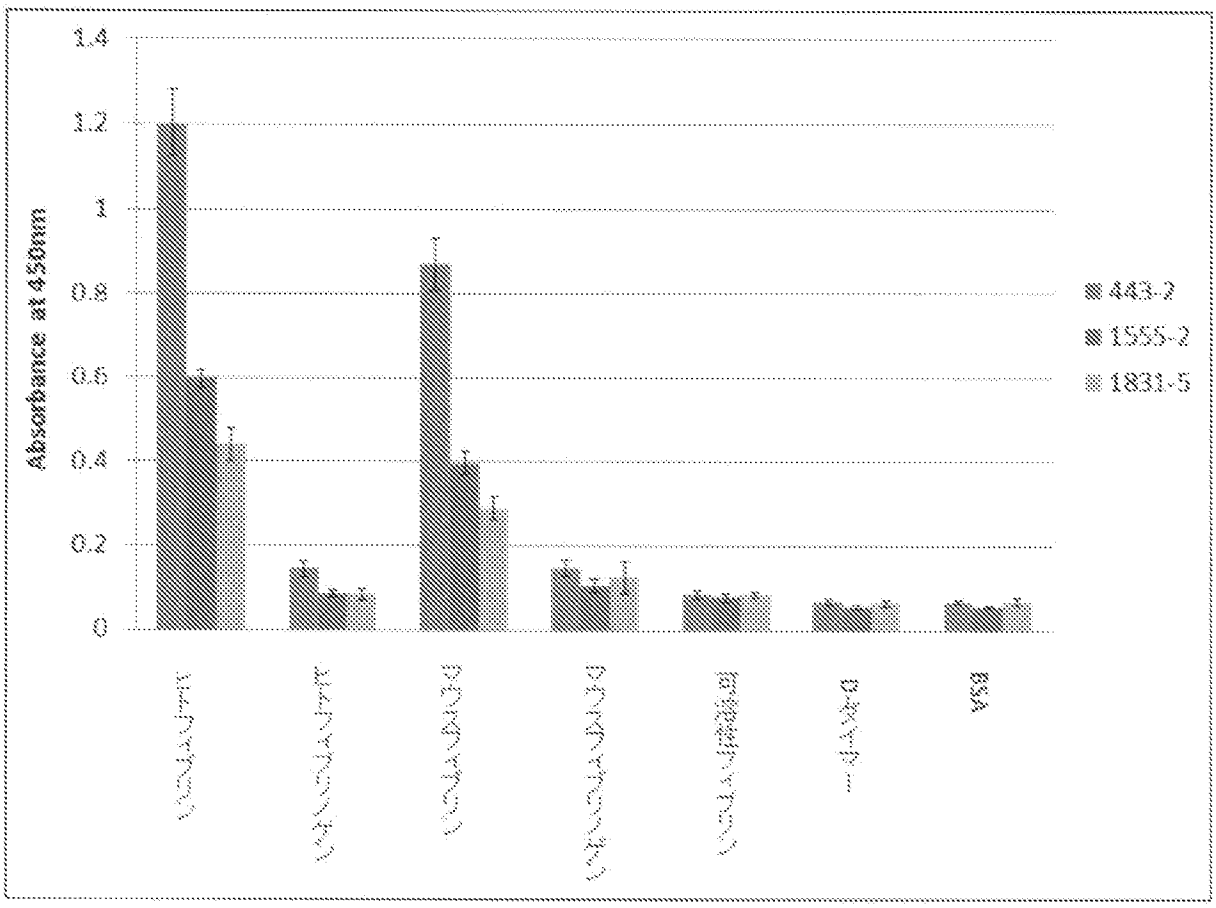
[図1]


フィブリンプレート
Abs at 450nm
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
1
0.1
μg/ml
443-2
1555-2
1831-5
Fib6-3435
Fib6-0355
102-10

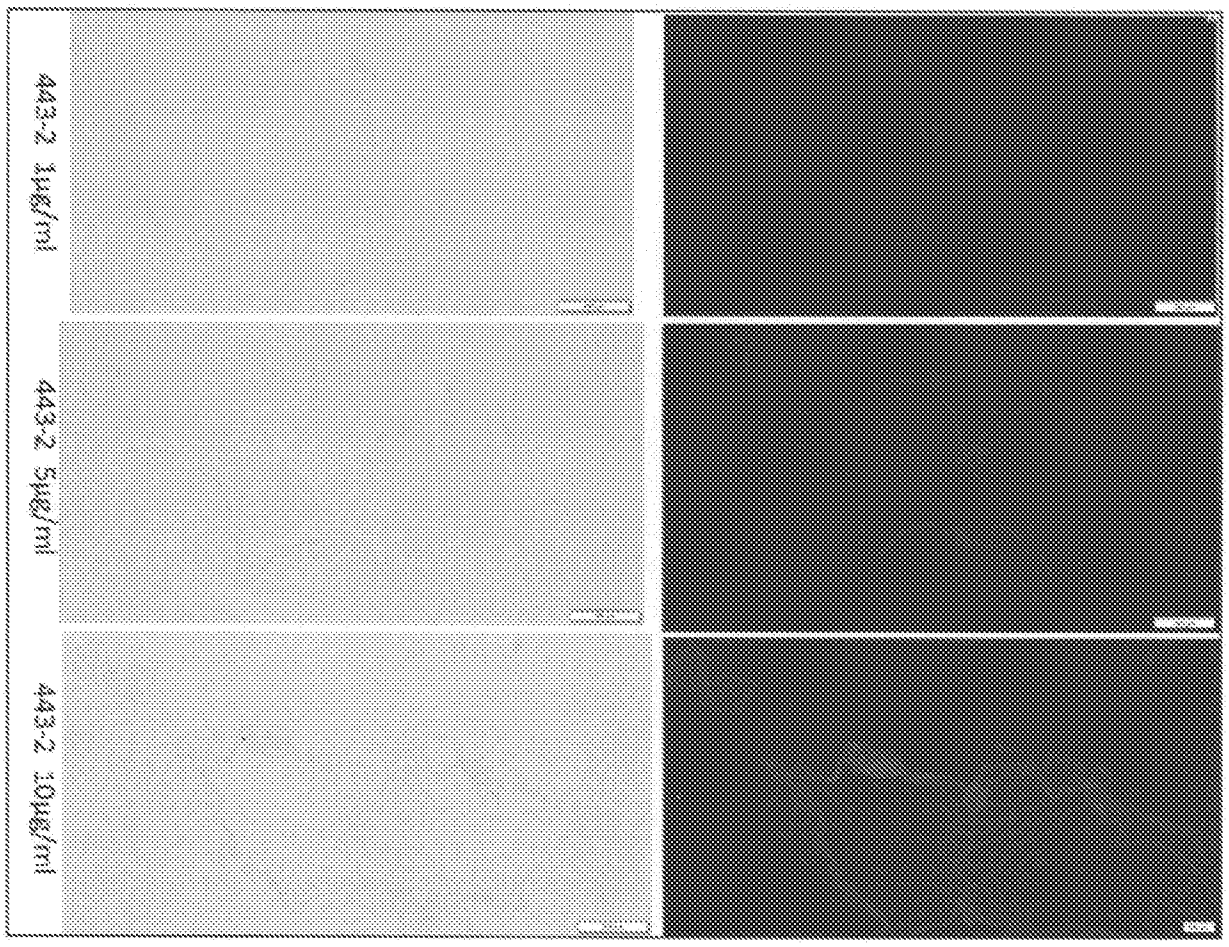
[図2]


フィブリノーゲンプレート
Abs at 450nm
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
1
0.1
μg/ml
443-2
1555-2
1831-5
Fib6-3435
Fib6-0355
102-10

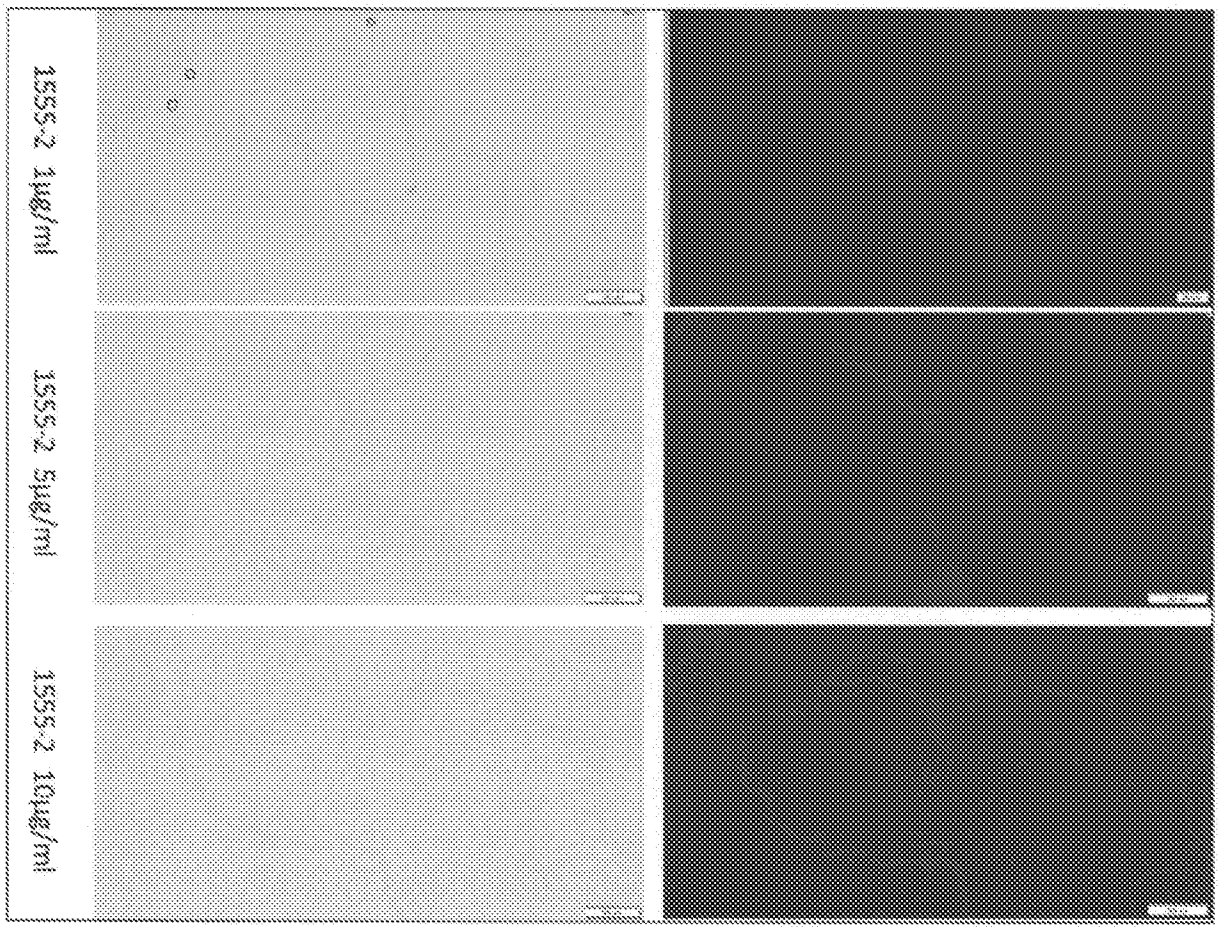
[図3]


Absorbance at 450nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
443-2
1555-2
1831-5
BSA

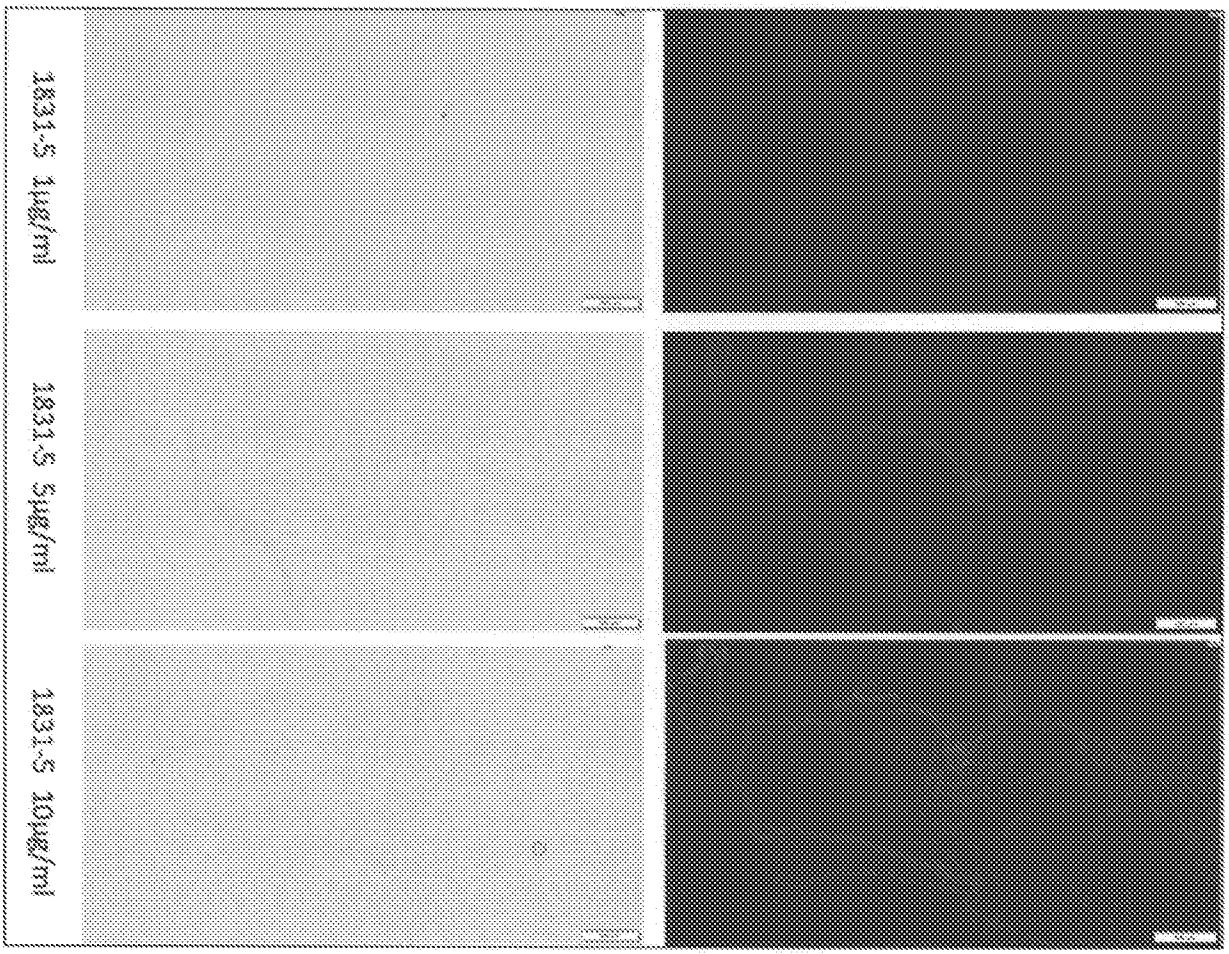
[図4]


443-2 1ug/ml
443-2 5ug/ml
443-2 10ug/ml

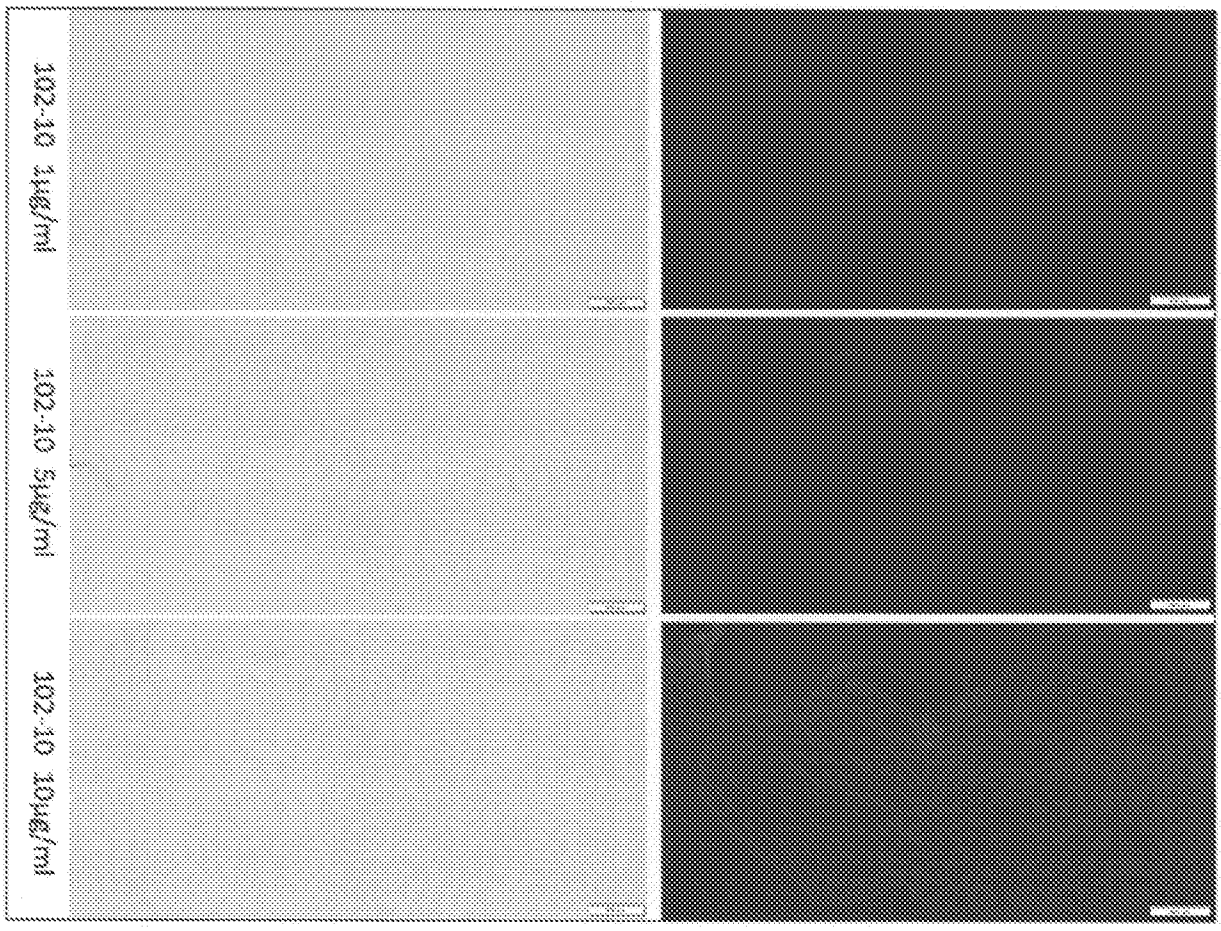
[図5]



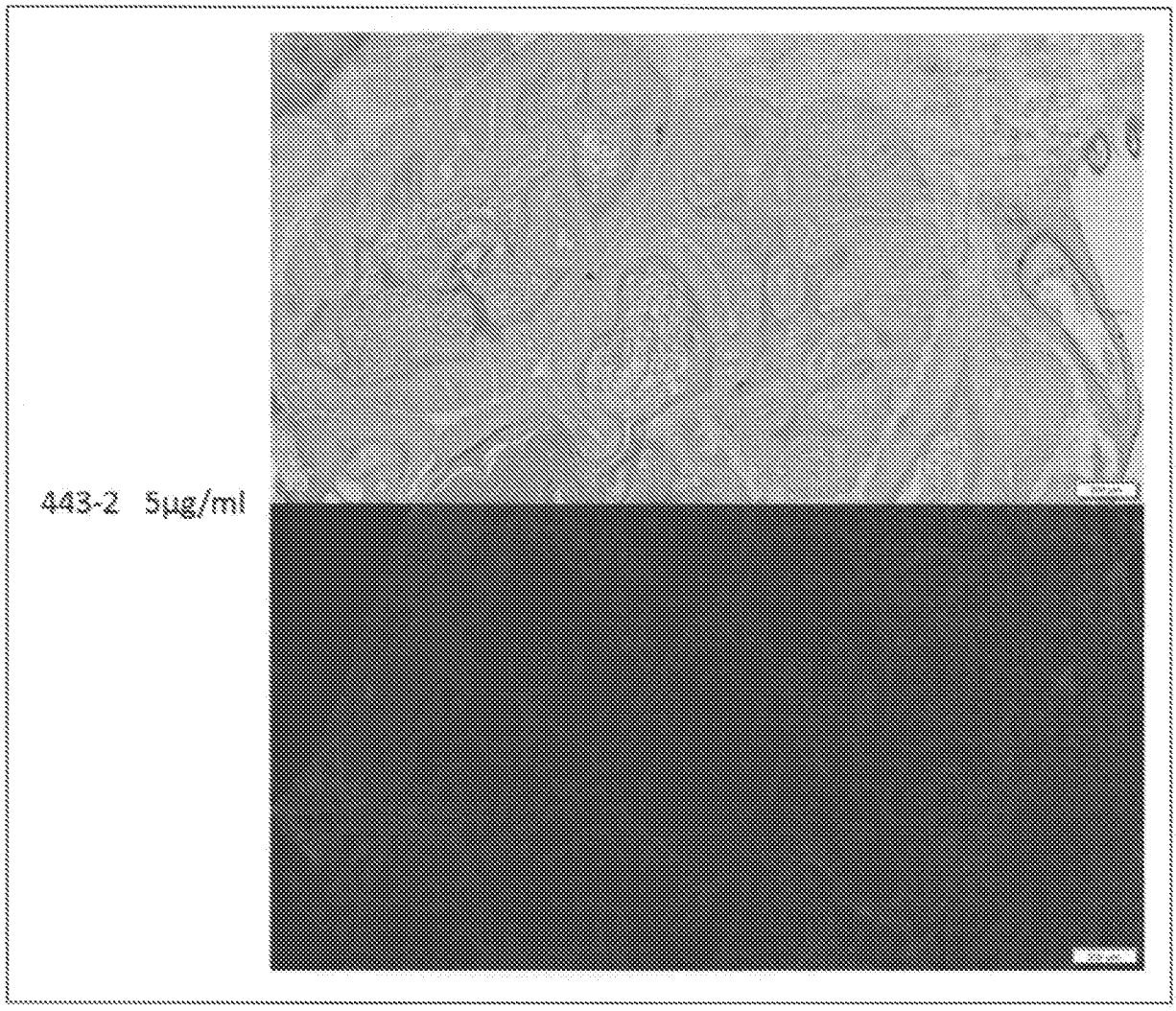
[図6]



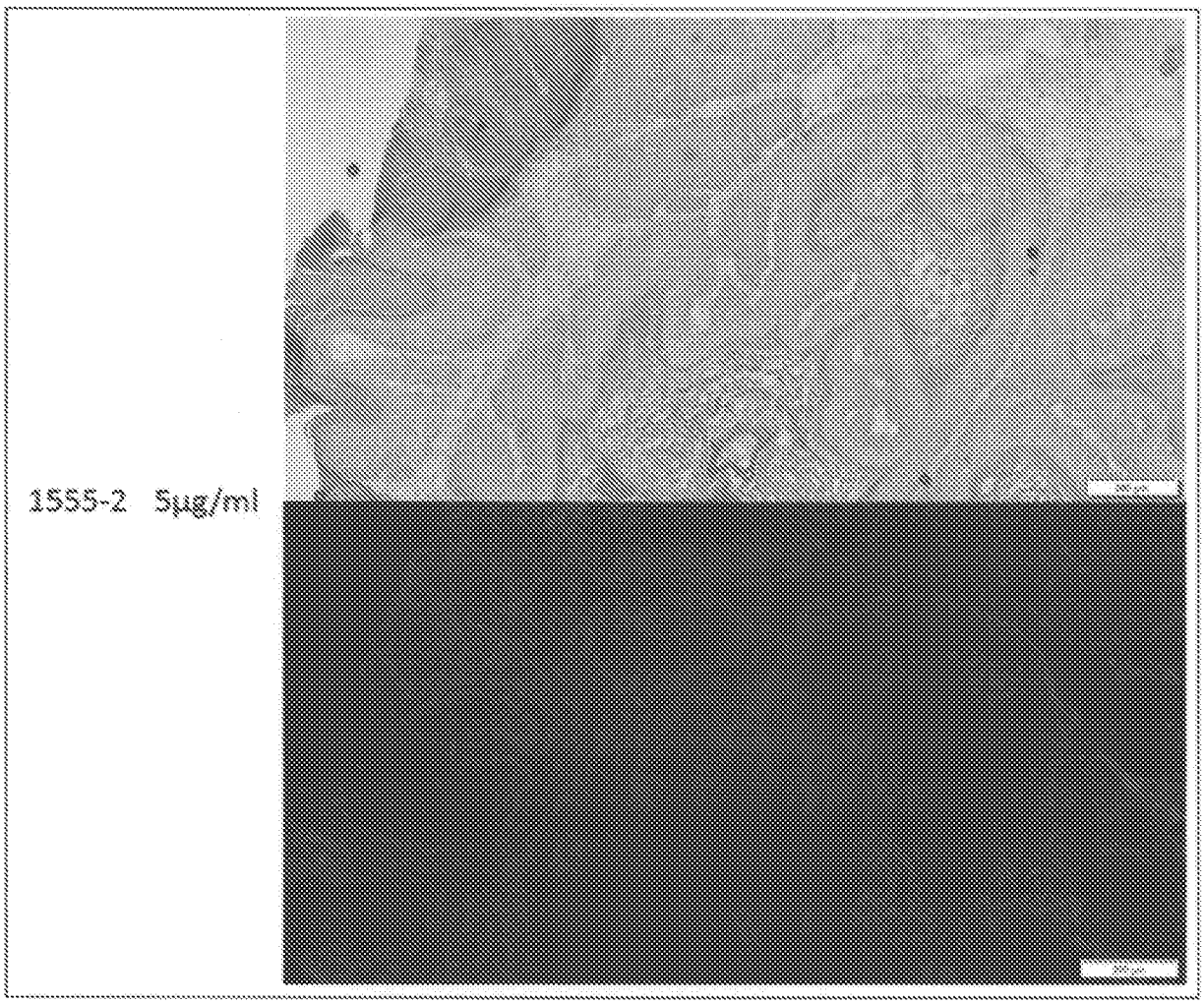
[図7]



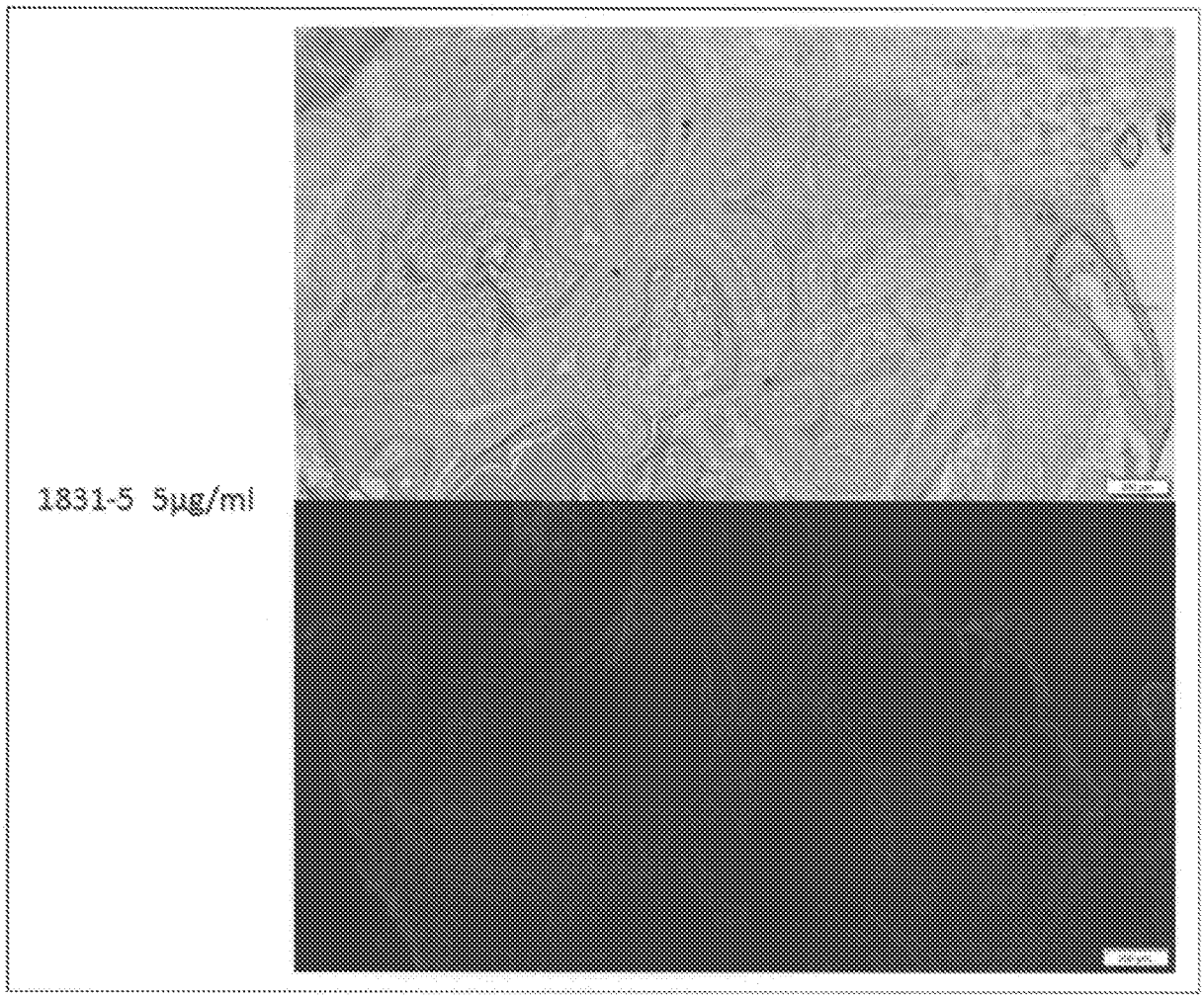
[図8]



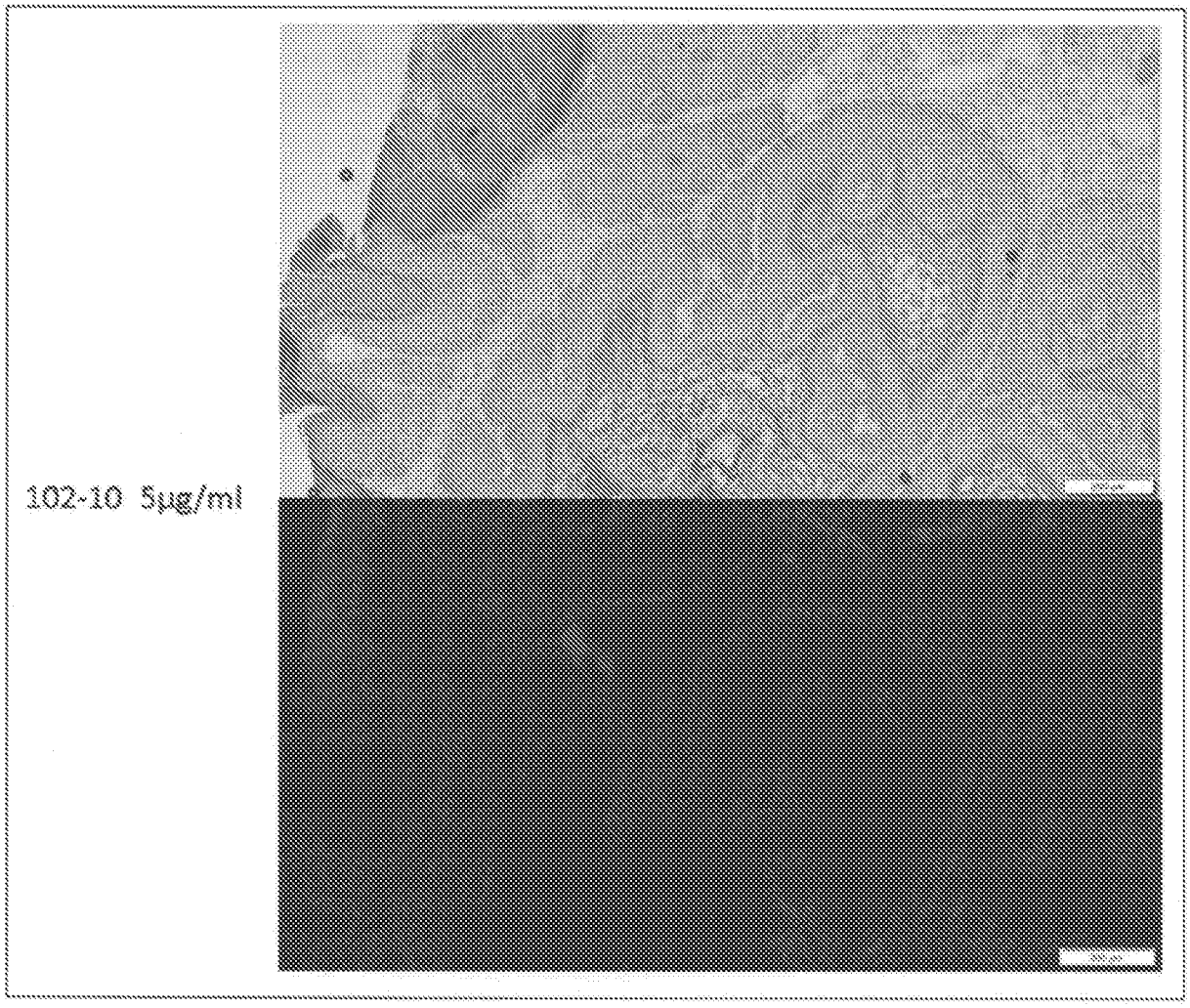
[図9]



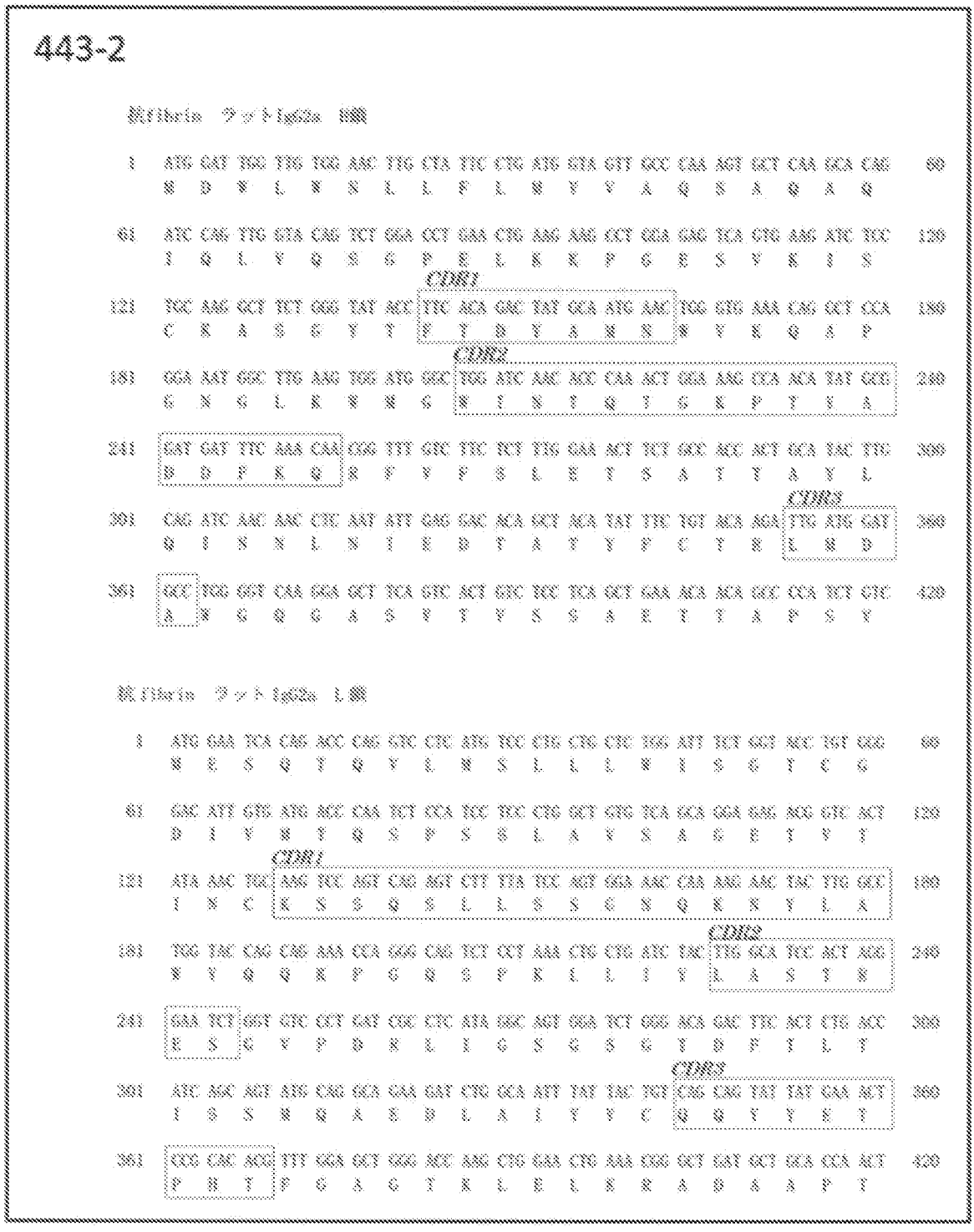
[図10]



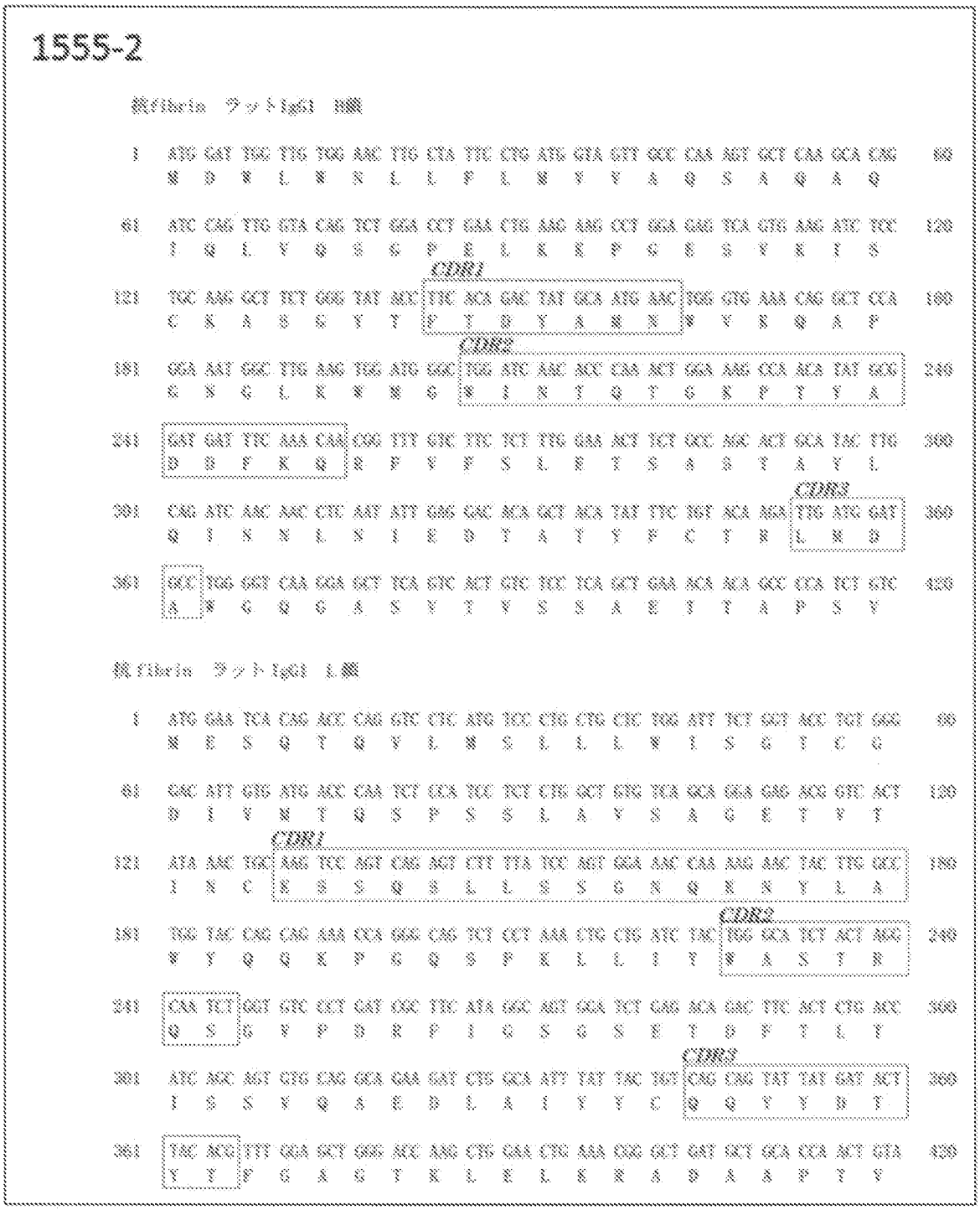
[図11]



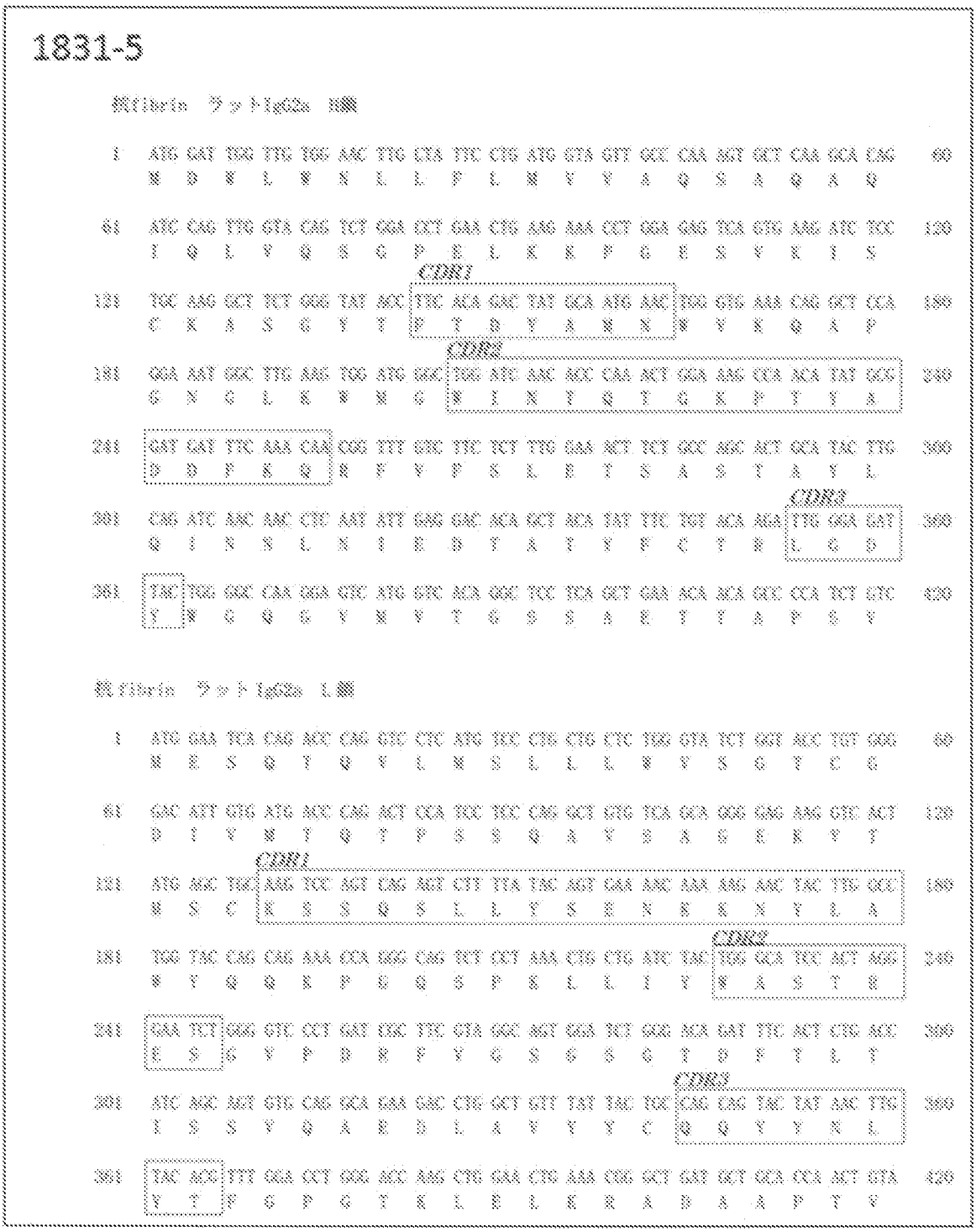
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/061727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/36(2006.01)i, *C12N15/09*(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)
C07K16/00-19/00, C12N15/00-15/90

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 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN), 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	WO 2014/133093 A1 (National Cancer Center), 04 September 2014 (04.09.2014), abstract; claims 1 to 11; examples & US 2016/0011217 A1 abstract; claims 1 to 11; examples & EP 2963059 A1	1-8
A	JP 2012-72 A (Japan Health Sciences Foundation), 05 January 2012 (05.01.2012), abstract; examples & WO 2011/158973 A	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
28 June 2016 (28.06.16)	12 July 2016 (12.07.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６１７２７

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, C12N15/09(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.　C07K16/00-19/00, C12N15/00-15/90

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

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１６年

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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), 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	WO 2014/133093 A1 (独立行政法人国立がん研究センター) 2014.09.04, 要約、請求項１－１１、実施例 & US 2016/0011217 A1, 要約、請求項１－１１、実施例 & EP 2963059 A1	１－８
A	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, 要約、実施例 & WO 2011/158973 A	１－８

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　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	国際調査報告の発送日
２８．０６．２０１６	１２．０７．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　５０８２
竹内　祐樹
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８