

明 細 書

発明の名称：

フィブリンクロットを溶解させることに適した融合タンパク質および当該融合タンパク質を含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、フィブリンクロットを溶解させることに適した融合タンパク質および当該融合タンパク質を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 血栓症の治療法開発の分野において、血管内に形成された血栓を溶解させる薬物を患者に投与する治療法が開発がなされている。形成された血栓は、プラスミンによりフィブリン分解物に分解することができる。血栓溶解薬は、プラスミノーゲンをプラスミンに変換することによって、血栓の溶解を促進させる。

[0003] 血栓溶解薬としては、組織型プラスミノーゲンアクチベータ（ $t-PA$ ）とウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータ（ $u-PA$ ）が挙げられる。 $t-PA$ によるプラスミノーゲンの活性化（すなわち、プラスミノーゲンからプラスミンの産生促進）は、フィブリン存在下で大きく亢進する。一方で、 $u-PA$ はフィブリンへの結合特異性が低く、投与によって全身性の線溶亢進のため出血性合併症のリスクが懸念されており、血栓症の治療には、 $u-PA$ よりも $t-PA$ が好ましく用いられる。

[0004] フィブリンに対してフィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体が開発されている（特許文献1および2）。これらの特許文献では、当該抗体をがんの治療に用いることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2014/133093

特許文献2：WO2018/203517

発明の概要

[0006] 本発明は、フィブリンクロットを溶解させることに適した融合タンパク質および当該融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。

[0007] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

[1] 不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片と、プロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質であり、

プロウロキナーゼ変異体は、クリングルドメインと触媒ドメインを有し、クリングルドメイン中のプラスミン切断部位のアミノ酸配列が改変され、当該切断部位がプラスミンによる切断に対してより抵抗性であるように改変された変異体（例えば、プラスミンによる切断に抵抗性であるプラスミン切断部位が破壊された変異体）である、融合タンパク質。

[2] プロウロキナーゼ変異体が、EGF様ドメインをさらに有する、上記[1]に記載の融合タンパク質。

[3] プロウロキナーゼ変異体が、配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記[1]または[2]に記載の融合タンパク質。

[4] 不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号17または18に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合し、かつ、不溶性フィブリンに結合する、上記[1]～[3]のいずれかに記載の融合タンパク質。

[5] 不溶性フィブリン抗体またはその抗原結合性断片が、

配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1と配列番号12に記載のアミ

ノ酸配列を有する重鎖CDR2と配列番号13に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と、

配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1と配列番号15に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2と配列番号16に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域と

を含む、上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の融合タンパク質。

〔６〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

〔７〕フィブリンクロットを溶解させることに用いるための、上記〔６〕に記載の医薬組成物。

〔８〕血栓溶解剤または繊維素溶解酵素剤である、上記〔６〕または〔７〕に記載の医薬組成物。

〔９〕脳血管障害および心筋梗塞から選択される疾患を処置することに用いるための、上記〔６〕～〔８〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[0008] (１) 不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片の重鎖と、プロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質であり、

プロウロキナーゼ変異体は、クリングルドメインと触媒ドメインを有し、クリングルドメイン中のプラスミン切断部位のアミノ酸配列が改変され、当該切断部位がプラスミンによる切断に対してより抵抗性であるように改変された変異体（例えば、プラスミンによる切断に抵抗性であるプラスミン切断部位が破壊された変異体）である、融合タンパク質。

(２) プロウロキナーゼ変異体が、EGF様ドメインをさらに有する、上記(１)に記載の融合タンパク質。

(３) プロウロキナーゼ変異体が、配列番号２に記載のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記(１)または(２)に記載の融合タンパク質。

(４) 不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号１７または１８に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合し、かつ、不溶性フィブリンに結合する、上記(１)～(３)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(５) 不溶性フィブリン抗体またはその抗原結合性断片が、

配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR１と配列番号１２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR２と配列番号１３に記載のアミノ

酸配列を有する重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と、

配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1と配列番号15に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2と配列番号16に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、上記(1)～(4)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(6) 上記(1)～(5)のいずれかに記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

(7) フィブリンクロットを溶解させることに用いるための、上記(6)に記載の医薬組成物。

(8) 血栓溶解剤または繊維素溶解酵素剤である、上記(6)または(7)に記載の医薬組成物。

(9) 脳血管障害および心筋梗塞から選択される疾患を処置することに用いるための、上記(6)～(8)のいずれかに記載の医薬組成物。

[0009] (1A) 不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片と、プロウロキナーゼの触媒ドメインを含み、前記抗体またはその抗原結合性断片と前記プロウロキナーゼの触媒ドメインとが直接的にまたはリンカーを介して連結している、融合タンパク質。

(2A) リンカーが、非開裂性のリンカーである、上記(1A)に記載の融合タンパク質。

(3A) リンカーが、ペプチドリンカーである、上記(1A)または(2A)に記載の融合タンパク質。

(4A) 融合タンパク質が、クリングルドメインをさらに含み、クリングルドメインおよび触媒ドメインがこの順番で連結している、上記(1A)～(3A)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(5A) クリングルドメイン中のプラスミン切断部位のアミノ酸配列が改変され、当該切断部位がプラスミンによる切断に対してより抵抗性であるように改変されている、上記(1A)～(4A)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(6 A) EGF様ドメインをさらに含み、EGF様ドメイン、
クリングドメインおよび触媒ドメインがこの順番で連結している、上記(4 A)または(5 A)に記載の融合タンパク質。

(7 A) プロウロキナーゼ変異体が、配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記(1 A)～(6 A)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(8 A) 不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号17または18に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合し、かつ、不溶性フィブリンに結合する、上記(1 A)～(7 A)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(9 A) 不溶性フィブリン抗体またはその抗原結合性断片が、
配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1と配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2と配列番号13に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と、

配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1と配列番号15に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2と配列番号16に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域と
を含む、上記(1 A)～(8 A)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(10 A) 上記(1 A)～(9 A)のいずれかに記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

(11 A) フィブリンクロットを溶解させることに用いるための、上記(10 A)に記載の医薬組成物。

(12 A) 血栓溶解剤または繊維素溶解酵素剤である、上記(10 A)または(11 A)に記載の医薬組成物。

(13 A) 脳血管障害および心筋梗塞から選択される疾患を処置することに用いるための、上記(10 A)～(12 A)のいずれかに記載の医薬組成物。

図面の簡単な説明

[0010] [図1A]図1 Aは、本発明の融合タンパク質の一例について説明する図である。図1 Aで示されるプロウロキナーゼ変異体において、抗フィブリン抗体のF a b領域とプロウロキナーゼ変異体とがリンカーペプチドを介して連結されている。図1 Aで示されるプロウロキナーゼ変異体部分のアミノ酸配列は、配列番号2で示されている。図1 Aで示されるプロウロキナーゼ変異体は、その135番目および136番目のアミノ酸が改変されており、当該アミノ酸の間での切断が抑制されている。図1 Aで示されるプロウロキナーゼ変異体は、L y s 1 5 8 - I l e 1 5 9間を切断せずに投与することが好ましいが、図中では、活性型フォームが示されている（すなわち、L y s 1 5 8 - I l e 1 5 9間で切断されており、148番目のシステインと279番目のシステイン間でジスルフィド結合により架橋されている）。図1 Aの融合タンパク質は、実施例では、当該抗フィブリン抗体の軽鎖との複合体形態で用いられた。

[図1B]図1 Bは、実施例で精製された、融合タンパク質AMU1114の非還元環境下（左パネル）および還元環境下（右パネル）における電気泳動の結果を示す。非還元環境下では、抗体の重鎖と軽鎖とを連結するジスルフィド結合が開裂せず、AMU1114が複合体として検出される。また、還元環境下では、抗体の重鎖と軽鎖とを連結するジスルフィド結合が開裂し、AMU1114の重鎖（融合タンパク質）と軽鎖がそれぞれ検出される。

[図2]図2は、インビトロにおけるフィブリンゲルの溶解試験の結果を示す。アクチバシン、ウロナーゼ、AMU1114のそれぞれが、規定された濃度で試験され、溶液中に溶解したフィブリンの蛍光強度によって、フィブリンゲルの溶解性が検出された。

[図3]図3は、表示された薬剤それぞれを投与した後の血中プラスミノーゲン量を測定した結果を示す。血中プラスミノーゲン量の減少から、血中でプラスミノーゲンからプラスミンへの変換への変換の度合いを推定することができる。

[図4]図4は、ローズベンガル投与後の照射による血栓形成マウスモデルにお

いて、照射開始後（形成開始後）60分間における血管の開通時間をモニターした結果を示す。0分で照射を開始し、照射開始5分後にPBS（陰性対照）、AMU1114、またはアクチバシンを投与し、照射開始30分後に照射停止、照射開始60分後まで血管が開通しているか否かを観察した。

[図5A]図5Aは、ローズベンガル投与後の照射による血栓形成マウスモデルにおいて、照射開始後（形成開始後）60分間における血管の開通時間をモニターした結果を示す。10匹のマウスそれぞれの結果が示されている。0分で照射を開始し、照射開始5分後にPBS（陰性対照）を投与し、照射開始30分後に照射停止、照射開始60分後まで血管が開通しているか否かを観察した。

[図5B]図5Bは、ローズベンガル投与後の照射による血栓形成マウスモデルにおいて、照射開始後（形成開始後）60分間における血管の開通時間をモニターした結果を示す。10匹のマウスそれぞれの結果が示されている。0分で照射を開始し、照射開始5分後にAMU1114を投与し、照射開始30分後に照射停止、照射開始60分後まで血管が開通しているか否かを観察した。

[図5C]図5Cは、ローズベンガル投与後の照射による血栓形成マウスモデルにおいて、照射開始後（形成開始後）60分間における血管の開通時間をモニターした結果を示す。10匹のマウスそれぞれの結果が示されている。0分で照射を開始し、照射開始5分後にアクチバシンを投与し、照射開始30分後に照射停止、照射開始60分後まで血管が開通しているか否かを観察した。

[図5D]図5Dは、図5A～図5Cにおける観察終了時（ローズベンガル投与60分後、薬剤投与55分後）の血管開通率を示すグラフである。†, $p<0.05$: 陰性コントロールと有意差あり(Fisher's exact test); ***, $p<0.001$: 陰性コントロールと有意差あり(Fisher's exact test)。

[図6]図6は、ヒト肺がん切除標本の正常組織部分の血管内にたまたま見いだされた血栓に対するヒト化1101抗体およびヒト化99抗体による免疫化

学染色像を示す。

発明の具体的な説明

- [0011] 本明細書では、「対象」は、哺乳動物であり、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、霊長類（例えば、サル、ゴリラ、オランウータン、ボノボ、チンパンジーおよびヒト）であり得、例えば、ヒトであり得る。
- [0012] 本明細書では、「フィブリン」とは、フィブリノーゲンを構成する3種類のポリペプチド鎖（A α 鎖、B β 鎖および γ 鎖）のC末端が切断されることにより、形成される不溶性の凝固物である。本明細書では、フィブリンを不溶性フィブリンとよぶことがある。より具体的には、フィブリノーゲンのC末端が切断されることにより、フィブリンモノマーと呼ばれる状態となり、フィブリンモノマーがカルシウムの作用によって重合することで難溶性のフィブリンポリマーを形成する。フィブリンポリマーは、第XIII因子の作用によってポリマー間で架橋され、安定化フィブリン（本明細書で定義する不溶性フィブリンまたはフィブリンゲル）を形成する。不溶性フィブリンは、プラスミンによって分解される。プラスミンは、前駆体であるプラスミノゲンとして血漿中に含まれている。プラスミノゲンがプラスミノゲンアクチベータ（例えば、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベータ、およびストレプトキナーゼ）等によって、プラスミノゲンのArg-VaI間のペプチドが分解されると、プラスミンを産生する。プラスミンは、プラスミンインヒビターと呼ばれるタンパク質によって阻害され、その作用を制限され得る。
- [0013] フィブリノーゲンのA α 鎖は、ヒトフィブリノーゲンのA α 鎖であり得る。ヒトフィブリノーゲンのA α 鎖としては、GenBank登録番号：AA101936.1で登録されたアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲンのA α 鎖、および当該アミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲンのA α 鎖が挙げられる。
- [0014] フィブリノーゲンのB β 鎖は、ヒトフィブリノーゲンのB β 鎖であり得る。ヒトフィブリノーゲンのB β 鎖としては、NCBI参照番号：NP_00

5132. 2で登録されたアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲンの β 鎖、および当該アミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲンの β 鎖が挙げられる。

[0015] フィブリノーゲンの γ 鎖は、ヒトフィブリノーゲンの γ 鎖であり得る。ヒトフィブリノーゲンの γ 鎖としては、GenBank登録番号：AAH07044. 1で登録されたアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲンの γ 鎖、および当該アミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲンの γ 鎖が挙げられる。

[0016] 本明細書では、「ウロキナーゼ」は、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（uPA）と呼ばれるセリンプロテアーゼの一つである（例えば、EC 3. 4. 21. 73で登録された酵素であり得る）。ウロキナーゼは、前駆体であるプロウロキナーゼとして産生され、そのLys158-Ile159の間のペプチド結合が切断され、活性型のウロキナーゼ（切断された鎖同士はジスルフィド結合で互いに連結している）を形成する。ウロキナーゼは、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、および触媒ドメインの3つのドメインを有する。また、Lys135-Lys136間が切断され、ウロキナーゼは、低分子型ウロキナーゼとなる。なお、プロウロキナーゼのアミノ酸番号は、プロウロキナーゼのシグナルペプチド切断後のアミノ酸配列に基づいて規定される。プロウロキナーゼとしては、例えば、ヒトプロウロキナーゼが挙げられる。ヒトプロウロキナーゼとしては、例えば、GenBank登録番号：AAA61253. 1で登録されたアミノ酸配列を有するヒトプロウロキナーゼおよび当該アミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するヒトプロウロキナーゼが挙げられる。GenBank登録番号：AAA61253. 1で登録されたアミノ酸配列において、1～20番目のアミノ酸配列がシグナルペプチドに対応する。

[0017] 本明細書では、「抗体」は、免疫グロブリンを意味する。抗体は、様々なアイソタイプの抗体であり得、例えば、IgGであり得る。抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体であり得る。抗体は、ヒトキメラ抗体、ヒト化抗

体、またはヒト抗体であり得る。ヒトキメラ抗体は、非ヒト抗体の定常領域をヒト抗体の定常領域に置き換えることにより作製され得る。ヒト化抗体は、ヒト抗体の6つのCDRを、非ヒト抗体の6つの対応するCDRで置き換えることにより作製され得る。ヒト抗体は、免疫グロブリンの少なくとも重鎖可変領域をヒトの遺伝子座の対応する領域で置き換えた動物（例えば、マウス）を用いて作製することができる。定常領域が非ヒトである場合には、定常領域をヒトの抗体のアミノ酸配列に置き換えることでヒト抗体を得ることができる。本明細書では、抗体は、好ましくはヒト化抗体であり得る。本明細書では、抗体は好ましくはヒト抗体であり得る。抗体は、細胞内で産生されるときにはシグナルペプチドを有しているが、細胞外に分泌されるときには当該シグナルペプチドは切除されている。従って、医薬として投与する場合は、抗体にはシグナルペプチドは不要である。

[0018] 本明細書では、「CDR」は、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域に存在する相補性決定領域である。重鎖および軽鎖可変領域に、それぞれ3つ存在し、N末端からCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる。CDRは、例えば、Kabatらの番号付け（Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, Bethesda: US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH.）に基づいて決定され得る。

[0019] 本明細書では、「抗体の抗原結合性断片」は、抗体の断片であって、抗原への結合性を維持した断片を意味する。抗原結合性断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv（単鎖Fv）、ダイアボディー、sc(Fv)₂（単鎖(Fv)₂）が挙げられる。例えば、抗体をパパインで消化すると、Fabを得ることができる。あるいは、抗体をペプシンで消化すると、F(ab')₂を得ることができ、これをさらに還元するとFab'を得ることができる。その他の抗体の抗原結合性断片も当業者に周知

の方法で作製することができる。本発明ではこのような抗体の抗原結合性断片を用いることができる。

[0020] 本明細書では、「融合タンパク質」とは、2つ以上の異なるタンパク質に由来するペプチドがペプチド結合で連結してなるタンパク質を意味する。本明細書では、第一のペプチドと第二のペプチドとの融合タンパク質は、発明の機能を著しく低減しない限り、第三のペプチドおよびさらなるペプチドを含んでもよく、第一のペプチドおよび第二のペプチドのみを含むものでもよい。本明細書では、第一のペプチドと第二のペプチドとの融合タンパク質は、発明の機能を著しく低減しない限り、第一のペプチドと第二のペプチドとをこの順番で含む融合タンパク質およびこれとは異なる順番で含む融合タンパク質のいずれであってもよいが、好ましくは、第一のペプチドと第二のペプチドとをこの順番で含む融合タンパク質である。融合タンパク質において、2つ以上の異なるタンパク質に由来するペプチドは、発明の機能を著しく低減しない限り、リンカーを介して連結されていても、リンカーを介さずに連結されていてもよい。リンカーを介する場合には、リンカーは、フレキシブルリンカーであってもよい。

[0021] 本発明によれば、

不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片と、プロウロキナーゼとの融合タンパク質

が提供される。プロウロキナーゼは、少なくとも触媒ドメインを有する。プロウロキナーゼは、クリングルドメインをさらに有し得る。プロウロキナーゼは、EGF様ドメインとクリングルドメインをさらに有し得る。

[0022] したがって、本発明によれば、例えば、不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片と、プロウロキナーゼとの融合タンパク質であり、プロウロキナーゼは、クリングルドメインと触媒ドメインを有する融合タンパク質が提供される。また、本発明によれば、例えば、不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片と、プロウロキナーゼとの融合タンパク質であり、プロウロキナーゼは、EGF様ドメインとクリングルドメ

インと触媒ドメインを有する融合タンパク質が提供される。本発明によれば、好ましい態様では、プロウロキナーゼは、クリングルドメインを有する一方プラスミン切断部位を有しない変異体であるか、または、クリングルドメイン中のプラスミン切断部位のアミノ酸配列が改変され、当該切断部位がプラスミンによる切断が低減されるように改変された変異体プロウロキナーゼ変異体であり得る。

[0023] 本発明によれば、

不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片と、プロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質であり、

プロウロキナーゼ変異体は、クリングルドメインと触媒ドメインを有し、クリングルドメイン中のプラスミン切断部位のアミノ酸配列が改変され、当該切断部位がプラスミンによる切断が低減されるように改変された変異体（例えば、プラスミンによる切断に抵抗性であるプラスミン切断部位が破壊された変異体）である、融合タンパク質が提供される。ある態様では、変異体は、プラスミン切断部位が破壊されている変異体であり得る。ある態様では、変異体は、プラスミン切断部位が除去されている変異体であり得る。

[0024] 厳密に規定すれば、本発明の融合タンパク質は、不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片の重鎖とプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質であるか、もしくは、不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片の軽鎖とプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質である。また、抗原結合性断片が単鎖である場合は、不溶性フィブリンに結合する抗体の抗原結合性断片とプロウロキナーゼ変異体の融合タンパク質であり得る。

[0025] 本明細書では、抗原結合性断片において用いられる場合、用途「重鎖」および用語「軽鎖」は、由来する抗体における「重鎖」および「軽鎖」のいずれに由来していたかを示す用語であって、抗原結合性断片における分子量の大小を示すものではない。

[0026] 本発明の融合タンパク質において、プロウロキナーゼ変異体は、クリングルドメインと触媒ドメインを有し、クリングルドメイン中のプラスミン切断部位のアミノ酸配列が改変され、プラスミンによる切断に対してより抵抗性である。または、プロウロキナーゼ変異体は、クリングルドメインと触媒ドメインを含み、クリングルドメイン中のプラスミン切断部位の切断が低減（または阻害）された変異体、すなわち、低分子型ウロキナーゼへの切断が低減された変異体である。上記低減は、例えば、改変前（例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するプロウロキナーゼ）と比較して、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上の低減であり得る。上記低減は、当業者であれば、インビトロにおけるアッセイ系において確認することができる。前記クリングルドメイン中のプラスミン切断部位における切断は、ヒトウロキナーゼのLys135-Lys136間および対応するウロキナーゼのアミノ酸間で生じ得る。従って、ウロキナーゼ変異体は、当該切断部位のアミノ酸配列の改変（置換、挿入、および欠失）により、作製され得る。例えば、Lys135およびLys136のいずれかまたは両方の他のアミノ酸への置換、例えば、グリシンへの置換によって作製され得る。プロウロキナーゼ変異体は、そのプラスミン認識部位のアミノ酸配列の改変によっても作製され得る。当業者であれば、プラスミンの切断部位および認識部位のアミノ酸配列の改変を適宜行うことができる。プロウロキナーゼ変異体は、触媒ドメイン中にプラスミンによる切断部位（Lys158-Ile159間）が存在するが、切断された後に生じる2つのペプチドは、当該ペプチドの触媒ドメイン中にそれぞれ存在するシステイン残基（Cys148とCys279）間のジスルフィド結合で連結される。従って、当該ジスルフィド結合を提供する触媒ドメイン中の2つのシステイン残基は、プロウロキナーゼ変異体において保存されている。

プロウロキナーゼ変異体としては、プラスミノゲンアクチベータ能を著しく低減しない限り、ヒトウロキナーゼのLys135-Lys136間または対応するアミノ酸間における切断能が低減された様々なプロウロキナー

ゼ変異体を用いることができるが、例えば、配列番号1のアミノ酸配列と90%以上、95%以上、98%以上、99%以上または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有するプロウロキナーゼ変異体（但し、定義通り、クリングルドメイン中のプラスミン切断部位の切断が低減された変異体である、例えば、L y s 1 3 5およびL y s 1 3 6のいずれかまたは両方のアミノ酸配列が改変されている、例えば、グリシンに置換されている変異体である；またL y s 1 5 8－I l e 1 5 9間で切断された後に生じる2つのペプチドを連結する触媒ドメイン中の2つのシステイン残基は保存されている）、または配列番号2のアミノ酸配列を有するプロウロキナーゼ変異体が挙げられる。

[0027] 本発明の融合タンパク質において、触媒ドメインは、1本のペプチドで構成される触媒ドメイン（すなわち、L y s 1 5 8－I l e 1 5 9間の切断前の触媒ドメイン）、または2本のペプチドで構成される触媒ドメイン（すなわち、L y s 1 5 8－I l e 1 5 9間で切断されて生じた2本のペプチド（すなわち、N末端からL y s 1 5 8までのペプチドとI l e 1 5 0からC末端側のペプチド）がジスルフィド結合で連結してなる複合体などの、L y s 1 5 8－I l e 1 5 9間で切断されて生じた2本のペプチド（すなわち、N末端からL y s 1 5 8までのペプチドとI l e 1 5 0からC末端側のペプチド）が架橋（例えば、アミノ酸側鎖同士の架橋）により連結してなる複合体）であり得る。本発明の融合タンパク質において、好ましくは、触媒ドメインは、1本のペプチドで構成される触媒ドメイン（すなわち、L y s 1 5 8－I l e 1 5 9間の切断前の触媒ドメイン）である。

[0028] プロウロキナーゼもしくはその触媒ドメインまたはプロウロキナーゼの変異体は、シグナルペプチドを有していてもよい。しかし、投与形態では、シグナルペプチドは不要であるから、プロウロキナーゼは、シグナルペプチドを有しなくてもよい。

[0029] プロウロキナーゼまたはその変異体は、例えば、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、および触媒ドメインを有していてもよい。

- [0030] 本発明の融合タンパク質において、不溶性フィブリンに結合する抗体は、不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体（すなわち、不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも低い解離定数 K_D で結合する抗体）である。不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体は、例えば、配列番号17または18に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体であり得る（WO2014/133093参照）。配列番号17に記載のアミノ酸配列は、WO2014/133093の配列番号1に記載のアミノ酸配列に対応し、配列番号18に記載のアミノ酸配列は、WO2014/133093の配列番号2に記載のアミノ酸配列に対応する。好ましい態様では、不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体は、不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、400倍以上、500倍以上、600倍以上、700倍以上、800倍以上、900倍以上、1,000倍以上、10,000倍以上、100,000倍以上の強い親和性で結合する{ここで親和性の差が大きいほど好ましい}。
- [0031] 不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体またはその抗原結合性断片としては、例えば、WO2014/133093で開示された10-102抗体、34-105抗体、およびFib-0355抗体からなる群から選択される抗体の重鎖CDR1~3および軽鎖CDR1~3をそれぞれ対応するCDRとして有する抗体またはその抗原結合性断片が挙げられる。
- [0032] 不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体またはその抗原結合性断片としてはまた、例えば、WO2018/203517で開示された99抗体、1101抗体、および0211

抗体からなる群から選択される抗体の重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3をそれぞれ対応するCDRとして有する抗体またはその抗原結合性断片が挙げられる。

[0033] 本発明の融合タンパク質において、不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体またはその抗原結合性断片としてはさらに、

配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1と配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2と配列番号13に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と、

配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1と配列番号15に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2と配列番号16に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域と

を含む、

抗体またはその抗原結合性断片が挙げられる。抗体は、ヒトキメラ抗体またはヒト化抗体であり得る。本発明によれば、上記重鎖可変領域と軽鎖可変領域を有するヒト化抗体も提供される。

[0034] 本発明の融合タンパク質において、不溶性フィブリンに対して、フィブリノーゲンに対するよりも強い親和性で結合する抗体またはその抗原結合性断片としては、例えば、

配列番号5に記載のアミノ酸配列の20～139番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、

配列番号4に記載のアミノ酸配列の23～130番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域と

を含む、

抗体またはその抗原結合性断片が挙げられる。本発明の融合タンパク質において、抗体は、重鎖可変領域に加えて、Fab断片内の重鎖定常領域またはその一部をさらに含んでいてもよい。本発明の融合タンパク質において、抗体は、ヒトキメラ抗体またはヒト化抗体であり得る。本発明によれば、上記

重鎖可変領域と軽鎖可変領域を有するヒト化抗体も提供される。

[0035] プロウロキナーゼもしくはその触媒ドメインまたはプロウロキナーゼの変異体は、リンカーを介して、または介さずに不溶性フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片と連結していてもよい。リンカーとしては、発明の効果が著しく低減しない限り、様々なリンカーを用いることができるが、例えば、ペプチドリンカーを用いることができ、例えば、フレキシブルリンカー（またはフレキシブルペプチドリンカー）を用いることができ、例えば、グリシンおよびセリンからなるリンカー（GSリンカー）が挙げられる。GSリンカーとしては、例えば、 $(GGGS)_n$ {ここで、 n は1～5の自然数のいずれか、好ましくは2～3のいずれかの自然数、好ましくは3である}が挙げられる。フレキシブルリンカーとしてはまた、例えば、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するリンカーが挙げられる。

[0036] 本発明の融合タンパク質は、抗体またはその抗原結合性断片が、抗原の認識にその軽鎖可変領域を必要とする場合には、当該軽鎖可変領域との複合体の形態であり得る。本発明の融合タンパク質は、抗原への結合のためにさらなるペプチドとの複合体を形成する必要が無い場合（例えば、融合タンパク質が軽鎖可変領域を含む場合や断片がscFvである場合等）には、さらなる軽鎖との複合体形成は不要である（すなわち、遊離形態であり得る）。ここで遊離形態とは、軽鎖との複合体形成をしていない形態をいう。

[0037] 本発明の融合タンパク質は、ある好ましい態様では、フィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片が、フィブリンに結合する抗体の重鎖のFab領域と、EGF様ドメインとクリングルドメインと触媒ドメインとを含むプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質であり得る。当該融合タンパク質は、当該フィブリンに結合する抗体の軽鎖との複合体の形態であり得る。この態様において、フィブリンに結合する抗体の抗原結合性断片は、

配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1と配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2と配列番号13に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む重鎖可変領域と、

配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 と配列番号 15 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 と配列番号 16 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域とを含むものであり得、より好ましくは、

配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 20～139 番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の 23～130 番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域と

を含むものであり得る。上記において、重鎖可変領域は、さらにその F a b 領域の重鎖定常領域またはその一部を含んでいてもよい。上記態様において、好ましくは、クリングルドメインのプラスミン切断部位である L y s 135-L y s 136 がいずれもグリシンに改変されていることができる。

[0038] 本発明によれば、本発明の融合タンパク質は、当業者に周知の方法により、調製することができる。例えば、本発明の融合タンパク質は、細胞（昆虫細胞、鳥細胞、大腸菌、酵母、および哺乳動物細胞）、好ましくは、哺乳動物細胞（例えば、タンパク質発現に適した細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（C H O 細胞）および 293 細胞ならびにこれらの派生細胞などのヒト細胞などのタンパク質発現に適した哺乳動物細胞）に発現させることができる。発現は、例えば、当該発現細胞で駆動可能なプロモーターに作動可能に連結された本発明の融合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターを用いて行うことができる。融合タンパク質に軽鎖が必要である場合には、軽鎖を当該発現細胞に共発現させることができる。本発明によれば、本発明の融合タンパク質は、当業者に周知の精製法により精製されることができる。精製は、抗原を含むアフィニティーカラム、融合タンパク質に付したタグに対するアフィニティーカラム等を用いて行うことができる。

[0039] 本発明によれば、本発明の融合タンパク質（例えば、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質）を含む組成物および医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、本発明の融

合タンパク質（例えば、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質）に加えて、薬学上許容可能な賦形剤をさらに含んでもよい。薬学上許容可能な賦形剤としては、塩、等張化剤、pH調整剤、および水等が挙げられる。ある態様では、本発明の医薬組成物は、凍結乾燥させた医薬組成物と注射用水とを含むキット（すなわち、用事調製キット）であり得る。

[0040] 本発明の融合タンパク質（例えば、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質）を含む医薬組成物は、非経口投与（例えば、血管内投与、例えば、静脈内投与）により投与することができる。血管内投与は、例えば、血栓付近、特に血流に対して血栓の上流（血液が流れてくる方向）に行われ得る。また、本発明の医薬組成物は、静脈内投与用である場合は、静脈内投与に適した製剤であり得る。そのような医薬組成物は、当業者であれば適宜調製することができる。例えば、タンパク質製剤や抗体製剤と同様に調製することができる。投与量、投与タイミング、および投与経路等は、医師が適宜決定することができる。例えば、血栓症発症後数時間（例えば、4時間）以内に本発明の医薬組成物を静脈投与することができる。

[0041] 本発明の医薬組成物には、本発明の融合タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合性断片とプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質）であって、治療上有効量の融合タンパク質が含まれ得る。治療上有効量とは、血栓症または血栓症に起因する疾患において治療効果が奏される量を意味する。治療効果は、血栓の溶解による血管の開通と血流の回復に依存し得る。

[0042] 本発明の医薬組成物は、フィブリンクロットを溶解させることに用いることができる。フィブリンクロットは、血栓であり得る。

[0043] 本発明の医薬組成物は、血栓溶解剤または繊維素溶解酵素剤であり得る。

[0044] 本発明の医薬組成物は、血栓症の処置に用いることができ、例えば、脳血管障害および心筋梗塞から選択される疾患を処置することに用いることができる。当該疾患は、フィブリンによる血栓を原因とする疾患であり得る。当

該疾患は、フィブリンクロットの溶解が治療法として適した疾患であり得る。当該疾患はフィブリンに結合する抗体（および当該抗体と造影剤とのコンジュゲート）によってインビボイメージングすることができる。

[0045] 本発明によれば、フィブリンクロットを溶解させることに用いる医薬の製造における、本発明のフィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片、本発明のプロウロキナーゼ変異体、および本発明の融合タンパク質からなる群から選択されるタンパク質の使用が提供される。本発明によれば、血栓溶解剤または繊維素溶解酵素剤である医薬の製造における、本発明のフィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片、本発明のプロウロキナーゼ変異体、および本発明の融合タンパク質からなる群から選択されるタンパク質の使用が提供される。本発明によれば、血栓溶解剤または繊維素溶解酵素剤である医薬の製造における、本発明のフィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片、本発明のプロウロキナーゼ変異体、および本発明の融合タンパク質からなる群から選択されるタンパク質の使用が提供される。本発明によれば、脳血管障害および心筋梗塞から選択される疾患を処置することに用いる医薬の製造における、本発明のフィブリンに結合する抗体またはその抗原結合性断片、本発明のプロウロキナーゼ変異体、および本発明の融合タンパク質からなる群から選択されるタンパク質の使用が提供される。

[0046] 本発明によれば、対象に医薬を投与する方法であって、医薬が、本発明の融合タンパク質である、方法が提供される。本発明によれば、その必要のある対象において、フィブリンクロットを溶解する方法であって、本発明の融合タンパク質を投与することを含む、方法が提供される。本発明によれば、その必要のある対象は、血栓を有する対象であり得る。本発明によれば、その必要のある対象において、疾患を処置する方法であって、本発明の融合タンパク質を投与することを含む、方法が提供される。ここで、疾患は、血栓に起因する疾患、血栓の溶解による治療される疾患であり得、例えば、脳血管障害（例えば、脳梗塞）および心筋梗塞から選択される疾患が挙げられる。

[0047] 実施例 1：抗フィブリン抗体とプロウロキナーゼ変異体との融合タンパク質の調製

本実施例では、表記融合タンパク質を設計し、調整した。

[0048] 融合タンパク質の設計

プロウロキナーゼ変異体の設計

ヒト化抗 F i b r i n 抗体の F a b 領域は、抗フィブリン抗体 1 1 0 1 の C D R 領域を用いて設計した（1 1 0 1 クローンに関しては W O 2 0 1 8 / 2 0 3 5 1 7 公報参照）。また、プロウロキナーゼ（配列番号 1）のプラスミン切断部位の 1 つ 1 3 5 L y s - 1 3 6 L y s を 1 3 5 G l y - 1 3 6 G l y に改変した（配列番号 2）。このことにより不溶性フィブリン上で活性化されているプラスミンで同部位が切断されることはなく、ウロキナーゼの活性ドメインが不溶性フィブリンを溶解し続けることができるように設計した（図 1 参照）。

[0049] 融合タンパク質の設計

上記 1 1 0 1 クローンが産生する抗体に基づいてその F a b 領域と上記プロウロキナーゼ変異体とをリンカーを介して連結させ、配列番号 3 に記載の融合タンパク質を設計した。当該融合タンパク質には、C 末端に H i s タグを付した。また、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を設計した。設計された融合タンパク質は、A M U 1 1 1 4 重鎖と呼ぶことがある。

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する融合タンパク質は、配列番号 5 に記載の抗体の F a b 領域を、配列番号 1 9 に記載のリンカーを介して、配列番号 2 に記載のプロウロキナーゼ変異体と連結した構造を有するものである。軽鎖は、別ペプチドとして発現させ、上記 A M U 1 1 1 4 重鎖と複合体形成をさせた。

[0050] 具体的には、上記 1 1 0 1 クローンが産生する抗フィブリン抗体の重鎖遺伝子から F a b 領域をコードする遺伝子を P C R 法により増幅させた。また、プロウロキナーゼの遺伝子を P C R 法により増幅し、部位特異的変異導入法によってプロウロキナーゼ遺伝子の変異導入して上記変異体を得た。

[0051] 用いたプライマーは以下の通りであった。

ACTTGAATTCCACCATGGGCTCTACAGCAATCCT
CGCTTTTG (配列番号6)

ATAAGGATCCTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT
CTTC (配列番号7)

GAGGCTCGAGTCTTAAGTTTCAATGCGGCCAG (配
列番号8)

ATAAGCGGCCGCTCAATGGTGGTGGTGGTGATGA
TGGTGACTTGCTCCGCCTGCGGAAAGCGCCAGAC
CATTTTCTTC (配列番号9)

[0052] 増幅産物を *promega wizard SV gel and PC
R clean-up system* キットを用いて精製した後に、*p c D
NA 3. 3* および PCR 産物をそれぞれ *E c o R I* および *N o t I* による制
限酵素処理に供し、クローニングした。その後、以下のリンカー配列を含む
プライマーを用いてさらなる PCR 法で融合タンパク質を得た。

GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGATCC
GGTGGAGGTGGCAGTGGTGGGGGAGGCTCAGGAG
GCTCGAGTCTTAAGTTTCAATGCGGCCAGAAAAC
(配列番号10)

[0053] [融合タンパク質の発現と精製]

融合タンパク質および軽鎖ペプチドを *Exp i C H O E x p r e s s i
o n S y s t e m (T h e r m o F i s h e r)* を用いて一過性発現さ
せた。培地には酵素活性を抑えるため、20%になるように FBS を添加し
た。一過性発現させた培養上清を 50 mM *T r i s - H C l* pH8.
5, 300 mM *N a C l* で平衡化させた *S u p e r d e x 75 p g*
(GE) ゲルろ過カラムに供した。ゲル濾過カラムから目的産物の溶出領域
を回収し、*N i* カラムにて精製したのち、*S u p e r d e x 200 p g* (GE) ゲルろ過カラムで精製し、最終産物とした。

[0054] [最終産物の確認]

最終産物を還元環境下および非還元環境下でSDS-PAGEによって分析した。非還元環境下では、融合タンパク質は軽鎖と複合体（以下、「AMU1114複合体」または単に「AMU1114」と呼ぶことがある）を形成していると推定される。図1Bの左パネルの泳動写真によれば、当該複合体は約100kDaに単一のバンドとして観察された。還元環境下では、融合タンパク質と軽鎖とをつなぐSS結合が開裂し、融合タンパク質と軽鎖とが別々に検出されると推定される。図1Bの右パネルの泳動写真によれば、融合タンパク質（AMU1114重鎖）は、約75kDaに単一のバンドとして観察され、軽鎖は、約25kDaに単一のバンドとして観察され、推定される理論値と一致した。

[0055] 実施例2：インビトロにおけるフィブリンゲルの溶解試験

本実施例では、既存の血栓溶解剤（アクチバシン（t-PA、一般名：アルテプラゼ）およびウロナーゼ（u-PA、一般名：ウロキナーゼ））とAMU1114のフィブリンゲルの溶解活性をインビトロ系において比較した。

[0056] フィブリンゲル（不溶性フィブリン）は以下のように調製された。真空採血管（ベノジェクトII真空採血管 VP-P070K30 Terumo）で採血後、メディフュージで室温で13分間遠心分離し、血漿を回収した。回収した血漿にAlexa Fluor 647で蛍光標識したヒトフィブリノーゲン（ヒトフィブリノーゲン AF647）を血漿の1/100量添加した。ヒトフィブリノーゲン AF647を混合した血漿を96ウェルプレートに1ウェルあたり140 μ L分注し、その後20 NIH 単位/mLのトロンピンを7.5 μ L/ウェル添加し、室温、15分静置した。血漿が凝固したことを確認し、500 $\times$ gで3分間遠心して、フィブリンゲルを調製した。不純物を洗い流すため100 μ LのPBSで5回洗浄した。

[0057] フィブリンゲルの溶解試験は以下の通り行った。アクチバシン注600万単位（協和キリン）、ウロナーゼ静注用12万単位（持田製薬）、AMU1

114をそれぞれ2mg/mL, 1mg/mL, 0.5mg/mLの濃度になるようPBSで調整した。各々のサンプルをhuman plasma（コージンバイオ）で10倍に希釈し、37℃で120分反応させた。反応させた各々のサンプルをhuman plasmaでさらに10倍に希釈し、フィブリンゲルに添加（150 μL/well）した。フィブリンゲルに添加後、37℃で1時間反応させ、上清に溶出したAlexa Fluor 647（Ex 647/Em 680）を測定した。本試験系においては、この蛍光強度の増加は、フィブリンゲルの溶解を意味する。

[0058] 結果は図2に示される通りであった。図2に示されるように、アクチバシン、ウロナーゼおよびAMU1114のいずれも、フェブリンゲルへの添加によって、フィブリンゲルを溶解する活性を有していることが明らかであった。フィブリンゲルの溶解活性において、アクチバシンおよびウロナーゼの10 μg/mLと、AMU1114の20 μg/mLの活性が等しいことから、以下の実施例ではこの濃度比（すなわち、1：1：2）で用いることとした。なお、図1Bに示されるように、AMU1114は、アクチバシンおよびウロナーゼの約2倍の分子量を有しているため、上記の濃度において、アクチバシン、ウロナーゼおよびAMU1114は同等のモル濃度を有することが明らかである。

[0059] 実施例3：インビボにおける血中プラスミノゲン量に対する薬剤投与の影響

ウロキナーゼ製剤を血中に投与すると、血中プラスミノゲンが分解されてプラスミンが生じる。プラスミンは、血中に生じたフィブリンを分解する活性を有するため、血中プラスミノゲン濃度の上昇は、全身における抗凝固の副作用に繋がりうる。本実施例では、インビボにおける血中プラスミノゲン量に対するアクチバシン、ウロナーゼおよびAMU1114の影響を調べた。

[0060] 投与薬剤として、アクチバシンおよびウロナーゼをPBSで各々2mg/mLに調整した。またAMU1114を4mg/mLに調整した。これをマ

ウス（C57BL/6J、 $n=3$ 、体重各20g）に対して100 μL /匹となるようにマウスに尾静脈投与した。30分後にイソフルランで麻酔したマウスから心採血にて500 μL の血液を採血した。血液は速やかに1.5 mLチューブに移し、次の作業まで保冷剤で冷却した。なお、採血には事前に19%クエン酸ナトリウム溶液を50 μL 吸引したシリンジを用いた。採血した血液は速やかに10,000 $\times g$ で2分間遠心分離し、血漿を回収後、 -80°C で凍結した。

[0061] -80°C で凍結した各々の血漿を氷上で溶解した。溶解後、TBSで40倍に希釈し、希釈サンプル20 μL 対し、100 μL の250単位/mLウロナーゼと混合した。また陰性対照サンプルとして希釈サンプル20 μL に100 μL TBSを混合したものをを用いた。混合したサンプルを1時間、 37°C で反応させた。その後、基質（テストチームS PLG 積水メディカル）20 μL と混合し、 37°C で6時間反応させた。反応後、405/505の吸光度を測定した。測定した吸光度から未処理のマウスから採血した血漿中のプラスミノーゲンの値（未処理）を基準にし、未処理に対する各々の割合（%）を計算した。

[0062] 結果は、図3に示される通りであった。図3に示されるように、アクチバシンおよびウロナーゼでは、血中プラスミノーゲン量が減少していることが確認されたが、これに対して、AMU1114ではその減少量が少ないことが確認された。特に、AMU1114は、アクチバシン（t-PA）と比較しても、血中のプラスミノーゲンの活性化の能力が低かった。

[0063] 実施例4：インビボにおける血栓形成と形成された血栓の開通実験

本実施例では、マウスの頸動脈にPIT法によって血栓を形成させ、その後、薬剤を投与して、当該頸動脈が開通している時間および閉塞している時間を決定した。PIT法においては、ローズベンガルに540 nmの波長を有する光を照射すると照射部位において一重項酸素が発生し、内皮細胞を傷害して血小板凝集を惹起させ、血栓形成を促進することが利用されている。

- [0064] 平均体重30gのマウス（各投与群n=10）に対して、アクチバシンを3mg/kgで90 μ L投与することとし、AMU1114は6mg/kgで180 μ L投与した。この用量では、インビトロの系においてアクチバシンとAMU1114は同等の活性を奏する量である。実験は、マウス血栓実験で豊富な実績を有するLSIメディエンス社に委託した。
- [0065] 各実験において、0分時点でローズベンガル色素を投与し、光照射することによって頸動脈での血栓形成を開始させた。血栓形成開始から5分後に、PBS、AMU1114、またはアクチバシンを投与した。血栓形成開始から30分後に照射を停止させた。血栓形成開始から60分後に観察を終了させた。観察した60分間で、頸動脈が閉塞している時間および開通している時間を求めた。
- [0066] 結果の概要は、図4に示される通りであった。図4に示されるように、血管の開通時間（全体時間に対する開通時間の割合）は、陰性対照と比較してアクチバシン投与群では有意に大きいことが明らかであったが、AMU1114投与群ではさらに大きいことが明らかであった。
- [0067] 結果の詳細は、図5A（陰性対照群）、図5B（AMU1114投与群）、および図5C（アクチバシン投与群）に示される通りであった。陰性対照群では、実験終了時点において10匹中10匹の血管が閉塞していた（図5A参照）。これに対して、図5Bに示されるように、AMU1114投与群では、10匹中わずか1匹において血管が閉塞していたのみであり、9匹は血管が開通していた。また、図5Cに示されるように、アクチバシン投与群では、10匹中5匹において血管が閉塞していた。
- [0068] 図5Bと図5Cの結果を比較すると、図5Dに示されるようにAMU1114投与群では、アクチバシン投与群で認められるよりも、多くの個体において血管を開通させた。AMU1114が、インビボにおいては、血管の開通能力において、従来の血栓溶解薬（特に、t-PA）よりも優れていることが明らかとなった。投与した薬剤は、インビトロにおいては同等の活性を示す量であったことを考慮すると、AMU1114投与群におけるインビボ

での血管開通能力の高さは想定を超えるものであった。

[0069] また、ヒト肺がん切除標本の正常組織部分の血管内において血栓が存在する箇所を発見した。この血栓に対して上記と同様にしてヒト化 1101 抗体およびヒト化 99 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。結果は、図 6 に示される通りであった。図 6 に示されるように、ヒト化 1101 抗体およびヒト化 99 抗体は、それぞれ血栓部位を可視化させることができた。すなわち、ヒト化 1101 抗体およびヒト化 99 抗体は、ヒトの血栓に結合することもまた示された。

[0070] 配列表

配列番号 1 : プロウロキナーゼのアミノ酸配列の一例 (シグナルペプチド除去済)

配列番号 2 : プロウロキナーゼ変異体のアミノ酸配列の一例 (シグナルペプチド除去済) 配列番号 3 : 抗フィブリン抗体 1101 クローンの重鎖の F a b 領域とプロウロキナーゼ変異体の融合タンパク質の一例 (H i s タグ含まず)

配列番号 4 : 抗フィブリン抗体 1101 クローンの軽鎖のアミノ酸配列 (ここで、1 ~ 22 番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、23 ~ 130 番目のアミノ酸配列が抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列であり、131 ~ 236 番目のアミノ酸配列が抗体の軽鎖定常領域のアミノ酸配列である)

配列番号 5 : 抗フィブリン抗体 1101 クローンの重鎖の F a b 領域のアミノ酸配列 (ここで、1 ~ 19 番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、20 ~ 139 番目のアミノ酸配列が抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列であり、140 ~ 242 番目のアミノ酸配列が F a b に含まれる重鎖定常領域のアミノ酸配列である)

配列番号 6 : プライマー 1 の塩基配列

配列番号 7 : プライマー 2 の塩基配列

配列番号 8 : プライマー 3 の塩基配列

配列番号 9 : プライマー 4 の塩基配列

配列番号 10 : プライマー 5 の塩基配列

配列番号 11 : 本発明の融合タンパク質に用いられるヒト化抗フィブリン抗体 1101 クローン の重鎖 CDR 1 のアミノ酸配列

配列番号 12 : 本発明の融合タンパク質に用いられるヒト化抗フィブリン抗体 1101 クローン の重鎖 CDR 2 のアミノ酸配列

配列番号 13 : 本発明の融合タンパク質に用いられるヒト化抗フィブリン抗体 1101 クローン の重鎖 CDR 3 のアミノ酸配列

配列番号 14 : 本発明の融合タンパク質に用いられるヒト化抗フィブリン抗体 1101 クローン の軽鎖 CDR 1 のアミノ酸配列

配列番号 15 : 本発明の融合タンパク質に用いられるヒト化抗フィブリン抗体 1101 クローン の軽鎖 CDR 2 のアミノ酸配列

配列番号 16 : 本発明の融合タンパク質に用いられるヒト化抗フィブリン抗体 1101 クローン の軽鎖 CDR 3 のアミノ酸配列

配列番号 17 : 不溶性フィブリンにおいて露出するアミノ酸配列の一例 (β 鎖)

配列番号 18 : 不溶性フィブリンにおいて露出するアミノ酸配列の一例 (γ 鎖)

配列番号 19 : 実施例で用いたリンカー配列