

明 細 書

発明の名称：

フィブリンに結合する抗体および当該抗体を含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、フィブリンに結合する抗体および当該抗体を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 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。フィブリンに対して強く結合する抗体は、インビボイメージングにも用いられ得る（特許文献1および2）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：WO2014/133093

特許文献2：WO2018/203517

発明の概要

[0004] 本発明は、フィブリンに結合する抗体および当該抗体を含む医薬組成物を提供する。本発明特に、フィブリンに結合するヒト化抗体および当該抗体を含む医薬組成物を提供する。

[0005] 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であって、

（1）配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1と配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2と配列番号3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4に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1と配列番号5に記

載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2と配列番号6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；または

(2) 配列番号9に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1と配列番号10に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2と配列番号11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12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1と配列番号13に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2と配列番号14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；

を含む、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。

[2] 不溶性フィブリン抗体またはその抗原結合性断片であって、

(3) 配列番号7に記載のアミノ酸配列の重鎖可変領域と配列番号8に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域；または

(4) 配列番号15に記載のアミノ酸配列の重鎖可変領域と配列番号16に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、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。

[3] 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か、または、

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し、かつ、

(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、当該抗体の軽鎖可変領域とを含む、

(6) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域と、当該抗体の軽鎖可変領域と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、

(7) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、当該抗体の軽鎖可変領域と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、

域とを含む、

(8) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、当該抗体の軽鎖可変領域とを含む、

(9) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域と、当該抗体の軽鎖可変領域と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、もしくは

(10) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、当該抗体の軽鎖可変領域と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、

上記[1]または[2]に記載の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。[4]ヒト化された抗体またはその抗原結合性断片である、上記[1]～[3]のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

[5] 上記[1]～[4]のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、抗体-薬物コンジュゲート。

[6] 上記[5]に記載の抗体-薬物コンジュゲートを含む、医薬組成物。

[7] がんを処置することに用いるための、上記「6」に記載の医薬組成物。

[8] がんを処置することに用いるための医薬組成物であって、上記[1]～[4]のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む抗がん剤を含む、医薬組成物。

[9] 上記[1]～[4]のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、体内診断薬。

図面の簡単な説明

[0006] [図1]図1は、ヒト化99抗体およびヒト化1101抗体と各種抗原との結合性を示すELISAアッセイの結果を示す。BSAは、ウシ血清アルブミン

を表し、FNGは、フィブリノーゲンを表し、SFは、可溶性フィブリンを表し、FDPは、フィブリン分解物を示し、IFは、不溶性フィブリンを示す。

[図2]図2は、変性フィブリノーゲン（1 μ g/レーン）に対する抗体の反応性を示すウェスタンブロッティングの結果を示す。変性フィブリノーゲンをSDS-PAGEに供し、メンブレンに転写した後に、表示された濃度の各種抗体をメンブレンと反応させた。変性フィブリノーゲンは、不溶性フィブリンに特徴的な構造であって、ヒト化99抗体および1101抗体が結合する構造（非変性フィブリノーゲンが有しない構造）を有する。

[図3]図3は、HE-PKCマウスの脾臓組織切片のヘマトキシリンエオシン染色像（上パネル）および脾臓組織切片のヒト化1101抗体およびヒト化99抗体による免疫化学染色像（下の4つのパネル）を示す。

[図4]図4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。

[図5]図5は、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）で発現させたヒト化99抗体とヒト化1101抗体の粒子サイズ（nm）をデルサナノ（商標）を用いて計測した結果である。

発明の具体的な説明

[0007] 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。

[0008] 本明細書では、「処置」とは、治療（治療的処置）と予防（予防的処置）を含む意味で用いられる。本明細書では、「治療」とは、疾患若しくは障害の治療、治癒、防止若しくは、寛解の改善、または、疾患若しくは障害の進行速度の低減を意味する。本明細書では、「予防」とは、疾患もしくは病態の発症の可能性を低下させる、または疾患もしくは病態の発症を遅らせることを意味する。

- [0009] 本明細書では、「疾患」とは、治療が有益な症状を意味する。本明細書では、「がん」とは悪性腫瘍を意味する。
- [0010] 本明細書では、「治療上有効量」とは、疾患や状態を処置（予防または治療）するために有効な薬剤の量を意味する。治療上有効量の薬剤は、疾患または状態の症状の悪化速度を低下させること、前記症状の悪化を止めること、前記症状を改善すること、前記症状を治癒すること、または前記症状の発症または発展を抑制することが可能である。
- [0011] 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、およびストレプとキナーゼ）等によって、プラスミノゲンのArg-Va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。
- [0012] 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。

- [0013] 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_005132.2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B 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B β 鎖が挙げられる。
- [0014] 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。
- [0015] 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。
- [0016] 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。CD

Rは、例えば、Kabata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。

[0017] 本明細書では、「不溶性フィブリン特異的抗体」とは、不溶性フィブリンに結合する抗体であって、フィブリノーゲンに対するよりも不溶性フィブリンに対して高い親和性を有する抗体をいう。このような不溶性フィブリン特異的抗体は、不溶性フィブリンに対する親和性とフィブリノーゲンに対する親和性とでスクリーニングして得ることが容易にできる。フィブリンは不溶性フィブリン中で立体構造変換が生じ、不溶性になることで初めて露出するエピトープ部位を有する。従って、「不溶性フィブリン特異的抗体」は、この露出したドメイン、すなわちDドメイン（以下、「D-domain」ともいう）を免疫原として免疫することで得ることができる。また、線形ペプチドを用いて得ることも可能である。例えば、フィブリンB β 鎖（例えば、ヒトフィブリンB β 鎖は、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し得る）のアミノ酸配列の231～246位に対応するフィブリンB β 鎖の部分ペプチドを免疫すると、「不溶性フィブリン特異的抗体」を得ることができる。その他、配列番号18に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを免疫原として免疫しても、「不溶性フィブリン特異的抗体」を得ることができる。このような不溶性フィブリン特異的抗体は、フィブリノーゲン、フィブリンモノマーおよびフィブリンポリマーのいずれに対するよりも、不溶性フィブリンへの親和性が高い抗体であり得る。不溶性フィブリンに対する親和性とフィブリノーゲンに対する親和性の比が、例えば、1を超える、1.5以上、2以上、3以上、4以上、または5以上の抗体を不溶性フィブリン特異的抗体として得ることができる。親和性は結合親和性(KD)を意味し、ELISAや結合平衡除外法等の周知の方法で決定することができる。本明細書で

は、強い親和性は、 K_D が低いことを意味する。本明細書では、弱い親和性は、 K_D が高いことを意味する。

[0018] 本明細書では、「競合する」とは、抗原への結合に関して、他の結合抗体と結合を奪い合うことを意味する。競合は、ある抗原に対して2つの抗体の結合部位が重複する場合に生じ得る。このような抗体は、上記のようにエピトープを用いた免疫によって得ることができ、および／または、競合アッセイにより抗原に対する一方の抗体の結合が他方の抗体により減少するか否かを確認することでも得ることができる。競合する抗体としては、互いに競合する抗体が挙げられる。

[0019] 本明細書では、「抗体－薬物コンジュゲート」（以下、「ADC」ともいう）とは、抗体と細胞傷害剤とが連結した物質を意味する。ADCでは、抗体と細胞傷害剤とは適切なリンカーを介して連結させることができる。細胞傷害剤としては、化学療法剤、放射性同位体、および毒素を用いることができる。ADCには、抗体の抗原結合性断片と薬物とのコンジュゲートも含まれる。

[0020] 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。

[0021] 本発明において、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 (WO 2014/133093 参照)。配列番号 17 に記載のアミノ酸配列は、WO 2014/133093 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、WO 2014/133093 の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対応する。

[0022] 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、WO 2014/133093 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 CDR 1~3 および軽鎖 CDR 1~3 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。

[0023] 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、WO 2018/203517 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 CDR 1~3 および軽鎖 CDR 1~3 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。

[0024] 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 1 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1 と配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2 と配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3 を含む重鎖可変領域と、

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1 と配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2 と配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3 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。

[0025] 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 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、

配列番号 8 に記載のアミノ酸配列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。抗体は、重鎖可変領域に加えて、F a b 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。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。

[0026] 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 9 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 と配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 と配列番号 11 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、

配列番号 12 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 13 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 14 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、

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。

[0027] 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 15 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、

配列番号 16 に記載のアミノ酸配列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。抗体は、重鎖可変領域に加えて、F a b 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。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。

[0028] 本発明によれば、上記（３）に記載の抗体と不溶性フィブリンへの結合に対して競合する抗体、好ましくは、互いに競合する抗体が提供され得る。ここで、抗体は、好ましくはヒト化抗体である。

[0029] 本発明によれば、上記（４）に記載の抗体と不溶性フィブリンへの結合に対して競合する抗体、好ましくは、互いに競合する抗体が提供され得る。ここで、抗体は、好ましくはヒト化抗体である。

[0030] 本発明によれば、上記（１）に記載の抗体は、ヒト化抗体であり、不溶性フィブリン特異的抗体であり得る。

本発明によれば、上記（２）に記載の抗体は、ヒト化抗体であり、不溶性フィブリン特異的抗体であり得る。

本発明によれば、上記（３）に記載の抗体は、ヒト化抗体であり、不溶性フィブリン特異的抗体であり得る。

本発明によれば、上記（４）に記載の抗体は、ヒト化抗体であり、不溶性フィブリン特異的抗体であり得る。

本発明によれば、上記（３）に記載の抗体と不溶性フィブリンへの結合に対して競合する抗体、好ましくは、互いに競合する抗体は、ヒト化抗体であり、不溶性フィブリン特異的抗体であり得る。

本発明によれば、上記（４）に記載の抗体と不溶性フィブリンへの結合に対して競合する抗体、好ましくは、互いに競合する抗体は、ヒト化抗体であり、不溶性フィブリン特異的抗体であり得る。

[0031] 本発明の抗体は、配列番号： 17 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド

に結合し得る。ここで本発明の抗体は、ヒト化抗体であり得る。本発明の抗体は、配列番号：１７に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合し得るヒト化抗体であり、上記の抗体のいずれかから選択されるものであり得る。本発明の抗体は、配列番号：１７に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合し得るヒト化抗体であり、上記の抗体と重鎖または軽鎖可変領域において、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、または９５％以上のアミノ酸の同一性を有するものであり得る。本発明の抗体は、配列番号：１７に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合し得るヒト化抗体であり、上記の抗体と重鎖または軽鎖可変領域において、１アミノ酸の挿入、欠失、置換または付加を有する抗体であり得る。本発明の抗体は、配列番号：１７に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに結合し得るヒト化抗体であり、上記の抗体と重鎖または軽鎖可変領域において、２アミノ酸の挿入、欠失、置換または付加を有する抗体であり得る。

[0032] 本発明の抗体は、いずれも、抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体部分として用いることができる。

[0033] 本発明では、抗体－薬物コンジュゲートにおいて抗体と細胞傷害剤とは、リンカーを介して連結している。細胞傷害剤としては、化学療法剤（例えば、市販の抗がん剤などの抗がん剤、例えば、オーリスタチン（オーリスタチンＥ、オーリスタチンＦフェニレンジアミン（ＡＦＰ）、モノメチルオーリスタチンＥ、モノメチルオーリスタチンＦとそれらの誘導体）、メイタンシノイドＤＭ１およびＤＭ４とそれらの誘導体）、カンプトテシン（ＳＮ－３８、イリノテカン、ルートテカン、ＤＢ６７、ＢＭＰ１３５０、ＳＴ１４８１、ＣＫＤ６０２、トポテカンおよびエキサテカン、並びにそれらの誘導体）、ＤＮＡ副溝結合剤（エンジン、レキシトロプシン、デュオカルマイシンとそれらの誘導体）、タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセルとそれらの誘導体）、ポリケチド（ディスコデルモライドとその誘導体）、アントラキノ系（ミトキサントロンとその誘導体）、ベンゾジアゼピン（ピロロベンゾジアゼピン、インドリノベンゾジアゼピン、およびオキサゾリジノ

ベンゾジアゼピンとそれらの誘導体)、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、およびビノレルビンとそれらの誘導体)、ドキソルビン類(ドキソルビン、モルホリノードキソルビン、およびシアノモルホリノードキソルビンとそれらの誘導体)、強心配糖体(ジギトキシンやその誘導体)、カレキアマイシン、エポチロン、クリプトフィシン、セマドチン、セマドチン、リゾキシシン、ネトロプシン、コンブレタスタチン、エリユテロピン、エトポシド、T67(チュラリク)、およびノコダゾール)、放射性同位体(例えば、 ^{32}P 、 ^{60}Co 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{153}Sm 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、および ^{212}Bi)、および毒素(例えば、ジフテリアトキシンA、シュードモナスエンドトキシン、リシン、サポリン等)が挙げられ、本発明のADCにおける細胞傷害剤として用いることができる。本発明のADCにおける細胞傷害剤としては、好ましくは例えば、カンプトテシン、特にSN-38、またはエキサテカンを用いることができる。細胞傷害剤はいずれも、がんの治療に用いられるものを用いることができる。細胞傷害剤としては、上記細胞傷害剤の薬学上許容可能な塩、溶媒和物(例えば、水和物)、エステル、またはプロドラッグを用いてもよい。

[0034] 本発明では、ADCは、抗体と細胞傷害剤とがリンカーを介して連結していてもよい。本発明では、リンカーは、非開裂型リンカーであってもよいし、開裂型リンカーであってもよい。一般的なADCに用いられるリンカー構造は、様々なものが知られており、これらを適宜用いることができる。

[0035] 本発明のある態様では、ADCのリンカーはプラスミン切断配列を含み、プラスミン存在下で切断可能である。本発明では、ADCのリンカーは、プラスミン切断配列以外の部位は、投与後不溶性フィブリンに送達されるまでの過程で安定な化学結合からなる。このような構成とすることで本発明のADCは、投与後不溶性フィブリンに送達されるまで安定であり、かつ、不溶性フィブリンに結合した後にプラスミンにより切断され、不溶性フィブリン近傍でのみ細胞傷害剤を放出することとなる。プラスミン切断配列は、アミ

ノ酸配列であり、具体的には、バリニンーロイシンーリジン、グリシンープロリンーリジン、グルタミン酸ーリジンーリジン、リジンーフェニルアラニンーリジン、ノルバリニンークロロヘキシルアラニルーリジン、およびノルロイシンーヘキサヒドロチロシンーリジンからなる群から選択されるプラスミン切断配列などのアミノ酸配列を含むペプチド鎖であり得る。このようなリンカーは、ADCの作製において当業者であれば適宜選択し、合成することができる。ある態様では、リンカーは、例えば、抗体とプラスミン切断配列との間には第1のスペーサーが導入されていてもよく、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、例えば、1分子あたり繰り返し単位5～40程度のPEGを第1のスペーサーとして用いることができる。プラスミン切断配列と細胞傷害剤との間には第2のスペーサーが導入されていてもよく、例えば、p-アミノベンジルオキシカルボニル（PABC）を第2のスペーサーとして用いることができる。

ある態様では、リンカーは、第1のスペーサーおよびプラスミン切断配列を含む。ある態様では、リンカーは、第1のスペーサー、プラスミン切断配列、および第2のスペーサーを含む。ある特定の対象では、リンカーは、PEG、プラスミン切断配列、およびPABCを含む。

ある態様では、リンカーは、プラスミン切断配列以外の開裂性部分を含まない。

抗体とリンカーとの結合は、例えば抗体のスルフヒドリル基にマレイミド基を介して連結することができる。

ある態様では、抗体は、そのスルフヒドリル基を介して、マレイミドーPEGープラスミン切断配列を有するリンカーで抗がん剤と連結されている。ある態様では、抗体は、そのスルフヒドリル基を介して、マレイミドーPEGープラスミン切断配列ーPABCを有するリンカーで抗がん剤と連結されている。

いずれにしても、本発明のADCでは、抗がん剤は、プラスミンにより切断可能なプラスミン切断部位を有するリンカーで抗がん剤と連結されており

、当該ADCが不溶性フィブリンが蓄積した箇所に到達すると、その周囲に存在するプラスミンにより、リンカーがプラスミン切断部位で切断され、不溶性フィブリンの周辺に抗がん剤を放出する。がん組織の周辺には、がんの浸潤による出血に基づいて不溶性フィブリンが蓄積した箇所が多数存在していると考えられ（WO2018/203517の図8参照）、本発明の抗体（すなわち、不溶性フィブリン特異的抗体）は、薬物デリバリーシステムにおけるがんの標的化に有用であり、本発明のADCはがんの治療薬として有用であると考えられる。

[0036] 本発明のADCまたは医薬組成物の治療対象となるがんとしては、特に限定されないが、がん、例えば、肺がん、膵臓がん、頭頸部がん、前立腺がん、膀胱がん、乳がん、食道がん、胃がん、大腸がん、子宮がん、卵巣がん、皮膚がん、甲状腺がん、胸腺がん、腎臓がん、精巣がん、陰茎がん、肝臓がん、胆道がん、脳腫瘍、骨軟部腫瘍、後腹膜腫瘍、血管・リンパ管肉腫、およびこれらの転移性のがんが挙げられる。

[0037] 本発明の対象としては、血栓性障害若しくは血栓性障害を伴う疾患に罹患していない対象、または血栓性障害若しくは血栓性障害を伴う疾患であるとの診断がなされていない対象であり得る。これにより、がん以外の組織での副作用を軽減することが期待できる。従って、がんを有する対象が血栓性障害若しくは血栓性障害を伴う疾患に罹患しているか否かを決定し、その後、血栓性障害若しくは血栓性障害を伴う疾患に罹患していない対象に対して本発明のADCを投与してもよい。血栓性障害または血栓性障害を伴う疾患に罹患しているか否かは、医師により適宜判断することができる。

[0038] 本発明のある態様では、医薬組成物は、本発明のADCと賦形剤とを含む。本発明の医薬組成物は、静脈内投与、皮下投与、腫瘍内投与、腹腔内投与、脳室内投与、筋肉内投与等の投与方法により投与され得る。用量は、患者の年齢、性別、体重、疾患の重症度などを考慮して医師が適宜決定することができる。

[0039] 本発明のADCは、これらのがんの間質に蓄積する不溶性フィブリンを標

的化し、細胞傷害剤を当該標的化部位に蓄積させるが、それだけではなく、さらに不溶性フィブリンの存在する箇所では活性化されるプラスミンにより切断可能なリンカーを有し、標的化部位で細胞傷害剤を遊離させる。これにより、遊離部位周辺のがんを部位特異的に傷害することができる。

[0040] 本発明によれば、がんを治療することに用いるための医薬の製造における、不溶性フィブリン特異的抗体の使用が提供される。本発明によれば、がんを治療することに用いるための医薬の製造における、不溶性フィブリン特異的抗体と細胞傷害剤とのADCであって、抗体と細胞傷害剤がプラスミン切断可能なプラスミン切断部位を有する、ADCの使用が提供される。

[0041] 本発明によれば、がんをその必要のある対象において治療する方法であって、前記対象に治療上有効量の本発明のADC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、がんをその必要のある対象において治療する方法であって、がんを有する対象が血栓性障害若しくは血栓性障害を伴う疾患に罹患しているか否かを決定し、その後、血栓性障害若しくは血栓性障害を伴う疾患に罹患していない対象に対して治療上有効量の本発明のADCを投与することを含む方法が提供される。

[0042] 本発明によれば、がんを治療する方法に用いるための、本発明のADCの使用が提供される。

[0043] 本発明によれば、本発明の抗体は、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、本発明の抗体は、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（CHO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。

[0044] 本発明によれば、本発明の抗体またはその抗原結合性断片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、本発明の抗体またはその抗原結合性断片に加えて、薬学上許容可能な賦形剤をさらに含んでいてもよい。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。

[0045] 本発明の抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬組成物は、非経口投与（例えば、静脈内投与）により投与することができる。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。

[0046] 本発明の医薬組成物には、抗体またはその抗原結合性断片が、治療上有効量含まれ得る。

[0047] 本発明のある態様では、抗体は、体内イメージング（インビボイメージング）のための検出可能な標識と連結され得る。検出可能な標識としては、例えば、 ^{177}Lu 、 ^{111}In 、 ^{67}Cu 、 ^{18}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{124}I 、 ^{125}I および ^{131}I からなる群から選択される同位体を含む。検出可能な標識は、陽電子放射断層撮影（PET）剤であってもよく、これには ^{124}I 、 ^{89}Zr などが含まれるが、これらに限定されない。特定の態様において、第1および／または第2の抗体またはその抗原結合部分もしくは誘導体は放射性標識されている。放射性標識は、 ^{177}Lu 、 ^{111}In 、 ^{67}Cu 、 ^{18}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ のうち少なくとも1つであってもよい。

検出可能な標識は、インビトロおよび／またはインビボイメージングに適したいかなる標識であってもよい。イメージングには下記のうちいずれか１以上を含めることができる：平面放射性核種イメージング、陽電子放射断層撮影（PET）、エコー平面イメージング（EPI）、単一光子放射形コンピュータ断層撮影（SPECT）、超音波イメージング（たとえば、非放射性、コントラスト特異的、高周波数、二次元）、磁気共鳴イメージング（MRI；磁気共鳴断層撮影またはMRTとも呼ばれる）、X線、コンピュータ断層撮影（CT）スキャン、蛍光イメージング、近赤外イメージング、および医療に有用または適用できる他のイメージング法。したがって、これらの造影剤やこれらに適したイメージング剤が抗体と連結され得る。

[0048] 本発明によれば、体内イメージング（インビボイメージング）のための検出可能な標識と連結した本発明の抗体、および当該抗体を含む、診断薬または診断キットが提供される。

[0049] 本発明によれば、対象において体内のフィブリンを観察する方法であって、対象に体内イメージング（インビボイメージング）のための検出可能な標識と連結した本発明の抗体の有効量を投与することを含む、方法が提供される。

実施例

[0050] 実施例１：ヒト化１１０１抗体およびヒト化９９抗体の作製

WO 2018/203517に記載された１１０１クローンが産生する抗体（１１０１抗体）および９９クローンが産生するモノクローナル抗体（９９抗体）をヒト化して、それぞれヒト化１１０１抗体およびヒト化９９抗体を得た。ヒト化に当たってはCDRの配列を変更して不溶性フィブリンへの結合親和性を向上させた。

[0051] 得られたヒト化１１０１抗体およびヒト化９９抗体を用いて、不溶性フィブリンに対する結合性をELISAアッセイで確認した。ウシ血清アルブミン（BSA）、フィブリノーゲン（FNG）、可溶性フィブリン（SF）、フィブリン分解物（FDP）、および不溶性フィブリン（IF）をコートし

たELISAを用意した。ELISAプレート表面を1%BSAと0.05%Tween 20を含むTBS-Tでブロッキングし、HRP標識したヒト化1101抗体およびHRP標識したヒト化99抗体を添加し、反応させた。HRPの基質であるTMB試薬を加えて発色させ、マイクロプレートリーダー (SpectraMax Paradigm, molecular Device) を用いて発色を検出した。発色強度の結果は図1に示される通りであった。図1に示される通り、ヒト化99抗体もヒト化1101抗体も、不溶性フィブリンに特異的に結合した。

[0052] 次に、変性フィブリノーゲンに対するヒト化1101抗体およびヒト化99抗体の結合性をウェスタンブロッティングによって確認した。フィブリノーゲン溶液を2-メルカプトエタノールおよびSDSを含むローディング緩衝液で希釈し、95℃で加熱して変性フィブリノーゲンを得た。得られた変性フィブリノーゲンをSDS-PAGEに供し、PVDFメンブレンに転写した後に、Starting Block™ (TBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher) でブロッキングした。その後、メンブレンにヒト化1101抗体およびヒト化99抗体を反応させた。変性フィブリノーゲンは、ヒト化1101抗体およびヒト化99抗体が結合する不溶性フィブリンに特異的に露出する部位を、不溶性フィブリン同様に露出するため、ヒト化1101抗体およびヒト化99抗体が結合することができる。メンブレンを洗浄し、ブロッキングした後に、二次抗体としてHRP標識抗ヒトIgG抗体 (Bethyl)、発光試薬にはECL (商標) Prime Western Blotting Detection Reagent (Thermo Fisher) を用いてウェスタンブロッティングを行った。撮影および画像解析はChemidocイメージングシステム (Bio-rad) で行った。結果は、図2に示されるように、ヒト化1101抗体およびヒト化99抗体はいずれも0.04 μg/mLの濃度で、変性フィブリンを検出することができた。

[0053] さらにヒト化1101抗体およびヒト化99抗体を用いて免疫組織化学染

色（IHC染色）を試みた。腭がんモデルマウス（HE-PKCマウス）の腭臓組織切片を常法によりパラホルムアルデヒドで固定し、切片を作製した。1%BSAを含むPBSでブロッキングし、ヒト化1101抗体およびヒト化99抗体（10mgまたは1mg）を得られた組織切片と反応させた。二次抗体としてAlexa 647標識抗ヒトIgG（Jackson ImmunoTechnology）、核染色試薬としてDAPIを用いて切片を染色した。切片の撮影はバーチャルスライド（オリンパスライフサイエンス）、画像解析はOlyviaを用いた。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、得られたヒト化1101抗体およびヒト化99抗体はIHC染色に有用であることが分かった。

[0054] 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4に示される通りであった。図4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。

[0055] 次に、ヒト化99抗体およびヒト化1101抗体を発現する組換えCHO細胞を作製した。産生されたヒト化1101抗体およびヒト化99抗体の粒子サイズ（nm）をDelsa（商標）Nano HC（Beckman Coulter）を用いて測定した。結果は、図5に示される通りであった。図5に示されるようにヒト化1101抗体およびヒト化99抗体は単分散の粒子サイズ分布を示し、ヒト化1101抗体の方が粒子サイズが均一であることが明らかになった。

[0056] 配列表

配列番号1：ヒト化抗フィブリン抗体1101クローンの重鎖CDR1のアミノ酸配列

配列番号2：ヒト化抗フィブリン抗体1101クローンの重鎖CDR2のア

ミノ酸配列

配列番号 3 : ヒト化抗フィブリン抗体 1 1 0 1 クローンの重鎖 C D R 3 のア

ミノ酸配列

配列番号 4 : ヒト化抗フィブリン抗体 1 1 0 1 クローンの軽鎖 C D R 1 のア

ミノ酸配列

配列番号 5 : ヒト化抗フィブリン抗体 1 1 0 1 クローンの軽鎖 C D R 2 のア

ミノ酸配列

配列番号 6 : ヒト化抗フィブリン抗体 1 1 0 1 クローンの軽鎖 C D R 3 のア

ミノ酸配列

配列番号 7 : 抗フィブリン抗体 1 1 0 1 クローンの重鎖可変領域のアミノ酸

配列

配列番号 8 : 抗フィブリン抗体 1 1 0 1 クローンの軽鎖可変領域のアミノ酸

配列

配列番号 9 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの重鎖 C D R 1 のアミノ

酸配列

配列番号 1 0 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの重鎖 C D R 2 のアミ

ノ酸配列

配列番号 1 1 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの重鎖 C D R 3 のアミ

ノ酸配列

配列番号 1 2 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの軽鎖 C D R 1 のアミ

ノ酸配列

配列番号 1 3 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの軽鎖 C D R 2 のアミ

ノ酸配列

配列番号 1 4 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの軽鎖 C D R 3 のアミ

ノ酸配列

配列番号 1 5 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの重鎖可変領域のアミ

ノ酸配列

配列番号 1 6 : ヒト化抗フィブリン抗体 9 9 クローンの軽鎖可変領域のアミ

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)