(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-510613
(P2018-510613A)
(43)公表日　平成30年4月19日(2018.4.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	4B065
C12N 5/0781	(2010.01)	C12N	5/0781		4C084
C12N 9/99	(2006.01)	C12N	9/99		4C085
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 118 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-536340 (P2017-536340)
(86)(22)出願日　平成28年1月11日 (2016.1.11)
(85)翻訳文提出日　平成29年8月29日 (2017.8.29)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/050380
(87)国際公開番号　WO2016/110598
(87)国際公開日　平成28年7月14日 (2016.7.14)
(31)優先権主張番号　15150691.2
(32)優先日　平成27年1月9日 (2015.1.9)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　517237654
マブイミューン　ダイアグノスティックス　エイジー
MABIMMUNE　DIAGNOSTICS　AG
スイス連邦、ＣＨ－８９５２　シュリーレン、ワジストラッセ　１３
Ｗａｇｉｓｔｒａｓｓｅ　１３，８９５２　Ｓｃｈｌｉｅｒｅｎ　（ＣＨ）
(71)出願人　511029420
ニューリミューン　ホールディング　エイジー
スイス連邦、ＣＨ－８９５２　シュリーレン、ヴァジストラッセ　１３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規な抗線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）抗体およびその派生使用

(57)【要約】
線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）について特異的であり、好ましくは、ＦＡＰの酵素活性を選択的に阻害することができる新規なヒト由来抗体、ならびに、該抗体に関連づけられる方法が提供される。加えて、ＦＡＰに伴う疾患およびその処置を診断し、かつ／またはモニターする方法が提供される。ＦＡＰについて特異的である抗体に関連づけられるアッセイおよびキットもまた開示される。新規な抗ＦＡＰ抗体は、ＦＡＰが標的とされる免疫療法および診断学のための医薬組成物および診断組成物において使用することができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトメモリーＢ細胞由来の抗線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）モノクローナル抗体。
【請求項２】
前記抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）の少なくとも１つ、および／または可変重鎖（V_H）および／または可変軽鎖（V_L）が、抗ＦＡＰ抗体を産生したヒトメモリーＢ細胞から得られるｍＲＮＡに由来するｃＤＮＡによってコードされる、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
捕捉された、または直接に被覆されたヒトＦＡＰおよび／またはそのフラグメント（３７８－ＨＹＩＫＤＴＶＥＮＡＩＱＩＴＳ－３９２（配列番号２７）、６２２－ＧＷＳＹＧＧＹＶＳＳＬＡＬＡＳ－６３６（配列番号２８）および７２１－ＱＶＤＦＱＡＭＷＹＳＤＱＮＨＧＬ－７３６（配列番号２９））に０．１μＭ以下のＥＣ５０により結合することができる、請求項１または２に記載の抗体。
【請求項４】
１５アミノ酸長のペプチドに含まれるＦＡＰエピトープと結合することができる、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体であって、前記エピトープは下記のアミノ酸配列を含む、または下記のアミノ酸配列からなる抗体：ＮＩ－２０６．８２Ｃ２（５２１－ＫＭＩＬＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３０）；５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰＬＬＩＱ－５３９（配列番号３１）；および／または５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３２））；
ＮＩ－２０６．５９Ｂ４（５３－ＳＹＫＴＦＦＰ－５９（配列番号３３））；
ＮＩ－２０６．２２Ｆ７（３８１－ＫＤＴＶＥＮＡＩＱＩＴ－３９１（配列番号３４））；
ＮＩ－２０６．２７Ｅ８（１６９－ＮＩＹＬＫＱＲ－１７５（配列番号３５））；
ＮＩ－２０６．１２Ｇ４（４８１－ＴＤＱＥＩＫＩＬＥＥＮＫＥＬＥ－４９５（配列番号３６））；または
ＮＩ－２０６．１７Ａ６（７７－ＶＬＹＮＩＥＴＧＱＳＹ－８７（配列番号３７））。
【請求項５】
ＦＡＰのプロテアーゼ活性を阻害することができ、好ましくは、プロリルエンドペプチダーゼ（ＰＥＰ）基質であるＮ－カルボベンゾキシ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－７－アミド－４－メチルクマリン（Ｚ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ）または直接的クエンチドゼラチン（ＤＱ－ゼラチン）の組換えヒトＦＡＰ（ｒｈｕＦＡＰ）媒介切断を０．１μＭ以下のＩＣ５０により阻害することができる、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項６】
ヒト血漿の血餅形成時間を延長することができる、または、ヒト血漿の血餅堅さを低下させることができる、請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項７】
その可変領域または結合ドメインにおいて、
（ａ）図１Ａ～図１Ｆのいずれか１つに示されるV_H鎖アミノ酸配列および／またはV_L鎖アミノ酸配列の少なくとも１つのＣＤＲ；
（ｂ）図１Ａ～図１Ｆに示されるV_H鎖アミノ酸配列および／またはV_L鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列；
（ｃ）（ａ）の前記アミノ酸配列のいずれか１つの部分的変化から生じるアミノ酸配列からなる少なくとも１つのＣＤＲ；あるいは
（ｄ）（ｂ）の前記アミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を含むV_H鎖および／またはV_L鎖
を含み、好ましくは、前記アミノ酸配列における変化の数が５０％未満である、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体。
【請求項８】

膜貫通ＦＡＰに結合することができる、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体。

【請求項９】

ＦＡＰに対する結合アビディティーが、中性ｐＨまたは生理学的ｐＨよりも酸性ｐＨのもとで大きく、好ましくは、前記酸性ｐＨが６．４または６．８であり、前記生理学的ｐＨが７．４である、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１０】

その可変領域または結合ドメインにおいて、

（ａ）図１Ａのいずれか１つに示されるV_H鎖アミノ酸配列および／またはV_L鎖アミノ酸配列の少なくとも１つのＣＤＲ；

（ｂ）図１Ａに示されるV_H鎖アミノ酸配列および／またはV_L鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列；

（ｃ）（ａ）の前記アミノ酸配列のいずれか１つの部分的変化から生じるアミノ酸配列からなる少なくとも１つのＣＤＲ；あるいは

（ｄ）（ｂ）の前記アミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を含むV_H鎖および／またはV_L鎖

を含み、好ましくは、１５アミノ酸長のペプチドに含まれるＦＡＰエピトープと結合することができ、該エピトープは、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなる、請求項１～９のいずれか一項に記載の抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体。

【請求項１１】

ＦＡＰのプロテアーゼ活性を阻害すること、ならびに／あるいは、ヒト血漿の血餅形成時間を延長すること、またはヒト血漿の血餅堅さを低下させることが可能である薬剤であって、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなるＦＡＰのエピトープと結合するために、請求項１０に記載の抗体と競合することができることを特徴とし、好ましくは抗ＦＡＰ抗体である、薬剤。

【請求項１２】

ヒト定常領域を含み、かつ／または、免疫グロブリンのＦｃ領域もしくは前記Ｆｃ領域と同等な領域を含み、好ましくは前記Ｆｃ領域がＩｇＧのＦｃ領域である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１３】

全長のＩｇＧクラスの抗体である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１４】

糖鎖工学操作されたＦｃ領域を含み、かつ、糖鎖工学操作されていない抗体と比較して、Ｆｃ領域における非フコシル化オリゴ糖の割合が増大している、請求項１～１３のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１５】

キメラなマウス－ヒト抗体またはマウス化抗体である、請求項１～１４のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１６】

単鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメントおよび$F(ab')_2$フラグメントからなる群から選択される、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１７】

二重特異性抗体であり、好ましくはＦＡＰおよび細胞死受容体５（ＤＲ５）に結合する二重特異性抗体であり、ＤＲ５に特異的な少なくとも１つの抗原結合部位を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１８】

請求項１～１７のいずれか一項に記載の抗体の一部を形成する抗体V_H鎖および／または抗体V_L鎖を少なくともコードし、好ましくはｃＤＮＡであるポリヌクレオチド。

【請求項１９】
請求項１８に記載のポリヌクレオチドを、必要な場合には発現制御配列に機能的に連結した状態で含むベクター。
【請求項２０】
請求項１６に記載のポリヌクレオチド、または、請求項１７に記載のベクターを含む宿主細胞であって、前記ポリヌクレオチドが当該宿主細胞にとって異種である、宿主細胞。
【請求項２１】
抗ＦＡＰ抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体を調製するための方法であって、
（ａ）請求項２０に記載の細胞を培養すること、および
（ｂ）前記抗体を培養物から単離すること、
を含む、方法。
【請求項２２】
請求項２１に記載のポリヌクレオチドによってコードされるか、または、請求項１９に記載の方法によって得られる抗体。
【請求項２３】
（ｉ）検出可能な標識（好ましくは、酵素、放射性同位体、蛍光団および重金属からなる群から選択される検出可能な標識）を含み、かつ／または
（ｉｉ）薬物（好ましくは細胞傷害性薬剤）に結合させられる、
請求項１～１７または２２のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項２４】
請求項４～１０のいずれか一項に記載の抗体によって特異的に認識されるＦＡＰのエピトープを有するペプチド（好ましくは、１１アミノ酸長～２０アミノ酸長のペプチド）であって、請求項４において定義されるようなアミノ酸配列、好ましくは、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列、または、１つもしくは複数のアミノ酸が置換され、欠失され、かつ／もしくは付加される改変配列を含む、あるいは、そのようなアミノ酸配列または改変配列からなる、ペプチド。
【請求項２５】
請求項１～１７、２２または２３のいずれか一項に記載の抗体、請求項１１に記載の薬剤、請求項１８に記載のポリヌクレオチド、請求項１９に記載のベクター、請求項２０に記載の細胞、あるいは、請求項２４に記載のペプチドを含む組成物であって、好ましくは、
（ｉ）医薬組成物であり、かつ、薬学的に許容され得る担体をさらに含み、好ましくは、ワクチンであり、かつ／または、ＦＡＰに伴う疾患を防止もしくは処置するために有用であるさらなる薬剤を含む、あるいは
（ｉｉ）診断組成物であり、好ましくは、免疫または核酸に基づく診断方法において従来から使用される試薬をさらに含む診断組成物である、組成物。
【請求項２６】
ＦＡＰに伴う疾患、好ましくは、ガン、例えば、乳ガン、結腸直腸ガン、卵巣ガン、前立腺ガン、膵臓ガン、腎臓ガン、肺ガン、上皮ガン、メラノーマ、線維肉腫、骨肉腫および結合組織肉腫、腎細胞ガン、巨細胞ガン、扁平上皮ガン、腺ガン、多発性骨髄腫など；組織再構成および／または慢性炎症によって特徴づけられる疾患、例えば、線維性疾患、創傷治癒障害、ケロイド形成障害、変形性関節症、関節リウマチ、軟骨分解障害、アテローム硬化性疾患およびクローン病など；心臓血管障害、例えば、アテローム性動脈硬化、卒中または急性冠動脈症候群（例えば、心筋梗塞、心臓発作、血栓症（脳静脈血栓症、深部静脈血栓症または肺塞栓症を含む）、脆弱性アテローム斑またはアテローム血栓症など；内分泌学的機能不全を伴う障害、例えば、グルコース代謝の障害など；ならびに血液凝固障害からなる群から選択されるＦＡＰに伴う疾患の予防的処置または治療的処置において使用するための、請求項１～１７、２２または２３のいずれか一項に記載の抗ＦＡＰ抗体、請求項１１に記載の薬剤、請求項１８に記載のポリヌクレオチド、請求項１９に記載

のベクター、請求項２０に記載の細胞、請求項２４に記載のペプチド、あるいは、請求項２５に記載の組成物。

【請求項２７】

ヒトまたは動物の身体におけるＦＡＰ発現細胞またはその組織のインビボ検出またはインビボ画像化、あるいは、ヒトまたは動物の身体におけるＦＡＰ発現細胞またはその組織に治療剤および／または診断剤を標的化することにおいて使用するための、請求項１～１７、２２または２３のいずれか一項に記載の抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含むＦＡＰ結合性分子であって、好ましくは前記インビボ画像化が、シンチグラフィー、陽電子放射断層撮影法（ＰＥＴ）、単一光子放射型断層撮影法（ＳＰＥＣＴ）、近赤外（ＮＩＲ）光学的画像法または磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を含む、ＦＡＰ結合性分子。

【請求項２８】

（ｉ）対象が、請求項２６で定義される、ＦＡＰに伴う疾患に罹患しているかどうか、または、対象が、ＦＡＰ特異的な治療剤による処置に適するかどうかを診断するインビトロ方法であって、前記対象の体液（好ましくは血液）に由来するサンプルにおいてＦＡＰの存在を明らかにすることを含み、コントロールサンプルと比較したＦＡＰレベルの上昇が、前記疾患、および前記薬剤による前記処置のための可能性があることの指標となる、インビトロ方法、あるいは

（ｉｉ）治療薬剤による前記疾患の処置をモニターする、または、候補薬剤（好ましくは抗ＦＡＰ抗体）の治療有用性を明らかにするインビトロ方法であって、ＦＡＰのレベルを、前記薬剤を前記対象に投与した後の前記対象の体液（好ましくは血液）に由来するサンプルにおいて明らかにすることを含み、前記対象の前記サンプルにおけるＦＡＰの非存在またはコントロールと比較したＦＡＰレベルの低下が、前記処置における進展および前記薬剤の治療有用性の指標となる、インビトロ方法、

であって、ＦＡＰの前記レベルが、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなるＦＡＰのエピトープを検出することによって求められることを特徴とする、インビトロ方法。

【請求項２９】

請求項２６で定義される、ＦＡＰに伴う疾患に罹患する、または、そのような疾患を発症する危険性がある患者の処置において使用するための治療剤であって、患者の血液のサンプルのＦＡＰレベルがコントロールと比較して上昇しており、前記ＦＡＰレベルが、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列からなる、またはそのようなアミノ酸配列を含むＦＡＰのエピトープを検出することによって明らかにされることを特徴とし、好ましくは、前記患者は請求項２８に記載の方法に従って診断されている、治療剤。

【請求項３０】

前記ＦＡＰレベルが、前記サンプルを抗ＦＡＰ抗体に供し、ＦＡＰと前記抗体との間で形成される複合体の存在を、好ましくは免疫沈殿またはサンドイッチＥＬＩＳＡによって検出することによって求められる、請求項２８に記載の方法、または、請求項２９に従って使用するための薬剤。

【請求項３１】

血液凝固障害の処置において使用するための抗ＦＡＰ抗体、または、血液の凝固をインビトロにおいて遅らせるための抗ＦＡＰ抗体の使用。

【請求項３２】

前記抗体が、請求項１～１７、２２または２３のいずれか一項に記載の抗体である、請求項３０に従って使用するための方法もしくは薬剤、請求項３１に従って使用するための抗ＦＡＰ抗体、または、請求項３１に記載の使用。

【請求項３３】

請求項２８、３０または３２のいずれか一項に記載の方法において、あるいは、請求項３１または３２に記載の使用において有用なキットであって、請求項１～１７、２２または２３のいずれか一項に記載の少なくとも１つの抗体、請求項１１に記載の薬剤、請求項

１８に記載のポリヌクレオチド、請求項１９に記載のベクター、請求項２０に記載の細胞、請求項２４に記載のペプチド、または、請求項２５に記載の組成物を、必要な場合には使用のための試薬および／または説明書と一緒に含むキット。

【請求項３４】

（ｉ）請求項２８、３０または３２のいずれか一項に記載の方法を行うための手段、好ましくは、請求項３３に記載のキットの構成成分のいずれか１つ、および、（ｉｉ）請求項２９、３０または３２に従って使用するための薬剤を、必要な場合には使用のための説明書と一緒に含む医薬包装物または製造品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は概して、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に伴う疾患の抗体ベースの治療および診断に関連する。具体的には、本発明は、ＦＡＰによって誘発される疾患および状態を処置することにおいて有用である、ヒトＦＡＰおよびそのエピトープに特異的に結合する新規な分子（特に、ヒト由来組換え抗体、ならびに、そのフラグメント、生物工学誘導体および合成誘導体、ならびに同等なＦＡＰ結合薬剤）に関連する。特定の局面において、選択的かつ強力なＦＡＰ阻害剤が提供される。加えて、本発明は、ＦＡＰに伴う疾患を特定するための診断ツールとしても有益であるそのような抗体および薬剤を含む医薬組成物および診断組成物に関連し、また、ＦＡＰに伴う疾患（例えば、様々なガン、炎症性疾患および心臓血管疾患ならびに血液凝固障害など）を処置するための本発明の抗体の新規なエピトープを含む抗原による受動的ワクチン接種戦略、ならびに、能動的ワクチン接種に関連する。

【０００２】

さらに、本発明は、例えば、腫瘍組織における高まったＦＡＰ活性（特にプロテアーゼ活性）によって誘発される疾患または状態を診断する方法であって、前記疾患または状態が、本発明によれば、前記疾患または状態に罹患する対象の体液（特に血液）における増大したレベルのＦＡＰおよびＦＡＰの特定のエピトープによってそれぞれ反映される方法に関連する。この発見はまた、治療薬剤によるＦＡＰ誘発疾患の処置をモニターする、または、候補薬剤、好ましくは抗ＦＡＰ抗体の治療有用性を明らかにする新規な方法で、ＦＡＰのレベルを、前記薬剤を対象に投与した後の対象の体液（好ましくは血液）に由来するサンプルにおいて明らかにすることを含み、コントロールと比較される前記対象の前記サンプルにおけるＦＡＰの非存在または低下したレベルにより、前記処置における進展および前記薬剤の治療有用性がそれぞれ示される方法であって、ＦＡＰのレベルがＦＡＰの特定のエピトープを検出することによって明らかにされることを特徴とする方法を開発することにつながった。

【背景技術】

【０００３】

ヒト線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ；Ｇｅｎｂａｎｋアクセション番号ＡＡＣ５１６６８；ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿００４４６０．３）は、セプラーゼとしてもまた知られており、１７０ｋＤａの内在性膜セリンペプチダーゼ（ＥＣ３．４．２１．Ｂ２８）である。ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰＩＶ、これはＣＤ２６としてもまた知られている；Ｇｅｎｂａｎｋアクセション番号Ｐ２７４８７）（近縁関係にある細胞表面酵素）および他のペプチダーゼと一緒に、ＦＡＰはジペプチジルペプチダーゼＩＶファミリーに属する（Ｙｕ他、ＦＥＢＳ Ｊ．２７７（２０１０）、１１２６～１１４４）。ＦＡＰは、酵素の触媒作用ドメインが位置する大きいＣ末端側の細胞外ドメインを有する２つのＮ－グリコシル化サブユニットを含有するホモ二量体である（Ｓｃａｎｌａｎ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１（１９９４）、５６５７～５６６１）。ＦＡＰはそのグリコシル化形態において、ポストプロリルジペプチジルペプチダーゼ活性およびゼラチナーゼ活性の両方を有する（Ｓｕｎ他、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．２４（２００２）、２７４～２８１）。したがって、ＦＡＰは、ゼラチンおよび

Ｉ型コラーゲンを切断する、ジペプチジルペプチダーゼ活性、ならびに、エンドペプチダーゼ活性をともに有するセリンプロテアーゼである。

【０００４】

ヒトＦＡＰは、最初は、（特許文献１に記載される）モノクローナル抗体（ｍＡｂ）Ｆ１９（ＡＴＣＣ番号ＨＢ８２６９）を使用して、培養された線維芽細胞において特定された。このタンパク質の様々なホモログが、マウスを含めて、いくつかの種において見出された（非特許文献１）。ヒトＦＡＰと、マウスＦＡＰとは、８９％の配列同一性が両者の間にはあり、類似する機能的相同性を有する。ＦＡＰは特異な組織分布を有する：その発現が、肺ガン、結腸直腸ガン、膀胱ガン、卵巣ガンおよび乳ガンを含めて、すべての原発性上皮腫瘍および転移性上皮腫瘍の９０％超の反応性間質線維芽細胞において非常にアップレギュレーションされ、一方、正常な成体組織には一般に存在しないことが見出された（非特許文献２）。その後の報告により、ＦＡＰが間質線維芽細胞において発現されるだけではなく、上皮起源のいくつかのタイプの悪性細胞においてもまた発現されること、そして、ＦＡＰの発現が悪性表現型と直接に相関することが示された（非特許文献３）。

【０００５】

多くの一般的なガンにおけるその発現および正常な組織におけるその限定された発現のために、ＦＡＰは、様々なガン腫の画像化、診断および治療のための有望な抗原性標的であると見なされている。したがって、検出可能な標識または細胞傷害性薬剤をＦＡＰ発現のガン腫細胞に対して標的化することをほとんど常に目的として、研究、診断および治療の様々な目的のためにＦＡＰに対する、多数のモノクローナル抗体が作製されている。例えば、シブロツズマブ（Ｓｉｂｒｏｔｕｚｕｍａｂ）／ＢＩＢＨＩ、すなわち、阻害性ではないが、ヒトＦＡＰに特異的に結合する（特許文献２に記載される）Ｆ１９抗体のヒト化型、および、Ｆ１９エピトープ特異性を有するＦＡＰ抗原に対するさらなるヒト化抗体またはヒト様抗体（非特許文献４；および特許文献３に記載される）が、ファージディスプレー技術およびヒトＶレパートリーを使用して開発された。この場合、Ｆ１９のＶＬ領域およびＶＨ領域が、Ｆ１９エピトープ特異性を維持するために元の１５アミノ酸長のＨＣＤＲ３配列を保持しながら、類似のヒトＶ領域によって置き換えられたか、あるいは、Ｆ１９抗体が、元のマウス抗体と同じエピトープまたは近縁エピトープを認識するｓｃＦｖを選択するために指針として使用されている。ＯＳ４抗体が、Ｆ１９抗体の別のヒト化（ＣＤＲグラフト化）型であり（非特許文献５）、一方、ｓｃＦｖ３３およびｓｃＦｖ３６は、Ｆ１９とは異なる結合特異性を有し、ヒトおよびマウスのＦＡＰタンパク質について交差反応性である（非特許文献６）。他のマウス抗ＦＡＰ抗体、ならびに、それらのキメラ型およびヒト化型が開発された（特許文献４、非特許文献７）。加えて、ヒト様の抗ＦＡＰ抗体、すなわち、ファージディスプレー技術を使用するＦａｂフラグメントが記載された（特許文献５）。この場合、選択が、ヒトＦＡＰまたはマウスＦＡＰの細胞外ドメインに対して行われた。

【０００６】

腫瘍間質におけるプロテアーゼは、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）成分のタンパク質分解を介して、様々なプロセス（例えば、血管形成および／または腫瘍細胞遊走など）を促進させる。そのうえ、腫瘍間質は、重要な役割を腫瘍の栄養供給および酸素供給において、ならびに、腫瘍の侵入および転移において果たしている。これらの本質的な機能により、ＦＡＰは、診断標的だけではなく、潜在的な治療標的にもなっている。抗ＦＡＰ抗体を使用する生体内腫瘍間質標的化の概念の実現可能性のための証拠が、１３１－ヨウ素で標識されたＦ１９抗体によるフェーズ１臨床研究で得られ、この臨床研究では、腫瘍における当該抗体の特異的な集積および転移物の特異的な検出が明らかにされた（非特許文献８）。同様に、シブロツズマブによるフェーズ１研究では、１３１Ｉ標識された抗体の特異的な腫瘍蓄積が明らかにされた（非特許文献９）。しかしながら、転移性結腸直腸ガンの患者における非コンジュゲート化シブロツズマブの初期フェーズＩＩ治験が、腫瘍進行を阻害することにおける当該抗体の効力が不十分であるために中断された（非特許文献１０）。加えて、２６名のシブロツズマブ処置患者のうちの８名がヒト抗ヒト抗体（ＨＡＨＡ

）を発達させ、薬物動態学における変化および低下した腫瘍取り込みが２６名の患者のうちの４名で認められた（非特許文献１１）。また、より近年に開発された抗ＦＡＰ抗体は、抗腫瘍効果を非コンジュゲート化形態においてインビボで示すことができなかった（特許文献６）。

【０００７】

より近年には、再びファージディスプレー技術を使用して、ＦＡＰに対する３回のパンニングの後の単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）から、非機能的なｓｖＦｖコントロールと比較して、蛍光性基質Ａｌａ－Ｐｒｏ－７－アミド－４－トリフルオロメチルクマリンのＦＡＰ切断の３５％を弱めることができ、１．５桁大きい親和性を示した阻害性ｓｃＦｖ抗体（Ｅ３と名づけられる）がもたらされた（非特許文献１２）。しかしながら、推定ＥＣ５０値が極めて低く、すなわち、約2×10^{-7}ＭのｋＤを有し、ＦＡＰ酵素活性のほんのおよそ３５％の阻害が１７．８５μＭ（１００μｇ）のＥ３において認められただけであり、酵母親和性成熟化の後でさえ、最も良好な変異体は単に、Ｅ３よりも４倍および３倍大きい親和性（４倍）およびＦＡＰ酵素活性に対する高まった阻害効果をそれぞれ示しただけであった。したがって、かなり低い親和性および阻害効果の両方を考慮すると、このｓｃＦｖ自体の治療有用性は期待されないかもしれない。それどころか、著者らは、このｓｃＦｖそのものまたはその派生ＩｇＧはそれにもかかわらず、ＦＡＰ陽性の腫瘍間質のインビボ標的化を調べるための有用な臨床試薬であるかもしれないと結論した。ＦＡＰ標的化に関する報告を考慮すると、今までのところ、大きい親和性と、ＦＡＰのプロテアーゼ活性に対する顕著な阻害効果とを有する抗ＦＡＰ抗体を開発することは実現可能でないかのように思える。

【０００８】

別のＦＡＰ標的化薬物が、Ｐｏｉｎｔ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓによって開発されるタラボスタット（Ｔａｌａｂｏｓｔａｔ）である。タラボスタット（これはＰＴ－１００またはＶａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏとしてもまた知られている）、すなわち、プロリルボロン酸は、元々はＤＰＰＩＶ阻害剤として開発されたものであり、ＦＡＰ、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９およびＰＯＰ／ＰＲＥＰもまた阻害することが示されている。転移性ガンの実験的処置の検討から、タラボスタットがまた、ＦＡＰ、および、結果としてガン成長を阻害するために有用であり得るという可能性が生じた（非特許文献１３）。タラボスタットはまた、阻害活性を水性媒体（ｐＨ７．８）では環化のために急速に失う（非特許文献１４）。この制限にもかかわらず、Ｖａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏ処置が、ガン患者を処置するために数日間にわたって使用されたとき、Ｍｅｔ－ａ２ＡＰ／Ａｓｎ－ａ２ＡＰ比がヒトにおいて有意に増大し、このことから、この薬物療法により、ＦＡＰ活性がある程度阻害されることが示唆された（非特許文献１５）。

【０００９】

転移性結腸直腸ガンの患者において、タラボスタットが、１日に２回での２００ｍｇでＰＯ投与された。１，２００μｇが、元気な患者におけるタラボスタットの最大耐量であるという報告（非特許文献１６）にもかかわらず、治験は、Ｖａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏが、１日に２回で服用される４００μｇ（８００μｇの１日総量）で経口により与えられる患者により開始された。しかしながら、３名の患者を登録した後、おそらくはＶａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏに関連づけられると考えられるが、３番目の患者が腎不全で死亡し、最初の２名の患者が穏やかな毒性（浮腫、発熱）を示したとき、１日に２回での２００μｇ（４００μｇの１日総量）のプロトコルが修正された。Ｉ度を超える非血液学的毒性を何ら示さなかった場合、４週間の処置の後で、１日に２回での３００μｇ（６００μｇの１日総量）への１回の患者内用量増加が許された。したがって、用量を制限する毒性のために、４００μｇ～６００μｇの間の１日用量が評価された。

【００１０】

４００μｇ～６００μｇの１日総量のこの服用療法では、タラボスタットはおよそ９５％の血漿ジペプチジルペプチダーゼ活性（ほとんどの場合、ＦＡＰおよびＤＰＰＩＶの組合せ）を阻害し、しかし、ほんのおよそ１８％のポストプロリン特異的エンドペプチダー

ゼ（ほとんどの場合にはＦＡＰ特異的な）活性を阻害しただけであり、このことは、ＦＡＰが効果的に阻害されなかったことを示唆した。より高い濃度のエクスビボで加えられたタラボスタット（１０μＭ）はＦＡＰ特異的活性の７５％のさらなる阻害をもたらし、このことから、血漿ＦＡＰ活性のほんの一部がこれらの患者において阻害されたことが明らかにされた。これらのデータはまた、腫瘍におけるＦＡＰ活性がわずかに阻害されたことを示唆する。したがって、タラボスタット研究の臨床結果はＦＡＰ阻害そのものに起因するのではなく、むしろ、臨床効果は大部分が、標的以外への結合と、ＤＰＰＩＶ、ＤＰＰ８およびＤＰＰ９の阻害とに起因したことが明白である（非特許文献１７）。

【００１１】

Ｖａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏはまた、ジペプチジルペプチダーゼ（例えば、ＤＰＰＩＶ、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９など）およびプロリルオピゴペプチダーゼ（ｐｒｏｌｙｌｏｐｉｇｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ）（ＰＯＰ）を阻害し、サイトカイン活性およびケモカイン活性をアップレギュレーションした（非特許文献１７）。これらの患者において報告される用量制限毒性は主に、重度の副作用を動物治験においてもたらす細胞質のＤＰＰ８およびＤＰＰ９の阻害のためであると考えられるサイトカイン作用と一致していた。ラットにおいて、ＤＰＰ８／９の阻害は、脱毛症、血小板減少症、網状赤血球減少症、肥大膵臓、多臓器組織学的変化および死亡をもたらした。イヌにおいて、ＤＰＰ８／９の阻害は胃腸毒性をもたらした（非特許文献１８）。しかしながら、ＤＰＰＩＶの阻害は、動物およびヒトにおいて安全であることが示されている（非特許文献１９）。

【００１２】

Ｖａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏ処置のための臨床エンドポイントは、上皮ガンの患者を処置することにおいて満たされなかったが、この単剤研究は、ＦＡＰ阻害の薬力学的影響を調べることを可能にし、したがって、インビボにおけるＦＡＰ酵素活性に対するＶａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏの影響に関する有益な情報を提供することを可能にした（非特許文献１７）。ＦＡＰ酵素活性が、ＤＰＰ－ＩＶのようなエキソペプチダーゼによって切断され得ないエンドペプチダーゼ基質を使用してＶａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏ処置の前および期間中の患者血漿サンプルで分析された。ＦＡＰ選択的な酵素活性が、処置前のレベルと比較して処置の期間中には低下し、このことは、Ｖａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏがＦＡＰの酵素活性をインビボで阻害し得ることを示していた。しかしながら、ＦＡＰの阻害は、推定されたＦＡＰ酵素活性のほんのおよそ２０％が阻止されたので、利用された用量では部分的にすぎなかった。エクスビボでのより高い濃度のＶａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏ（１０μＭ）は、推定されたＦＡＰ活性の６０％のさらなる阻害をもたらした。しかしながら、これらの濃度は、より大きい用量でのこの薬剤により認められる臨床毒性を考えた場合、患者において達成することが困難である。したがって、Ｖａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏによる堅固かつ強力なＤＰＰエキソペプチダーゼ阻害は認められが、ＦＡＰエンドペプチダーゼ酵素活性のほんの部分的な阻害が達成されただけであった。ＦＡＰのこの部分的な阻害が、Ｖａｌ－ｂｏｒｏＰｒｏ処置により認められる最小限の臨床活性を説明する別の寄与因子であるかもしれない。他のジペプチジルペプチダーゼ酵素（例えば、細胞質ゾルのＤＰＰ８およびＤＰＰ９）の阻害によって媒介されるサイトカイン毒性をＦＡＰ阻害から切り離す新しい化合物が、ＦＡＰを腫瘍間質において最大限に阻害するために好都合であるかもしれない。そのような治療剤は、改善された臨床効力を、より小さい毒性を伴ってもたらすかもしれない。これは、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）が、タラボスタットの臨床計画を、転移性の非小細胞肺ガン（ＮＳＣＬＣ）の患者における化学療法との併用でのタラボスタットの２件のフェーズ３研究の中間解析の結果として臨床試験差し止めにしたからであった（非特許文献２０）。

【００１３】

ＦＡＰを小分子阻害剤ＰＴ－６３０により阻害すること、および、遺伝子ノックアウトにより、ＮＳＣＬＣおよびＭＣＲＣにおける腫瘍成長が、間質生成（ｓｔｒｏｍａｇｅｎｅｓｉｓ）、血管新生およびＥＣＭ再構成に対する影響を介して間接的に無効にされ得るという概念実証が、マウスモデルにおいて示されている（非特許文献２１）。しかしなが

ら、ＰＴ－６３０はまた、ＤＰＰＰＩＶ、ＤＰＰ８およびＤＰＰ９を阻害し、一方で、環化に起因する不良なインビボ安定性を同時に示す。

【００１４】

小分子のＦＡＰ阻害剤「阻害剤６」がＭｅｔ－α２ＡＰからＡｓｎ－α２ＡＰへのＦＡＰによるタンパク質分解的転換を用量応答様式で低下させ、生じる増大したＭｅｔ－α２ＡＰ／Ａｓｎ－α２ＡＰ比が、ヒト血漿から作製されるフィブリンについての短縮された溶解時間に対応するという概念実証もまた示されている。ＦＡＰ阻害（Ｍｅｔ－α２ＡＰ転換の停止）が、増大した溶解をもたらすことが明らかにされた。しかしながら、「阻害剤６」は、ＰＯＰ／ＰＲＥＰに対して選択的ではなかった。この阻害剤のこの制限にもかかわらず、刊行物では、インビボでの正常なタンパク質代謝回転の存在下においてＦＡＰ阻害剤に持続してさらされることにより、究極的には、すべてのα２ＡＰがＭｅｔ－α２ＡＰに変わり、このＭｅｔ－α２ＡＰは、最大レベルで維持されるならば、誘導体のＡｓｎ－α２ＡＰよりもはるかに遅くフィブリンに架橋されるであろうと結論された。機能的に損なわれたα２ＡＰについてヘテロ接合性である人では生来的にまさに生じるように、増大したフィブリン溶解の類似する長期状態を、出血の有意な危険性を伴うことなく模倣し、したがって、潜在的な治療的利益を、慢性進行性血管内フィブリン沈着についての危険性が大きい人に与えることが可能であるかもしれないことが結論された（非特許文献２２）。

【００１５】

いわゆる化合物６０は、有望な生化学的特徴がＦＡＰ選択性および薬物動態学に関連して前臨床試験において明らかにされている新規な小分子ＦＡＰ阻害剤である（非特許文献２３）。しかしながら、重要なことに、構造的に類似する分子の「化合物４」（図Ａ２）は、５ｍｇ／ｋｇ（ｉｖ）で注入されたとき、ラットが６時間で死亡し、したがって、安全性がヒトでは懸念事項であるかもしれない。化合物６０に関する別の懸念事項が、ＰＲＥＰに対するIC_{50}値（１．８μＭ）およびＤＰＰ９に対するIC_{50}値（１２．５μＭ）である。これらの比較的小さいIC_{50}値は、化合物６についてのC_{max}が、（ＤＰＰ９阻害が毒性であると見なされる）これらのホモログの阻害を防止するためにはサブμＭ範囲にあることを必要とするであろうことを示し、また、十分な薬物が、依然としてサブμＭ範囲にある薬物療法のためのC_{max}とともに、ＦＡＰを阻止するために全身に送達され得るかもまた、今後検討されなければならない（非特許文献２４）。

【００１６】

したがって、今までのところ、ヒト臨床試験で今までに評価されたＦＡＰ標的化薬物療法は、いくつかの難点に、例えば、非選択的であること、および、短い生物学的半減期を有すること（例えば、タラボスタットなど）に悩まされており、または、ＦＡＰと特異的に結合することができるにもかかわらず、治療効果を有しておらず、また、ヒトにおいて免疫原性である（例えば、シブロツズマブおよび他のＦ１９系の抗ＦＡＰ抗体など）。加えて、臨床研究におけるＰＴ－１００およびシブロツズマブの両方の以前の評価では、ある特定の成績評価基準が、ＦＡＰ標的化薬物療法が所望の治療効果を有するためには必要であることが示唆される。

【００１７】

したがって、ヒトにおいて許容可能であるＦＡＰ結合分子およびＦＡＰ選択的阻害剤が求められており、ならびに、ＦＡＰによって引き起こされる疾患およびＦＡＰに伴う疾患のための信頼できる診断アッセイで、そのような疾患に罹患する患者がＦＡＰ標的化治療を受け入れるか否かを示す診断アッセイが求められている。

上記の技術的課題が、請求項において特徴づけられ、また、下記においてさらに記載され、また、実施例および図面において例示される実施形態によって解決される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１８】

【特許文献１】国際公開ＷＯ９３／０５８０４

【特許文献２】国際特許出願公開ＷＯ９９／５７１５１
【特許文献３】国際特許出願公開ＷＯ０１／６８７０８
【特許文献４】国際特許出願公開ＷＯ２００７／０７７１７３
【特許文献５】国際特許出願公開ＷＯ２０１２／０２０００６
【特許文献６】国際公開ＷＯ２００７／０７７１７３
【非特許文献】
【００１９】
【非特許文献１】Ｎｉｅｄｅｒｍｅｙｅｒ他、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ７１、３８３～３８９（１９９７）、Ｎｉｅｄｅｒｍｅｙｅｒ他、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２５４、６５０～６５４（１９９８）；Ｇｅｎｂａｎｋアクセション番号ＡＡＨ１９１９０；ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿０３２０１２．１
【非特許文献２】Ｒｅｔｔｉｇ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５（１９８８）、３１１０～３１１４；Ｇａｒｉｎ－Ｃｈｅｓａ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７（１９９０）、７２３５～７２３９
【非特許文献３】Ｊｉｎ他、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２３（２００３）、３１９５～３１９８
【非特許文献４】Ｍｅｒｓｍａｎｎ他、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ９２（２００１）、２４０～１０２４８；Ｓｃｈｍｉｄｔ他、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６８（２００１）、１７３０～１７３８
【非特許文献５】Ｗｕｅｓｔ他、Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．９２（２００１）、１５９～１６８
【非特許文献６】Ｂｒａｃｋｓ他、Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７（２００１）、４６１～４６９
【非特許文献７】Ｏｓｔｅｒｍａｎｎ他、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１４（２００８）、４５８４～４５９２
【非特許文献８】Ｗｅｌｔ他、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１２（１９９４）、１１９３～１２０３
【非特許文献９】Ｓｃｏｔｔ他、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．９、１６３９～１６４７（２００３）
【非特許文献１０】Ｈｏｆｈｅｉｎｚ他、Ｏｎｋｏｌｏｇｉｅ ２６（２００３）、４４～４８
【非特許文献１１】Ｗｅｌｔ他、１９９４、上掲
【非特許文献１２】Ｚｈａｎｇ他、ＦＡＳＥＢ Ｊ．２７（２０１３）、５８１～５８９
【非特許文献１３】Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ、Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｏｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎａｌ Ｄｒｕｇｓ．１６（２００７）、１４５９～１４６５；Ｎａｒｒａ他、Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ＆ Ｔｈｅｒａｐｙ ６（２００７）、１６９１～１６９９
【非特許文献１４】Ｋｅｌｌｙ他、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １１５（１９９３）、１２６３７～１２６３８
【非特許文献１５】Ｌｅｅ他、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ ａｎｄ Ｈａｅｍｏｓｔａｓｉｓ、９（２０１１）、９８７～９９６
【非特許文献１６】ＵｐｒｉｃｈａｒｄおよびＪｏｎｅｓ、ＡＳＨ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ、１０４（２００４）、４２１５
【非特許文献１７】Ｎａｒｒａ他、（２００７）、上掲
【非特許文献１８】Ｌａｎｋａｓ他、Ｄｉａｂｅｔｅｓ ５４（２００５）、２９８８～２９９
【非特許文献１９】Ｎａｕｃｋ他、Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ．２０１４、印刷前でのオンライン発表（２０１４年４月１７日）、ｄｏｉ：１０．２３３７／ｄｃ１３－２７６
【非特許文献２０】Ｎａｒｒａ他、Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ＆ Ｔｈｅｒａｐｙ ６（２００７）、１６９１～１６９９
【非特許文献２１】Ｓａｎｔｏｓ他、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖ

ｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　１１９（２００９）、３６１３～３６２５
【非特許文献２２】Ｌｅｅ他、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ　ａｎｄ　Ｈａｅｍｏｓｔａｓｉｓ　９（２０１１）、１２６８～１２６９
【非特許文献２３】Ｊａｎｓｅｎ他、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．５７（２０１４）、３０５３～３０７４
【非特許文献２４】Ｊａｎｓｅｎ他、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　５７（２０１４）、３０５３～３０７４

【発明の概要】

【００２０】

本発明は、ヒト医薬品および／または獣医学医薬品として有用である、特に、ＦＡＰ関連障害（例えば、限定されないが、増殖性障害など）の処置および／または防止のために有用である線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）抗体およびそれに同等なＦＡＰ結合薬剤を提供する。より具体的には、ヒトＦＡＰおよび／またはそのフラグメントを認識する治療的に有用なヒト由来の組換え抗体、ならびに、そのフラグメントおよび誘導体が提供される。

【００２１】

したがって、本発明は、下記の項［１］などのいずれか一項に記載される実施形態に関連し、ただし、そのような実施形態は本発明の詳細な説明においてさらに開示されており、かつ／または、ＦＡＰ特異的薬物（例えば、本明細書中で参照される文書に記載される、または、他の場合には当業者に知られている抗ＦＡＰ抗体など）について記載される適用および実施形態により補われることがある：

【００２２】

［１］ヒトメモリーＢ細胞由来の抗線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）モノクローナル抗体。

【００２３】

添付された実施例において例示されるように、本発明に従って行われた実験では、モノクローナルなＦＡＰ特異的抗体をヒトメモリーＢ細胞から単離することに成功した。今まで、ＦＡＰに対する自己抗体の存在は報告されていなかったので、このことは驚くべきことである。加えて、ガン腫に罹患する患者の血清におけるＦＡＰのレベルおよび意味に関して意見の分かれる様々な報告は、第１に、抗ＦＡＰ自己抗体およびメモリーＢ細胞の存在の可能性が最初に調べられていなかったことの理由であるかもしれない。

【００２４】

ヒト起源であるために、すなわち、メモリーＢ細胞に由来し、したがって、「ヒト様」抗体（例えば、ファージディスプレーまたはＸｅｎｏ－Ｍｏｕｓｅによって作製されるヒト様抗体など）とは異なり、ヒト身体内で自己寛容について選択され、親和性成熟しているために、本発明のヒト抗ＦＡＰモノクローナル抗体およびその誘導体がヒトにおいて非免疫原性であり、かつ、インビボでの治療および／または診断使用において有用であることを予想することは、無理のないことである。したがって、本発明は、ＦＡＰを特異的に認識することができるヒト由来の組換え抗体ならびにその生物工学誘導体および合成誘導体、それらに同等なＦＡＰ結合性分子に関する。別途示されないならば、「ＦＡＰを特異的に認識する抗体」、「ＦＡＰに対して／ついて特異的な抗体」および「抗ＦＡＰ抗体」によって、特異的に、全般的に、また集団的にＦＡＰに結合し、しかし、ＦＡＰホモログ（例えば、ＤＰＰＩＶ、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９およびＰＯＰ／ＰＲＥＰ）には実質的に結合しない抗体が意味される；実施例６および図７を参照のこと。

【００２５】

［２］抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）の少なくとも１つ、および／または可変重鎖（V_H）および／または可変軽鎖（V_L）が、抗ＦＡＰ抗体を産生したヒトメモリーＢ細胞から得られるｍＲＮＡに由来するｃＤＮＡによってコードされる、［１］に記載の抗体。

【００２６】

この技術分野では知られているように、所与の抗体の結合特異性および結合親和性を保

持するために、同族抗体は、ただ１つの元のＣＤＲ領域を除いて、特に、国際特許出願公開ＷＯ０１／６８７０８およびＭｅｒｓｍａｎｎ（上掲）に記載されるようなＣＤＲＨ３を除いて、元のヒト抗体の６つすべてのＣＤＲ領域を含有することは必要でない。さらには、元のヒトモノクローナル抗体のＣＤＲの１つまたは複数を保持することによって、本発明の抗ＦＡＰ抗体、および、そのようなＣＤＲを含有する同等なＦＡＰ結合性分子は好都合には、マウスモノクローナル抗体から作製されるどのような抗ＦＡＰ抗体よりも小さい異種抗原性能力を有する。同じことが、「ヒト様」抗体（例えば、ファージディスプレーまたはＸｅｎｏ－Ｍｏｕｓｅによって作製されるヒト様抗体など）について当てはまる。これは、述べられたように、ｓｃＦｖ、Ｆａｂフラグメントおよび抗体はそれぞれ、依然として人為的であり、ヒト身体にとって外来であり、そのため、それらは依然として免疫原性であり、抗薬物抗体（ＡＤＡ）応答を誘導することが知られているからである。抗ＦＡＰ抗体Ｆ１９と同等な抗体（上掲）を、ＣＤＲＨ３保持の誘導された選択方法によって調製するためのプロセスが、国際特許出願公開ＷＯ０１／６８７０８に記載されており、このプロセスは、実施例において例示される本発明のヒト由来のモノクローナルな抗ＦＡＰ抗体に対して適合化される場合がある。

【００２７】

［３］捕捉された、または直接に被覆されたヒトＦＡＰおよび／またはその触媒フラグメントに対する、０．１μＭ以下のＥＣ５０による親和性によりＦＡＰと結合することができる、［１］または［２］に記載の抗体。

【００２８】

実施例１において例示され、また、図２に示されるように、本発明の抗体は、ヒトＦＡＰに対する結合親和性、すなわち、非線形回帰によってナノモル濃度およびサブナノモル濃度の範囲で求められるようなＥＣ５０値を示す。したがって、好ましくは、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、捕捉されたＦＡＰ（ｓＦＡＰ）に対する、１０ｎＭ下のＥＣ５０による親和性によりヒトＦＡＰと結合し、より好ましくは、捕捉されたＦＡＰ（ｓＦＡＰ）に対する、１ｎＭ以下のＥＣ５０による親和性によりヒトＦＡＰと結合し、最も好ましくは、捕捉されたＦＡＰ（ｓＦＡＰ）に対する、０．１ｎＭ以下のＥＣ５０による親和性によりヒトＦＡＰと結合する。加えて、または代替において、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、直接に被覆されたＦＡＰ（ＦＡＰ）に対する、１０ｎＭ下のＥＣ５０による親和性により、より好ましくは１ｎＭ以下のＥＣ５０による親和性により、最も好ましくは０．１ｎＭ以下のＥＣ５０による親和性によりヒトＦＡＰと結合する。なおさらなる実施形態において、本発明の抗ＦＡＰ抗体はさらに、または代替において、図２（Ｅ）の説明文で示される様々なＦＡＰフラグメントの直接に被覆された混合物（ｃＦＡＰ）に、１０ｎＭ以下のＥＣ５０により結合し、より好ましくは５ｎＭ以下のＥＣ５０により結合する。候補の抗ＦＡＰ抗体の結合特異性およびＥＣ５０値が、様々な方法によって、例えば、この技術分野では広く知られている直接的ＥＬＩＳＡ、好ましくは実施例において例示されるような直接的ＥＬＩＳＡなどによって求められる場合がある。加えて、または代替において、実施例および図において例示される主題抗体のいずれか１つが、ＦＡＰ結合競合アッセイにおいて参照抗体として使用される場合がある；例えば、国際特許出願公開ＷＯ０１／６８７０８、同ＷＯ２０１１／０４０９７２および同ＷＯ２０１２／０２０００６、ならびに、さらに下記の説明を参照のこと。

【００２９】

大きい親和性および特異性のほかに、主題の抗ＦＡＰ抗体は好ましくは、ヒトガン腫組織、ヒトの乳ガン組織、結腸直腸ガン組織、（マウスの）骨髄腫組織および腫瘍間質、ならびに、冠状動脈血栓および／またはアテローム斑を標的とするその能力によって特徴づけられる；実施例８～実施例１２および実施例１８、ならびに、対応する図９～図１４および図２４を参照のこと。

【００３０】

したがって、ＦＡＰに対するその大きい親和性、そして、ＦＡＰ陽性のガン腫細胞およびガン腫組織、冠状動脈血栓およびアテローム斑と結合するその大きい特異性のために、

本発明の抗ＦＡＰ抗体およびそれに同等なＦＡＰ結合薬剤は、抗ＦＡＰ抗体（例えば、Ｆ１９およびシブロツズマブなど）についてこれまでに記載された治療設定および診断設定のために特に適しており、例えば、ＦＡＰ発現腫瘍を有する患者における診断使用および治療使用のための強力な放射免疫コンジュゲート、インビボ画像化剤または抗体－薬物コンジュゲートとして特に適する；例えば、Ｆｉｓｃｈｅｒ他、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１５（２０１２）、６２０８～６０１８に記載されるメラノーマ異種移植ヌードマウスモデルにおける、ヒトＦＡＰおよびマウスＦＡＰに結合し、かつ、β放射する放射性核種の（１７７）Ｌｕにより標識される完全ヒトＩｇＧ１抗体に操作された抗体ファージライブラリー由来のヒト様Ｆａｂフラグメント（ＥＳＣ１１およびＥＳＣ１４）の生体分布および治療効果を参照のこと。

【００３１】

［４］１５アミノ酸長のペプチドに含まれるＦＡＰエピトープと結合することができる、［１］～［３］のいずれか一項に記載の抗体であって、前記エピトープは下記のアミノ酸配列を含む、または下記のアミノ酸配列からなる抗体：

ＮＩ－２０６．８２Ｃ２（５２１－ＫＭＩＬＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３０）；５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰＬＬＩＱ－５３９（配列番号３１）；および／または５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３２））；

ＮＩ－２０６．５９Ｂ４（５３－ＳＹＫＴＦＦＰ－５９（配列番号３３））；

ＮＩ－２０６．２２Ｆ７（３８１－ＫＤＴＶＥＮＡＩＱＩＴ－３９１（配列番号３４））；

ＮＩ－２０６．２７Ｅ８（１６９－ＮＩＹＬＫＱＲ－１７５（配列番号３５））；

ＮＩ－２０６．１２Ｇ４（４８１－ＴＤＱＥＩＫＩＬＥＥＮＫＥＬＥ－４９５（配列番号３６））；または

ＮＩ－２０６．１７Ａ６（７７－ＶＬＹＮＩＥＴＧＱＳＹ－８７（配列番号３７））。

【００３２】

実施例３に記載されるように、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の最小エピトープ領域が、合成され、ニトロセルロースメンブランにスポットされた、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２のエピトープを包含するＦＡＰのアミノ酸５２１～アミノ酸５３９からなるペプチドフラグメントのＮ末端およびＣ末端からの段階的短縮化ペプチド（この場合、スポット２１が全長ペプチドに対応し、スポット２２～スポット３３が、Ｃ末端からの段階的な１アミノ酸短縮化形態に対応し、スポット３４～スポット４５が、Ｎ末端からの段階的な１アミノ酸短縮化形態に対応する）によって特定された：このニトロセルロースメンブランから、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２が、ＦＡＰにおける配列５２８－ＦＤＲＳＫ－５３２（配列番号３９）に対応するスポット２１～スポット２８およびスポット３４～スポット４１を認識することが明らかにされた；図２６を参照のこと。さらに、述べられたＦＡＰフラグメント５２１－ＫＭＩＬＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰＬＬＩＱ－５３９（配列番号３８）におけるアミノ酸を１つずつ、アラニンに逐次的に変異させたことに起因して、ＦＡＰのＤ－５２９およびＫ－５３２のアミノ酸が、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合のために必須であることが特定された；図２７を参照のこと。したがって、ある抗ＦＡＰ抗体が抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２に由来するか否か、また、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２と同等であるか否かがそれぞれ、所与の候補抗体が、実施例３において抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２について記載されるのと実質的に同じ結合特徴（すなわち、ＦＡＰのアミノ酸５２８－ＦＤＲＳＫ－５３２のコアエピトープ、ならびに／あるいは、結合のためのＦＡＰの重要なアミノ酸（Ｄ－５２９およびＫ－５３２）の一方または両方）を示すかどうかを明らかにすることによって特定されるかもしれない。これらの特徴の評価を好ましくは、本出願の実施例に従って行うことができる。

【００３３】

［５］ＦＡＰのプロテアーゼ活性を阻害することができ、好ましくは、プロリルエンドペプチダーゼ（ＰＥＰ）基質であるＮ－カルボベンゾキシ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－７－アミド－４－メチル－クマリン（Ｚ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ）または直接的クエンチドゼラチン

（ＤＱ－ゼラチン）の組換えヒトＦＡＰ（ｒｈｕＦＡＰ）媒介切断を０．１μＭ以下のＩＣ５０により阻害することができる、［１］～［４］のいずれか一項に記載の抗体。

【００３４】

上記で述べられたように、両方を示す、すなわち、（ｉ）抗ＦＡＰ抗体に関して原理的には実現可能であるようなＦＡＰについての大きい親和性および選択性と、（ｉｉ）低分子量の擬似ペプチド基質および擬似ペプチド阻害剤（例えば、タラボスタットなど）について示されるようなＦＡＰの酵素活性に対する強力な阻害作用とを示すＦＡＰ標的化薬剤は、今までのところ提供されていない。実施例４～実施例７および実施例１８に記載され、ならびに、図５～図８および図２４に例示されるように、本発明は初めて、そのような薬剤、すなわち、抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２を提供する。そのうえ、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、ＩｇＧタイプの抗体として提供されるときには特に、例えば、タラボスタットおよび類似する化合物よりも相当長い半減期を有することが予想され得る。これは、ヒトＩｇＧには、約２５日の半減期が典型的には伴うからである。他方で、健康な組織が照射されること、および大きいバックグランドをそれぞれ引き起こし得るので、長い血清半減期が放射免疫療法または画像化などの用途のために所望されない場合、主題抗体の抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂフラグメントなど）ならびに生物工学誘導体および合成誘導体が、これらは一価であり、かつ腎クリアランスによって迅速に排出され得るので、魅力的な代替物として使用されることがある。具体的には、実施例１９に記載され、また、図２５に示されるように、非放射性で、しかし、蛍光標識された抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、腫瘍マウスモデルの腫瘍間質に選択的に蓄積し、そして、抗体濃度が抗体注入後６時間から４８時間で動物においてピークに達し、抗体注入後６日後にはほぼゼロにまで低下し、このことから、動物の身体からの効率的な除去が明らかにされた。したがって、例示的抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２について明らかにされるような結合特性および生物学的性質を有する抗ＦＡＰ抗体が提供されると、様々な技術が、その生物工学誘導体および合成誘導体を調製するために、例えば、生物学的利用能および半減期の強化または低下のどちらかが、意図された使用に依存してもたらされるその生物工学誘導体および合成誘導体を調製するために当業者の思い通りになる；総説については、例えば、Ｃｈａｍｅｓ他、Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ １５７（２００９）、２２０～２３３、および、Ｖｕｇｍｅｙｓｔｅｒ他、Ｗｏｒｌｄ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．３（２０１２）、７３～９２を参照のこと。

【００３５】

［６］ヒト血漿の血餅形成時間を延長することができる、または、ヒト血漿の血餅堅さを低下させることができる、［１］～［５］のいずれか一項に記載の抗体。

【００３６】

実施例１３に記載され、また、図１５に例示されるように、本発明は初めて、ヒト血漿凝固時間を延長することができ、凝固速度、血餅弾性および血餅堅さを低下させることができる抗ＦＡＰ抗体を提供する。したがって、この実施形態において、抗ＦＡＰ抗体およびそれに同等なＦＡＰ結合薬剤は抗凝固剤として有用であり、したがって、対応する障害の処置およびインビトロ使用のために好適である。したがって、本発明は概して、ＦＡＰに対する特異的な結合によって血液凝固を阻害することができ／血液凝固時間を延長することができ、凝固速度、血餅弾性および／または血餅堅さを低下させることができるモノクローナル抗体に関連する。さらには、実施例１４に記載され、また、図１６に例示される、本発明の抗体、図１６。ＦＡＰのヒト血漿からの免疫沈殿は、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２免疫沈殿前の血漿と比較して、得られた血漿におけるＦＡＰ基質のアルファ２抗プラスミン（α２ＡＰ－ＡＭＣ）の切断速度の有意な低下をもたらす。これらのデータにより、ＦＡＰの阻害が、血栓溶解活性を高めるための治療的アプローチを示すかもしれないことが立証される。

【００３７】

［７］［１］～［６］のいずれか一項に記載の抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体であって、その可変領域または結合ドメインにおいて、

（ａ）図１Ａ～図１Ｆのいずれか１つに示されるＶ$_{H}$鎖アミノ酸配列および／またはＶ$_{L}$鎖アミノ酸配列の少なくとも１つのＣＤＲ；
（ｂ）図１Ａ～図１Ｆに示されるＶ$_{H}$鎖アミノ酸配列および／またはＶ$_{L}$鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列；
（ｃ）（ａ）の前記アミノ酸配列のいずれか１つの部分的変化から生じるアミノ酸配列からなる少なくとも１つのＣＤＲ；あるいは
（ｄ）（ｂ）の前記アミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を含むＶ$_{H}$鎖および／またはＶ$_{L}$鎖を含み、
好ましくは、前記アミノ酸配列における変化の数が５０％未満である、抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体。

【００３８】
固形腫瘍のｐＨは、増大した発酵性代謝のために酸性である。このことは、不良な灌流と一緒になって、生理学的状態（７．２～７．４）のもとでの正常な組織と比較して、悪性腫瘍における酸性の細胞外ｐＨ（ｐＨ６．５～６．９）をもたらす；例えば、Ｇｉｌｌｉｅｓ他、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２６７（１９９４）、（１　Ｐｔ　１）、Ｃ１９５～２０３；Ｓｔｕｂｂｓ他、Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．Ｔｏｄａｙ　６（２０００）、１５～１９を参照のこと。酸性ｐＨは局所的な侵襲性成長および転移を促進させることが仮定されている。酸が侵入を媒介するという仮説では、Ｈ（＋）が近位の腫瘍微小環境から、局所的侵入を許す組織再構成が酸によって引き起こされる隣接する正常な組織に拡散することが提案される；例えば、Ｓｃｈｏｒｎａｃｋ他、Ｎｅｏｐｌａｓｉａ　５（２００３）、１３５～１４５を参照のこと。そのような再構成はエピトープを変化させ、したがって、抗体アビディティーに影響を及ぼしさえするかもしれず、このことが、非コンジュゲート化形態における抗ＦＡＰ抗体の抗腫瘍効果の不首尾についての１つの理由であるかもしれない；国際公開ＷＯ２００７／０７７１７３（上掲）を参照のこと。対照的に、実施例１８に記載され、また、図２４に例示されるように、本発明の抗ＦＡＰ抗体により、特に抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２により、驚くべきことに、健康な組織の中性ｐＨにおけるより低いアビディティーと比較して、腫瘍において見出される酸性ｐＨにおける膜貫通ＦＡＰに対する増大したアビディティーが明らかにされた。ｐＨ依存的アビディティーは、ＦＡＰが健康な組織でもまた発現しているので重要であり、健康な組織への抗体結合は様々な副作用を生じさせているかもしれない。したがって、本発明の抗体は腫瘍微小環境においてＦＡＰに優先的に結合するために、より大きい治療効果が、他の組織における膜貫通ＦＡＰへの結合に伴う副作用を伴うことなく達成され得る。これらのデータにより、酸性の腫瘍微小環境の内部における（膜貫通）ＦＡＰを標的とすることができる本発明の抗ＦＡＰ抗体は悪性疾患のための効果的な治療であるに違いないことがさらに裏づけられる。

【００３９】
［８］膜貫通ＦＡＰに結合することができる、［１］～［７］のいずれか一項に記載の抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体。

【００４０】
［９］ＦＡＰに対する結合アビディティーが、中性ｐＨまたは生理学的ｐＨよりも酸性ｐＨのもとで大きく、すなわち、酸性ｐＨのもとでのＦＡＰに対する優先的な結合を示し、好ましくは、前記酸性ｐＨが６．４または６．８であり、前記生理学的ｐＨが７．４である、［１］～［８］のいずれか一項に記載の抗体；酸性環境における膜貫通ＦＡＰに対する本発明の抗体の優先的な結合が検証され得る実施例１８および図２４もまた参照のこと。

【００４１】
前述の通り、好ましくは本発明の抗ＦＡＰ抗体は組換え抗体であり、この場合、可変重鎖および／または可変軽鎖の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）、好ましくは２つの相補性決定領域（ＣＤＲ）、または、より好ましくは３つすべての相補性決定領域（ＣＤＲ）、ならびに／あるいは、実質的には可変領域全体が、抗ＦＡＰ抗体を産生したヒ

トメモリーＢ細胞から得られるｍＲＮＡに由来するｃＤＮＡによってコードされる。好ましい実施形態において、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、添付された実施例および図において例示される主題抗体について明らかにされるような結合特性および生物学的特性の１つまたは複数を、好ましくは、例示的抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２について明らかにされるような結合特性および生物学的特性の１つまたは複数を任意の組合せで示す。上述のＣＤＲならびにV_H鎖および／またはV_L鎖のアミノ酸配列の代わりに、これらのアミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を使用することができる。しかしながら、アミノ酸配列の変化は、本発明の抗体が、以前に言及された結合特徴および生物学的活性ならびに実施例において例示される結合特徴および生物学的活性のいずれか１つを実質的に保持する範囲でのみ行うことができる。抗体が前述の活性のいずれか１つを有する限り、それぞれの活性がアミノ酸配列の変化によって増減する場合がある。変化させられるアミノ酸の数は、上述のＣＤＲのアミノ酸配列あるいはV_H鎖および／またはV_L鎖のアミノ酸配列の全アミノ酸に関してそれぞれ、好ましくは５０％以下であり、より好ましくは４０％以下であり、さらにより好ましくは３０％以下であり、一層より好ましくは２０％以下であり、最も好ましくは１０％以下である。親抗体の生物工学的または合成的な誘導体および変異体を調製するための様々な手段および方法が、この技術分野では広く知られている；本明細書中に引用される文献を参照のこと、例えば、置換変異体、挿入変異体および欠失変異体；グリコシル化変異体；Ｆｃ領域変異体；システイン操作抗体変異体；ならびに、実施例において例示される主題抗体に対して等しく適用され得る抗体誘導体について、国際特許出願公開ＷＯ２０１２／０２０００６を参照のこと。本発明の特に好ましい実施形態において、抗ＦＡＰ抗体またはそのＦＡＰ結合フラグメントは、図１Ａ～図１Ｆに示されるような可変領域ＶＨおよび／または可変領域ＶＬによって特徴づけられる抗体の免疫学的結合特徴を示す。

【００４２】

［１０］［１］～［９］のいずれか一項に記載の抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体であって、その可変領域または結合ドメインにおいて、

（ａ）図１Ａのいずれか１つに示されるV_H鎖アミノ酸配列および／またはV_L鎖アミノ酸配列の少なくとも１つのＣＤＲ；

（ｂ）図１Ａに示されるV_H鎖アミノ酸配列および／またはV_L鎖アミノ酸配列のアミノ酸配列；

（ｃ）（ａ）の前記アミノ酸配列のいずれか１つの部分的変化から生じるアミノ酸配列からなる少なくとも１つのＣＤＲ；あるいは

（ｄ）（ｂ）の前記アミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を含むV_H鎖および／またはV_L鎖を含み、

好ましくは、１５アミノ酸長のペプチドに含まれるＦＡＰエピトープと結合することができ、該エピトープは、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなる、抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体。

【００４３】

添付された実施例において明らかにされ、また、図に例示されるように、独特の結合特性および生物学的性質によって特徴づけられる１つの抗ＦＡＰ抗体（ＮＩ－２０６．８２Ｃ２）が提供される。したがって、この実施形態において、本発明の抗体は好ましくは、下記によって特徴づけられる：

（ｉ）ＦＡＰのプロテアーゼ活性を阻害することができること；

（ｉｉ）ヒト血漿の血餅形成時間を延長することができる、または、ヒト血漿の血餅堅さを低下させることができること；

（ｉｉｉ）１５アミノ酸長のペプチドに含まれるＦＡＰエピトープと結合することができること（該エピトープはアミノ酸配列５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３２）を含む、またはアミノ酸配列５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３２）からなる）。

【００４４】
別の言い方をすれば、本発明は概して、上記の機能的特徴（ｉ）～機能的特徴（ｉｉｉ）のいずれか１つによって特徴づけられるＦＡＰ阻害性抗体およびそれに同等なＦＡＰ結合薬剤に関連する。上記の機能的特徴（ｉ）～機能的特徴（ｉｉｉ）のいずれか１つに加えて、またはそれに代えて、本発明の抗体は好ましくは、上記で記載されるような酸性環境における膜貫通ＦＡＰに対する優先的な結合によって特徴づけられる。
【００４５】
［１１］ＦＡＰのプロテアーゼ活性を阻害すること、ならびに／あるいは、ヒト血漿の血餅形成時間を延長すること、またはヒト血漿の血餅堅さを低下させることが可能である薬剤であって、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなるＦＡＰのエピトープと結合するために、［１０］に記載の抗体と競合することができることを特徴とする薬剤（好ましくは、前記薬剤は抗ＦＡＰ抗体である）。
【００４６】
実施例から明らかであるように、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２のエピトープ（配列番号３２）は独特であり、全く予想外である。これは、このエピトープが、Ser^{624}、Asp^{702}およびHis^{734}の残基から構成されるＦＡＰの触媒トライアドの外側に位置するにもかかわらず、この抗体が結合したとき、ＦＡＰ活性が阻害されるからである；例えば、Ｌｉｕ他、Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ＆ Ｔｈｅｒａｐｙ １３（２０１２）、１２３～１２９を参照のこと。実施形態において明らかにされるように、このエピトープが、例えば、サンドイッチＥＬＩＳＡを使用して定量されるとき、このエピトープはまた、いくつかのヒト疾患を診断するために有用である。したがって、この新規なＦＡＰエピトープに関して、本発明は概して、（ａ）１５アミノ酸長のペプチドに含まれるＦＡＰエピトープと結合すること（該エピトープはアミノ酸配列５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３２）を含む、またはアミノ酸配列５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５（配列番号３２）からなる）、そして、（ｂ）ＦＡＰのプロテアーゼ活性を阻害すること、ならびに／あるいは、ヒト血漿の血餅形成時間を延長すること、またはヒト血漿の血餅堅さを低下させることが可能であるどのような薬剤にも関連する。上記で既に説明されたように、そのような薬剤は、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の生物工学誘導体または合成誘導体の抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２誘導選択によって、あるいは、ヒトＦＡＰ、または前記エピトープを含むその対応するフラグメントもしくはペプチドを標的として用いるスクリーニング／競合アッセイにおいて得られる場合がある。例示的な競合アッセイが、例えば、国際特許出願公開ＷＯ０１／６８７０８、同ＷＯ２０１１／０４０９７２および同ＷＯ２０１２／０２０００６において、ならびに、さらには下記の説明において記載される。したがって、この薬剤の性質は抗体に限定されるのではなく、他のタイプの化合物も同様に包含する。例えば、抗体以外のタンパク質ディスプレイおよびペプチドディスプレイが調べられ、これらは、抗体のＣＤＲと類似するループ構造を有し、しかし、より小さい構造的要求、および／または、ＣＤＲグラフト化の可能性を有する；例えば、Ｎｉｃａｉｓｅ他、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ １３（２００４）、１８８２～１８９１、および、Ｈｏｓｓｅ他、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ １５（２００６）、１４～２７を参照のこと。さらに、抗体により可能となった小分子薬剤発見が、例えば、Ｌａｗｓｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ １１（２０１２）、５１９～５２５に記載される。
【００４７】
［１２］ヒト定常領域を含み、かつ／または、免疫グロブリンのＦｃ領域もしくは前記Ｆｃ領域と同等な領域を含み、好ましくは前記Ｆｃ領域がＩｇＧのＦｃ領域である、［１］～［１１］のいずれか一項に記載の抗体。
【００４８】
［１３］全長のＩｇＧクラスの抗体である、［１］～［１２］のいずれか一項に記載の抗体。

【００４９】
［１４］糖鎖工学操作されたＦｃ領域を含み、かつ、糖鎖工学操作されていない抗体と比較して、Ｆｃ領域における非フコシル化オリゴ糖の割合が増大している、［１］～［１３］のいずれか一項に記載の抗体。
【００５０】
抗ＦＡＰ抗体を糖鎖工学操作するための様々な手段および方法が当業者には知られている；例えば、国際特許出願公開ＷＯ２０１２／０２０００６、具体的には、（糖鎖工学操作された）抗体の調製については実施例１を、そして、糖鎖工学操作された抗ＦＡＰ　ＩｇＧ１抗体によって媒介される抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）については実施例１４を参照のこと。
【００５１】
［１５］ヒト－齧歯類のキメラ抗体、または、齧歯類化された抗体、例えば、マウス抗体またはマウス化抗体、ラット抗体またはラット化抗体であり、齧歯類型が診断方法および動物における研究のために特に有用である、［１］～［１４］のいずれか一項に記載の抗体。
【００５２】
［１６］単鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメントおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントからなる群から選択される、［１］～［１５］のいずれか一項に記載の抗体。
【００５３】
［１７］二重特異性抗体であり、好ましくはＦＡＰおよび細胞死受容体５（ＤＲ５）に結合する二重特異性抗体であり、ＤＲ５に特異的な少なくとも１つの抗原結合部位を含む、［１］～［１６］のいずれか一項に記載の抗体。
【００５４】
間質におけるＦＡＰと、腫瘍細胞上のＤＲ５との二重特異性抗体標的化が、これらの標的が異なる細胞に位置しているにもかかわらず、アポトーシスを誘導することが報告されている（国際特許出願公開ＷＯ２０１４／１６１８４５）。そのような二重特異性抗体では、細胞死受容体５（ＤＲ５）を標的とする抗原結合部位が、ＦＡＰを標的とする第２の抗原結合部位と組み合わされる。それによって、細胞死受容体が架橋され、標的となった腫瘍細胞のアポトーシスが誘導される。従来の細胞死受容体標的化抗体を上回るこれらの二重特異性の細胞死受容体アゴニスト抗体の利点が、ＦＡＰが発現される部位においてだけでアポトーシスを誘導する特異性、ならびに、ＤＲ５のハイパークラスター化が誘導されることに起因するこれらの二重特異性抗体のより大きい効力である。ＤＲ５について特異的な抗原結合部位のための可変重鎖アミノ酸配列および可変軽鎖アミノ酸配列を含むＤＲ５－ＦＡＰ細胞死受容体アゴニスト性二重特異性抗体を調製し、１つの細胞株のアポトーシスを、第２の細胞株による架橋を介して媒介するその能力を検証するための様々な手段および方法が、当業者には知られている；例えば、国際特許出願公開ＷＯ２０１４／１６１８４５、具体的には実施例１および続く実施例を参照のこと。
【００５５】
［１８］［１］～［１７］のいずれか一項に記載の抗体の一部を形成する抗体V_H鎖および／または抗体V_L鎖を少なくともコードし、好ましくはｃＤＮＡであるポリヌクレオチド。
【００５６】
本発明はまた、少なくとも本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードするポリヌクレオチドに関連する。好ましくは、前記可変領域は、図１Ａ～図１Ｆのいずれか１つに示されるような可変領域のＶＨおよび／またはＶＬの少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。本発明の好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドはｃＤＮＡであり、好ましくは、ＦＡＰとの反応性を有する抗体を産生するヒトメモリーＢ細胞から得られるｍＲＮＡに由来するｃＤＮＡである。
【００５７】

［１９］［１８］に記載のポリヌクレオチドを、必要な場合には発現制御配列に機能的に連結した状態で含むベクター。
【００５８】
［２０］［１８］に記載のポリヌクレオチド、または、［１９］に記載のベクターを含む宿主細胞であって、前記ポリヌクレオチドが当該宿主細胞にとって異種である、宿主細胞。
【００５９】
［２１］抗ＦＡＰ抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体を調製するための方法であって、
（ａ）［２０］に記載の細胞を培養すること、および
（ｂ）前記抗体を培養物から単離すること、を含む、方法。

【００６０】
［２２］［１８］に記載のポリヌクレオチドによってコードされるか、または、［２１］に記載の方法によって得られる抗体。
【００６１】
［２３］［１］～［１７］または［２２］のいずれか一項に記載の抗体であって、
（ｉ）検出可能な標識（好ましくは、酵素、放射性同位体、蛍光団および重金属からなる群から選択される検出可能な標識）を含み、かつ／または
（ｉｉ）薬物（好ましくは細胞傷害性薬剤）に結合させられる、抗体。
【００６２】
適切な標識および薬物（具体的には細胞傷害性薬剤）が当業者には知られており、例えば、本明細書中に引用される、ＦＡＰを標的とする免疫療法および診断に関する特許文献および非特許文献に記載される；下記の説明もまた参照のこと。
【００６３】
［２４］［４］～［１０］のいずれか一項に記載の抗体によって特異的に認識されるＦＡＰのエピトープを有するペプチド（好ましくは、１１アミノ酸長～２０アミノ酸長のペプチド）であって、［４］において定義されるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列、または、１つもしくは複数のアミノ酸が置換され、欠失され、かつ／もしくは付加される改変配列を含む、あるいは、そのようなアミノ酸配列または改変配列からなる、ペプチド。
【００６４】
そのようなペプチドは抗原として使用することができ、すなわち、免疫応答を対象において誘発し、本発明の抗体の産生をインビボにおいて刺激するための免疫原であり、したがって、免疫応答を対象において誘発し、本発明の抗体の産生をインビボにおいて刺激するために有用である。したがって、本発明のペプチドはワクチンとして特に有用である。ペプチドに基づくガンワクチンの総説については、例えば、Ｋａｓｔ他、Ｌｅｕｋｅｍｉａ（２００２）、１６、９７０～９７１、および、Ｂｕｏｎａｇｕｒｏ他、Ｃｌｉｎ．Ｖａｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８（２０１１）、２３～３４を参照のこと。他方で、そのような抗原は、対応する抗体を、例えば、研究目的のために惹起させるための実験動物の免疫化のために使用される場合がある。
【００６５】
［２５］［１］～［１７］、［２２］または［２３］のいずれか一項に記載の抗体、［１１］に記載の薬剤、［１８］に記載のポリヌクレオチド、［１９］に記載のベクター、［２０］に記載の細胞、あるいは、［２４］に記載のペプチドを含む組成物であって、好ましくは、
（ｉ）医薬組成物であり、かつ、薬学的に許容され得る担体をさらに含み、好ましくは、ワクチンであり、かつ／または、ＦＡＰに伴う疾患を防止もしくは処置するために有用であるさらなる薬剤を含む医薬組成物、あるいは
（ｉｉ）診断組成物であり、好ましくは、免疫または核酸に基づく診断方法において従来

から使用される試薬をさらに含む診断組成物である、組成物。
【００６６】
さらには、本発明は、ＦＡＰ関連疾患の防止、診断または処置のための免疫治療方法および免疫診断方法であって、本発明の抗ＦＡＰ抗体、薬剤、ペプチドまたは組成物の効果的な量がその必要性のある患者に投与される方法に関連する。

【００６７】
［２６］ＦＡＰに伴う疾患、好ましくは、ガン、例えば、乳ガン、結腸直腸ガン、卵巣ガン、前立腺ガン、膵臓ガン、腎臓ガン、肺ガン、上皮ガン、メラノーマ、線維肉腫、骨肉腫および結合組織肉腫、腎細胞ガン、巨細胞ガン、扁平上皮ガン、腺ガン、多発性骨髄腫など；組織再構成および／または慢性炎症によって特徴づけられる疾患、例えば、線維性疾患、創傷治癒障害、ケロイド形成障害、変形性関節症、関節リウマチ、軟骨分解障害、アテローム硬化性疾患およびクローン病など；心臓血管障害、例えば、アテローム性動脈硬化、発作または急性冠動脈症候群（例えば、心筋梗塞、心臓発作、脳静脈血栓症、深部静脈血栓症または肺塞栓症、脆弱性アテローム斑またはアテローム血栓症など；内分泌学的機能不全を伴う障害、例えば、グルコース代謝の障害など；ならびに血液凝固障害からなる群から選択されるＦＡＰに伴う疾患の予防的処置または治療的処置において使用するための、［１］～［１７］、［２２］または［２３］のいずれか一項に記載の抗ＦＡＰ抗体、［１１］に記載の薬剤、［１８］に記載のポリヌクレオチド、［１９］に記載のベクター、［２０］に記載の細胞、［２４］に記載のペプチド、あるいは、［２５］に記載の組成物。
【００６８】
実施例１６および実施例１７において明らかにされ、また、図２１、図２２および図２３に例示されるように、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、動脈閉塞時間および血栓症をマウス血栓症モデルにおいて延長することができ、かつ、同所性腫瘍成長を同系の結腸直腸ガンマウスモデルにおいて取り消すことができる。したがって、本発明に従って行われる実験、および、他方で、文献において、例えば、背景の節で引用される文書において広範囲に記録される（病態）生理学におけるＦＡＰの知られている役割に基づいて、本発明の抗ＦＡＰ抗体、エピトープおよび薬剤の可能性のある適用を下記のＦＡＰ関連の障害および疾患において想定することは妥当であり、かつ、確かである：（ａ）増殖によって特徴づけられるＦＡＰ関連の障害および疾患（これには、ガンが含まれるが、これに限定されない）；（ｂ）組織再構成および／または慢性炎症によって特徴づけられるＦＡＰ関連の障害および疾患（これには、線維性疾患、慢性肝疾患、創傷治癒、ケロイド形成、変形性関節症、関節リウマチ、および、軟骨分解を伴う関連障害が含まれるが、これらに限定されない）；（ｃ）内分泌学的障害によって特徴づけられるＦＡＰ関連の障害および疾患（これには、グルコース代謝の障害が含まれるが、これらに限定されない）；（ｄ）心臓血管障害によって特徴づけられるＦＡＰ関連の障害および疾患（これには、血栓症、アテローム性動脈硬化、卒中、心筋梗塞、心臓発作、脆弱性アテローム斑またはアテローム血栓症が含まれるが、これらに限定されない）；ならびに（ｅ）血液凝固障害を伴う障害によって特徴づけられるＦＡＰ関連の障害および疾患；可能な治療的および診断的な適用については、本明細書中に示される文書もまた参照のこと。
【００６９】
［２７］［２６］において定義されるＦＡＰ関連障害の処置において使用するための医薬組成物を調製する方法であって、
（ａ）［２０］に記載の細胞を培養すること；
（ｂ）前記抗体、その生物工学誘導体もしくは合成誘導体または免疫グロブリン鎖を前記培養物から医薬品グレードにまで精製すること；および
（ｃ）前記抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体を薬学的に許容され得る担体と混合すること、を含む、方法。

【００７０】
さらなる治療方法および診断方法、ならびに、本発明の抗ＦＡＰ抗体、薬剤、ペプチドおよび組成物のために用いられることがある対応する組成物の配合が、ＦＡＰ関連疾患の処置および診断に関する本明細書中に引用される文献から、例えば、国際特許出願公開ＷＯ２０１２／０２０００６から当業者には明らかであろう。例えば、心臓血管疾患における新規な治療的および診断的な標的として使用するためのＦＡＰが国際特許出願公開ＷＯ２０１２／０２５６３３に開示される。
【００７１】
加えて、阻害性の抗ＦＡＰ抗体およびそれに同等なＦＡＰ結合薬剤に関して、治療的および診断的な有用性が切断酵素（ＡＰＣＥ）について想定され、記載され得る。ＡＰＣＥは、ＦＡＰの可溶性のアイソタイプまたは誘導体であると報告されており、後者はＩＩ型内在性膜タンパク質であり、これは、その最初の６個のＮ末端残基を線維芽細胞の細胞質に有し、この後に２０残基の膜貫通ドメインが続き、次いで、７３４残基の細胞外のＣ末端の触媒作用ドメインが続くことが予測される。ＦＡＰのように、ＡＰＣＥもまた、エンドペプチダーゼ活性およびジペプチジルペプチダーゼ活性の両方を示すプロリル特異的酵素である。ＦＡＰおよびＡＰＣＥは、ＡＰＣＥがＦＡＰの最初の２３個のアミノ末端残基を欠くことを除いて、アミノ酸配列が本質的に同一であり、しかし、それ以外では、これら２つの分子は本質的に同一の物理化学的性質を有することもまた報告されている；例えば、Ｌｅｅ他、Ｂｌｏｏｄ、１０７（２００６）、１３９７～１４０４、国際特許出願公開ＷＯ２００４／０７２２４０および米国特許出願公開第２０１１／０１４４０３７号（Ａ１）（具体的には、ＦＡＰ／ＡＰＣＥの阻害剤の有用性については段落［０００９］および段落［００９５］以降）を参照のこと。
【００７２】
実施例１９において明らかにされ、また、図２５に示されるように、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、生物学的に不活性なアイソタイプ一致のコントロール抗体と比較して、時間の経過とともに腫瘍間質に選択的に蓄積する、ガンの信頼できるインビボ画像化剤である。
【００７３】
［２８］ヒトまたは動物の身体におけるＦＡＰ発現細胞またはその組織のインビボ検出またはインビボ画像化、あるいは、ヒトまたは動物の身体におけるＦＡＰ発現細胞またはその組織に治療剤および／または診断剤を標的化することにおいて使用するための、［１］～［１７］、［２２］または［２３］のいずれか一項に記載の抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含むＦＡＰ結合性分子であって、好ましくは前記インビボ画像化が、シンチグラフィー、陽電子放射断層撮影法（ＰＥＴ）、単一光子放射型断層撮影法（ＳＰＥＣＴ）、近赤外（ＮＩＲ）光学的画像法または磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を含む、ＦＡＰ結合性分子。
【００７４】
［２９］対象が、［２６］で定義される、ＦＡＰに伴う疾患に罹患しているかどうか、または、対象が、ＦＡＰ特異的な治療剤による処置に適するかどうかを診断するインビトロ方法であって、前記対象の体液（好ましくは血液）に由来するサンプルにおいてＦＡＰの存在を明らかにすることを含み、健康な対象からのコントロールサンプルと比較したＦＡＰレベルの上昇が、前記疾患、および、前記薬剤による前記処置のための可能性があることの指標となり、前記ＦＡＰレベルが、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなるＦＡＰのエピトープを検出することによって求められることを特徴とする、インビトロ方法。
【００７５】
実施例１５において明らかにされ、また、図１７～図２０に例示されるように、ＦＡＰを体液において、具体的には血液においてアッセイするための新規なアッセイが、本発明の主題抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の新規なエピトープに基づいて開発されている。前記の国際特許出願公開ＷＯ２０１２／０２５６３３において、その血液試験は、不明のＦＡ

Ｐエピトープが測定されたという点で異なっており、これに対して、この新しいアッセイでは、ＦＡＰエピトープの「５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５」（配列番号３２）が特異的に測定される。国際公開ＷＯ２０１２／０２５６３３では、ＦＡＰに対するウサギポリクローナル抗体（Ａｂ２８２４６；Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）が捕捉抗体として使用されており、Ｆ１９が検出抗体として使用されている。これらの抗体の両方についての結合エピトープは不明である。本発明の新規なアッセイについては、Ｆ１９抗体が捕捉抗体として使用されてもよく、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２または同等な抗ＦＡＰ抗体が、ＦＡＰエピトープ（配列番号３２）のレベルを特異的に定量するために検出抗体として使用されてもよい。ＦＡＰエピトープ（配列番号３２）を診断学のために定量することにより、予想外で、かつ、臨床的に有益な情報がもたらされる。この情報は予想外であり、これは、様々な他のＦＡＰエピトープを測定する今日までに公表された他のＦＡＰ血液試験では実際に、循環ＦＡＰレベルが、健康なコントール患者に対して、ガン患者ではより低いことが報告されるからである；例えば、Ｊａｖｉｄｒｏｏｚｉ他、Ｄｉｓｅａｓｅ Ｍａｒｋｅｒｓ ３２（２０１２）、３０９～３２０、Ｔｉｌｌｍａｎｎｓ他、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｒｄｉｏｌｏｇｙ １６８（２０１３）、３９２６～３９３１、および、Ｋｅａｎｅ他、ＦＥＢＳ Ｏｐｅｎ Ｂｉｏ ４（２０１４）、４３～５４を参照のこと。しかしながら、全く予想外ではあるが、本発明の新規なアッセイでは、ＦＡＰ特異的エピトープ（配列番号３２）のレベルがガンおよび心臓血管疾患の患者では増大していることが示される（図１８～図２０）。理論によってとらわれることを意図しないが、この予想外の結果は、ＦＡＰの様々な形態がヒト血液に存在し（例えば、複合体化型、短縮化型、単量体、二量体など）、これらは生物学的役割が異なり、診断標的および治療標的としての価値が異なるという可能性によって説明される。先行技術で記載されるＦＡＰアッセイは、ある特定のエピトープを指定していないようであり、また、適切なエピトープを定量していないようであり、そのため、ＦＡＰ関連疾患（例えば、ガンなど）を予測するための信頼できる方法がこれまで確立されていないが、高レベルの配列番号３２のエピトープを有する患者は、臨床事象（例えば、ガン、心臓発作、卒中または凝固障害など）の増大した危険性があることが予想され、また、上昇したエピトープレベルを有するこれらの同じ患者はまた、ＦＡＰ標的化薬物療法（好ましくは、配列番号３２のエピトープに結合する抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、その生物工学変異体もしくは合成変異体、または同等なＦＡＰ結合薬剤）を受けることから最大の利益を受けることが予想されるので、提供される情報は臨床的に有益である。実施例１４に記載され、また、図１７に例示されるように、ＳＢ９オリゴペプチダーゼのホモログであるｒｈＤＤＰ４、ｒｈＤＰＰ８、ｒｈＤＰＰ９およびｒｈＰＯＰ／ＰＲＥＰはシグナル（すなわち、ＯＤの増大）を与えなかったので、本発明のＦＡＰ検出アッセイは、ｒｈＦＡＰに対して特異的である。さらに、図１８～図２０に例示されるように、本発明のＦＡＰ検出アッセイは、転移性結腸直腸ガン（ＭＣＲＣ）、冠動脈疾患（ＣＡＤ）およびＳＴ上昇型心筋梗塞（ＳＴＥＭＩ）、頸動脈プラークを患者において検出するために特に好適である。

【００７６】

［３０］［２６］で定義される、ＦＡＰに伴う疾患に罹患する、または、そのような疾患を発症する危険性がある患者の処置において使用するための治療剤であって、患者の血液のサンプルのＦＡＰレベルがコントロールと比較して上昇しており、前記ＦＡＰレベルが、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列からなる、またはそのようなアミノ酸配列を含むＦＡＰのエピトープを検出することによって明らかにされることを特徴とし、好ましくは、前記患者は、［２９］に記載の方法に従って診断されている、治療剤。

【００７７】

［３１］前記ＦＡＰレベルが、前記サンプルを抗ＦＡＰ抗体に供し、ＦＡＰと前記抗体との間で形成される複合体の存在を、好ましくはサンドイッチＥＬＩＳＡによって検出することによって求められる、［２９］に記載の方法、または、［３０］に従って使用するた

めの薬剤。

【００７８】

実施例１４に記載されるように、サンドイッチ型免疫アッセイ形式（＝サンドイッチ免疫アッセイまたはサンドイッチＥＬＩＳＡ）が特に好ましい。様々なサンドイッチ免疫アッセイ形式が当業者にはよく知られており、ＦＡＰの検出についてもまた記載されている；例えば、国際特許出願公開ＷＯ２００９／０７４２７５、同ＷＯ２０１０／１２７７８２および同ＷＯ２０１２／０２５６３３を参照のこと。この関連において、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなるＦＡＰのエピトープを検出することが好ましくは、本発明の抗ＦＡＰ抗体（例えば、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２）あるいはその生物工学誘導体または合成誘導体を検出抗体として、かつ、抗ＦＡＰ抗体Ｆ１９またはその誘導体を捕捉抗体として用いて行われる。しかしながら、このアッセイは逆の様式で行われる場合がある。抗体Ｆ１９またはその誘導体の代わりに、さらなる抗ＦＡＰ抗体が使用される場合があり、例えば、ラットのモノクローナルな抗ＦＡＰ／セプラーゼ抗体（クローンＤ８、クローンＤ２８およびクローンＤ４３）が使用される場合がある；Ｐｉｎｅｉｒｏ－Ｓａｎｃｈｅｚ他、Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１２（１９９７）、７５９５～７６０１、および、国際特許出願公開ＷＯ２００９／０７４２７５を参照のこと。

【００７９】

［３２］血液凝固障害の処置において使用するための抗ＦＡＰ抗体、または、血液の凝固をインビトロにおいて遅らせるための抗ＦＡＰ抗体の使用。

【００８０】

実施例１３および実施例１４において明らかにされ、また、図１５および図１６に例示されるように、抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は凝固カスケードを妨げ、かつ、血液凝固時間を延長させ、したがって、抗凝固剤および血栓形成促進性（ｐｒｏ－ｔｈｒｏｍｂｏｔｉｃ）薬剤の定義をそれぞれ満たす。したがって、抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２ならびにその生物工学誘導体および合成誘導体、ならびに、それらに同等なＦＡＰ結合薬剤の可能な治療的使用には、概して血栓性障害、心房細動（速い不規則な心拍）、機械的心臓弁に伴う障害、心内膜炎（心臓の内部の感染症）、僧帽弁狭窄（心臓における弁の１つが完全に開かない）、血液凝固様式に影響を及ぼすある種の血液障害（遺伝性血栓性素因、抗リン脂質症候群）、股関節または膝関節を置換するための手術に伴う障害の処置、改善および防止が含まれるが、これらに限定されない。さらに、本発明の抗ＦＡＰ抗体およびそれに同等な薬剤は、医療設備において、例えば、試験チューブ、輸血バッグおよび腎透析設備などにおいて使用される場合がある。抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤の抗凝固活性を、候補の抗ＦＡＰ抗体を血液（好ましくはヒト血液）に由来するサンプルとの血餅形成アッセイに供することによって求めることができ、この場合、アイソタイプ一致のコントロール抗体に供されるサンプルと比較して、延長された血漿凝固時間、低下した凝固速度、低下した血餅弾性、および／または、低下した血餅堅さが、抗ＦＡＰ抗体および薬剤の抗凝固活性についてそれぞれ示しており、好ましくは、この場合、血餅形成が、トロンボエラストグラフィーによって、例えば、回転式トロンボエラストメトリー（ＲＯＴＥＭ（商標））などによって求められる；実施例１３もまた参照のこと。加えて、または代替において、抗ＦＡＰ抗体または薬剤は、実施例１４に記載されるように、ＦＡＰ基質のアルファ２抗プラスミン（α２Ａ－ＡＭＣ）の切断速度をヒト血漿において低下させる能力について試験される場合がある。

【００８１】

［３３］前記抗体が、［１］～［１７］、［２２］または［２３］のいずれか一項に記載の抗体である、［３１］に従って使用するための方法もしくは薬剤、［３２］に従って使用するための抗ＦＡＰ抗体、または、［３２］に記載の使用。

【００８２】

［３４］［２９］、［３１］または［３３］のいずれか一項に記載の方法において、あるいは、［３２］または［３３］に記載の使用において有用なキットであって、［１］～［

１７］、［２２］または［２３］のいずれか一項に記載の少なくとも１つの抗体、［１１０］に記載の薬剤、［１８］に記載のポリヌクレオチド、［１９］に記載のベクター、［２０］に記載の細胞、［２４］に記載のペプチド、または、［２５］に記載の組成物を、必要な場合には使用のための試薬および／または説明書と一緒に含むキット。

【００８３】

［３５］（ｉ）［２９］、［３１］または［３３］のいずれか一項に記載の方法を行うための手段、好ましくは、［３４］に記載のキットの構成成分のいずれか１つ、および、（ｉｉ）ＦＡＰ標的化薬物、好ましくは、［２９］、［３１］または［３３］に従って使用するための治療剤を、必要な場合には使用のための説明書と一緒に含む医薬包装物または製造品。

【００８４】

実際には、ＦＡＰ標的化薬物による薬物療法は、具体的には、抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２ならびにその生物工学誘導体および合成誘導体、同様にまた、それらに同等なＦＡＰ結合薬剤による薬物療法はほとんどの場合、エピトープ「５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５」を定量する、［２９］、上記および実施例に記載の方法およびアッセイと組み合わされるであろうことが予想され得る。好ましくは、アッセイが、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２由来の抗体または薬剤を検出抗体として使用し、かつ、薬物が注入されると、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２が患者体内において結合するであろう非結合型エピトープ（または「薬物標的」）の量を特異的に測定するサンドイッチＥＬＩＳＡに基づく血液試験として行われる。したがって、本発明のアッセイは、好ましくは血液試験の形態であり、どの患者を処置するか（すなわち、高レベルの薬物標的を有する患者）、および、薬物療法をどのように与えるかを（すなわち、具体的には「５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５」エピトープの各患者の個体レベルに従って）特定するであろう。したがって、好都合には、ＦＡＰ標的化薬物は、具体的には、抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２ならびにその生物工学誘導体および合成誘導体、同様にまた、それらに同等なＦＡＰ結合薬剤は、例えば、当該アッセイを行うために必要かつ十分である成分、および／または、そうするための説明書を組み合わせる臨床包装物として、本発明の新規なＦＡＰ検出アッセイと一緒に使用するために設計される。加えて、本発明のＦＡＰ検出アッセイを代表的な対象および患者の統計学的に有意な集団におけるＦＡＰの血清中レベルの評価においてそれぞれ使用して、概して医学的状況に備える、例えば、ＦＡＰ結合薬剤を投薬することに備える本発明の参照レベルが確立されるであろうことを予想することは、無理のないことである。

【００８５】

［３６］本明細書中に記載されるような発明、とりわけ、添付された実施例を参照して本明細書中に記載されるような発明、ならびに、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６から選択されるどのような抗体とも実質的に同じ結合活性および生物学的活性を示す抗体。抗ＦＡＰ抗体はまた、下記において詳しく記載されるような抗体の標識化を含めて、診断方法の取り扱いを容易にするために変化させることができる。

【００８６】

本発明のさらなる実施形態が下記の説明および実施例から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【００８７】

【図１】例示的なヒト抗体のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６の可変領域のアミノ酸配列。フレームワーク領域（ＦＲ）および相補性決定領域（ＣＤＲ）が示され、ＣＤＲには下線が引かれる。Ｋａｂａｔ番号表記スキームが使用された（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｓ／を参照のこと）。

【図２】ＥＬＩＳＡによって評価される組換えヒト由来抗体のＦＡＰに対する特異的結合およびＥＣ５０決定。（Ａ）プレートを示された濃度の組換えヒト由来抗体とインキュベーションした。例示的抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、被覆された抗Ｈｉｓ抗体によりそのｈｉｓタグを介して捕捉されたｒＦＡＰ（●）に対して大きい親和性で結合する。抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２はＢＳＡ（▲）には結合しない。データは、４５０ｎｍにおけるＯＤ値として表される。（Ｂ）プレートを示された濃度の組換えヒト由来抗体とインキュベーションした。例示的抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、ＥＬＩＳＡプレートに直接に被覆されたｒＦＡＰ（●）に対して良好な親和性で結合する。抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２はＢＳＡ（▲）には結合しない。データは、４５０ｎｍにおけるＯＤ値として表される。（Ｃ）プレートを示された濃度の組換えヒト由来抗体とインキュベーションした。例示的抗体ＮＩ－２０６．５９Ｂ４は、被覆された抗Ｈｉｓ抗体によりそのｈｉｓタグを介して捕捉されたｒＦＡＰ（●）に対して大きい親和性で結合する。抗体ＮＩ－２０６．５９Ｂ４はＢＳＡ（▲）には結合しない。データは、４５０ｎｍにおけるＯＤ値として表される。（Ｄ）プレートを示された濃度の組換えヒト由来抗体とインキュベーションした。例示的抗体ＮＩ－２０６．５９Ｂ４は、ＥＬＩＳＡプレートに直接に被覆されたｒＦＡＰ（●）に対して良好な親和性で結合する。抗体ＮＩ－２０６．５９Ｂ４はＢＳＡ（▲）には結合しない。データは、４５０ｎｍにおけるＯＤ値として表される。（Ｅ）ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６の各抗体についてのＥＣ５０値を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウエアを使用して非線形回帰によって推定した。ｓＦＡＰについてのデータは、ＦＡＰが、被覆された抗Ｈｉｓ抗体によりそのｈｉｓタグを介して捕捉されたＥＬＩＳＡプレートを用いて行われる測定に対応する。ＦＡＰについての値は、ＦＡＰが直接に被覆されたＥＬＩＳＡプレートを用いて行われる測定に対応する。ｃＦＡＰについての値は、ＦＡＰ特異的ペプチド（３７８－ＨＹＩＫＤＴＶＥＮＡＩＱＩＴＳ－３９２、６２２－ＧＷＳＹＧＧＹＶＳＳＬＡＬＡＳ－６３６および７２１－ＱＶＤＦＱＡＭＷＹＳＤＱＮＨＧＬ－７３６）の混合物が直接に被覆されたＥＬＩＳＡプレートを用いて行われる測定に対応する。Ｎ／Ａは、該当しないことを表し、抗体は結合を示さず、したがって、ＥＣ５０を求めることができなかった。抗体ＮＩ－２０６．１２Ｇ４のｓＦＡＰに対する結合は調べられなかった。

【図３】ＰｒｏｔｅＯｎ（商標）分析でのＮＩ－２０６．８２Ｃ２の速度論的分析。抗体を、１６μｇ／ｍｌ、８μｇ／ｍｌ、４μｇ／ｍｌ、２μｇ／ｍｌおよび１μｇ／ｍｌから出発する５つの濃度の連続希釈物としてそれぞれ注入し、結合容量が異なる３つの反応表面について１回だけの注入で分析した。それらのうちの１つが示される。

【図４】ペプスキャン（ｐｅｐｓｃａｎ）分析によって評価されるヒト由来組換え抗体のＦＡＰ結合エピトープ。（Ａ）組換えＮＩ－２０６．８２Ｃ２ヒト由来抗体（１μｇ／ｍｌ）のペプスキャン画像。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の結合が、アミノ酸５２５～５３５を覆うペプチド１３１およびペプチド１３２（Ｇ列、１１番目および１２番目のスポット）で生じた（ペプチド１３１：５２１－ＫＭＩＬＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５、ペプチド１３２：５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰＬＬＩＱ－５３９、コンセンサスな結合配列：ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ）。（Ｂ）二次のＨＲＰコンジュゲート化ロバ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃγのみ（１：２０，０００；二次抗体のみ）のペプスキャン画像を特異性コントロールとして使用した。（Ｃ）ＦＡＰタンパク質配列の示されたアミノ酸の中における種々のヒト由来ＦＡＰ特異的抗体の特定された結合エピトープ。

【図５】組換えヒトモノクローナル抗体を用いたＦＡＰ酵素活性の阻害。組換えヒトＦＡＰのゼラチナーゼ活性の、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２（Ａ）、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４（Ｂ）、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７（Ｃ）、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８（Ｄ）、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４（Ｅ）、ＮＩ－２０６．１７Ａ６（Ｆ）による阻害。ヒト抗体の阻害特徴をまとめる表（Ｇ）。

【図６】ｒｈｕＦＡＰにより媒介されるＰＥＰ（Ｚ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ）切断のＮＩ－２０６．８２Ｃ２阻害の機構。下記の異なるＰＥＰ蛍光発生基質（Ｚ－Ｇｌｙ－Ｐｒ

ｏ－ＡＭＣ）濃度における、０ｎＭ、１０ｎＭ、１００ｎＭ、１０００ｎＭのＮＩ－２０６．８２Ｃ２による活性な組換えヒトＦＡＰによるＰＥＰ切断（４５０ｎＭでの放射として測定される）：１００μＭ（Ａ）、８０μＭ（Ｂ）、７０μＭ（Ｃ）、６０μＭ（Ｄ）、５０μＭ（Ｅ）、４０μＭ（Ｆ）、３０μＭ（Ｇ）および２０μＭ（Ｈ）。速度対［基質］プロット（Ｉ）およびラインウィーバー・バークプロット（Ｊ）が示される。これらから、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２はＦＡＰ媒介ＰＥＰ切断の非競合的阻害剤の特徴的性質を有することが示唆される。

【図７】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、ＦＡＰホモログとではなく、ＦＡＰと選択的に結合し、これを選択的に阻害する。（Ａ）２０ｎＭ、４ｎＭおよび０．８ｎＭの濃度で検出抗体として使用されるＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、サンドイッチＥＬＩＳＡを使用したとき、ＣＤ２６および一連のさらなる無関係なヒト抗原（図Ａ：Ａ～Ｎ）と比較して、組換えヒトＦＡＰに対して有意により大きい比色分析シグナル（ＯＤ４５０ｎＭ）をもたらす。（Ｂ）サンドイッチＥＬＩＳＡを使用する親和性（ＥＣ５０）アッセイにより、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は組換えヒトＦＡＰ（ｒｈＦＡＰ）に選択的に結合し、しかし、ＦＡＰＳＢ９オリゴペプチダーゼホモログ（ｒｈＤＰＰＩＶ、ｒｈＰＯＰ／ＰＲＥＰ、ｒｈＤＰＰ８およびｒｈＤＰＰ９）には選択的に結合しないことが明らかにされる。（Ｃ）阻害アッセイにより、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２はｒｈＦＡＰを選択的に阻害し、しかし、ＦＡＰホモログを選択的に阻害しないことが明らかにされる。

【図８】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、活性な組換えヒトＦＡＰおよび活性な組換えマウスＦＡＰの酵素活性を阻害する。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２により、活性な組換えヒトＦＡＰ（Ａ）および活性な組換えマウスＦＡＰ（Ｂ）を阻害することについてのより大きい効力が、以前に試験されたＦＡＰ標的化薬剤Ｖａｌ－ｂｏｒｏ－ＰｒｏおよびＦ１９（すなわち、シブロツズマブが、実質的に同じ結合親和性を有するそのヒト化型であるマウスＦ１９モノクローナル抗体；背景の節（上掲）における記載を参照のこと）と比較して明らかにされる。

【図９】ヒトガン腫組織切片に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、共焦点免疫蛍光によってヒトの浸潤性腺管ガン（Ａ）および浸潤性小葉ガン（Ｂ）の切片に特異的に結合する。３Ａ１はヒトアイソタイプコントロール抗体であり、ＤＡＰＩにより、細胞の核が対比染色される。

【図１０】ヒト浸潤性腺管ガン組織のＮＩ－２０６．８２Ｃ２染色。陽性染色（ＤＡＢ、褐色）がＮＩ－２０６．８２Ｃ２による組織切片染色において認められ（Ｄ、Ｅ、Ｆ）、しかし、４３Ａ１１ヒトアイソタイプコントロール抗体により染色される組織では認められない（Ａ、Ｂ、Ｃ）。核がヘマトキシリンブルーにより青く対比染色される。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２により、悪性腫瘍（＋）の周界（黒矢印Ｆ）における細胞外染色が、周囲の結合組織（＊によって示される）における細胞外染色が認められないことと比較して示される（図Ｆ）。陽性染色がまた、（白矢印により示される）周囲組織における細胞の細胞質においても認められる（Ｆ）。

【図１１】ヒト非浸潤性乳管ガン組織のＮＩ－２０６．８２Ｃ２染色。陽性染色（ＤＡＢ、褐色）がＮＩ－２０６．８２Ｃ２による組織切片染色において認められ（Ｂ、Ｄ、Ｆ、Ｈ）、しかし、アイソタイプコントロール抗体４３Ａ１１による隣接組織切片の染色では認められない（Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｇ）。核酸がヘマトキシリンにより青く対比染色される。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２により、悪性の「再構成」ＤＣＩＳ腫瘍（＋）に対する上昇した結合が、大きい非悪性の「被包性」ＤＣＩＳ腫瘍（＊によって示される）におけるより弱い染色と比較して示される。大きい腫瘍（＋）の被包形成をＡおよびＢにおいて認めることができる。染色が４３Ａ１１アイソタイプコントロール抗体からは認められない（Ｅ）。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２染色が、（黒矢印により示される）より小さい悪性腫瘍の外側周界で最も高い（Ｆ）。（ＧおよびＨにおいてτによって示される）腫瘍組織を取り囲む結合組織は、（白矢印により示される）細胞の細胞質を除いて陰性である（Ｈ）。

【図１２】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２はマウスＣＴ－２６結腸直腸ガン組織切片に結合する。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２染色（赤色）が、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）トランスフェ

クションされたＣＴ－２６の同系肝臓転移物（緑色）の周界付近に見出される。細胞の核がシアン色で示される（ＤＡＰＩ）。
【図１３】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、同系ＭＯＰＣ３１５．ＢＭマウスモデルにおいて多発性骨髄腫細胞および腫瘍間質に結合する。（Ａ）対麻痺を発症したときのＭＯＰＣ３１５．ＢＭ攻撃マウスの大腿骨のＨ＆Ｅ染色。広範囲の形質細胞拡大が骨髄全体に認められる。腫瘍細胞注入後１５日における、ＭＯＰＣ３１５．ＢＭのＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｂ）およびコントロールのＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｃ）におけるＮＩ－２０６．８２Ｃ２および抗ＣＤ１３８（形質細胞マーカー）による免疫蛍光染色。矢印は、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２がＣＤ１３８陽性の多発性骨髄腫形質細胞と共局在化することを示す。
【図１４】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、心筋梗塞を引き起こす閉塞性ヒト冠状動脈血栓と、大動脈アテローム斑とに結合する。心筋梗塞に罹患する患者から回収される閉塞性冠状動脈血栓（Ａ）と、ヒト大動脈アテローム斑（Ｂ）とが、シアニン３により標識されたＮＩ－２０６．８２Ｃ２により染色され、共焦点免疫蛍光によって可視化される。３Ａ１は、特異性コントロールとしての、既知の結合エピトープを有しないヒトアイソタイプ一致抗体である。
【図１５】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２はヒト血漿凝固時間を延長させ、凝固速度を低下させ、血餅弾性を低下させ、かつ、血餅堅さを低下させる。ＲＯＴＥＭ（商標）分析では、血餅形成時間の用量依存的延長が、不活性なアイソタイプ一致コントロール抗体４３Ａ１１による処置ではなく、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２による処置によって示される（Ａ）。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２はまた、生理的食塩水ビヒクル（０．０ｎＭ）またはアイソタイプ一致コントロール抗体（４３Ａ１１）と比較して、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の増大する濃度に比例して、最大凝固角を低下させ（Ｂ）、最大血餅弾性を低下させ（Ｃ）、かつ、血餅堅さを低下させる（Ｄ）。
【図１６】ヒト血漿からのＦＡＰの免疫沈殿。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２を使用してヒト血漿に対して行われる免疫沈殿は、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２免疫沈殿前の血漿と比較して、得られた血漿におけるＦＡＰ基質のアルファ２抗プラスミン（α２ＡＰ－ＡＭＣ）の切断速度を有意に低下させる。比較によって、ヒトアイソタイプコントロール抗体の４３Ａ１１および３Ａ１による免疫沈殿はα２ＡＰ－ＡＭＣ切断速度における低下をもたらさなかった。
【図１７】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗原をヒトサンプルにおいて測定するためのサンドイッチＥＬＩＳＡの特徴づけ。（Ａ）標準曲線を、組換えヒトＦＡＰをコントロールとして使用して成し遂げた。（Ｂ）増大する血清希釈度でのサンプルの直線性を求めた。（Ｃ）ＥＬＩＳＡは、ｒｈＦＡＰに対して特異的であり、しかし、他のＳＢ９オリゴペプチダーゼホモログのｒｈＤＤＰ４、ｒｈＤＰＰ８、ｒｈＤＤｐ９およびｒｈＰＯＰ／ＰＲＥＰについては特異的でないことが示された。
【図１８】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗原が、サンドイッチＥＬＩＳＡによって測定される場合、健康なコントロール患者と比較して、転移性結腸直腸ガン（ＭＣＲＣ）の患者の血清において有意に増大した。
【図１９】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗原が、サンドイッチＥＬＩＳＡによって測定される場合、健康なコントロール患者と比較して、冠動脈疾患（ＣＡＤ）およびＳＴ上昇型心筋梗塞（ＳＴＥＭＩ）の患者の血清において有意に増大した。
【図２０】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗原が、サンドイッチＥＬＩＳＡによって測定される場合、健康なコントロール患者と比較して、頸動脈プラークを有する患者の血漿において有意に増大した。
【図２１】（Ａ）ドップラー血流計（ｉ）、頸動脈（ｉｉ）、および、レーザー誘発頸動脈傷害部位（ｉｉｉ）を示す光化学的頸動脈傷害モデルの顕微鏡写真（バー＝１ｍｍ）。（Ｂ）ＮＩ－２０６．８２Ｃ２処置マウス（２０ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｖ．）の閉塞時間が、ビヒクルコントロールにより処置される動物と比較して有意に延長された。統計学、対応のないスチューデントＴ検定（＊；ｐ＜０．０５、ｎ＝４）。
【図２２】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２による処置は、同所性の同系ＭＣ３８結腸直腸腫瘍を

保有するマウスにおいて磁気共鳴画像法によって評価される場合、リン酸塩緩衝化生理的食塩水ビヒクルコントロールによる処置と比較して、累積腫瘍直径（Ａ）および転移物の数（Ｂ）を低下させた（＊＝ｐ＜０．０５）。
【図２３】抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は血栓症をマウスにおいて阻害する。抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、４３Ａ１１（生物学的に不活性なアイソタイプ一致コントロール抗体）と比較して、光化学的傷害誘発動脈閉塞時間を生体マウスにおいて延長させる（Ａ、ログランク・ハザード比＝０．０４、９５％信頼区間＝０．０１～０．１６、ｐ＜０．０００１）。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、閉塞までのメジアン時間における用量依存的増大をマウスにおいて示す（Ｂ、ｎ＝群あたり１０匹～１１匹のマウス）。
【図２４】膜貫通ＦＡＰに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合はｐＨ依存的である。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、健康な組織において認められる中性ｐＨと比較して、腫瘍微小環境に特徴的であるより低いｐＨにおいて、より大きい親和性で膜貫通ＦＡＰに結合する（ΔＭＦＩ＝［ＭＦＩ－ＮＩ－２０６．８２Ｃ２］－［ＭＦＩ－４３Ａ１１］）。
【図２５】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２標的の関与。ＮＩ－２０６．２８２Ｃ２が、生物学的に不活性なアイソタイプ一致のコントロール抗体４３Ａ１１（Ｂ）と比較して時間とともに腫瘍間質（Ａ）において選択的に蓄積する。
【図２６】抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の最小エピトープ領域。抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２のエピトープを覆うＦＡＰペプチドを、ＦＡＰのアミノ酸５２８－ＦＤＲＳＫ－５３２（配列番号３８）を覆うＮＩ－２０６．８２Ｃ２の最小エピトープ領域を決定するために、Ｎ末端およびＣ末端から１アミノ酸だけ順次、短縮化した；上記もまた参照のこと。
【図２７】ＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合のために不可欠なアミノ酸。ＦＡＰペプチドフラグメント５２１－ＫＭＩＬＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰＬＬＩＱ－５３９（配列番号３９）からのアミノ酸を１つずつ、不可欠なアミノ酸を決定するために、すなわち、変異させたときにＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合の喪失を引き起こすアミノ酸を決定するために、逐次的にアラニンに変異させた。この戦略により、ＦＡＰのＤ－５２９およびＫ－５３２のアミノ酸がＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合のために不可欠であることが明らかにされた；上記もまた参照のこと。
【発明の詳細な説明】
【００８８】
本発明は概して、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）およびその組換え誘導体に対するヒト自己抗体に関連する。より具体的には、本発明は、そのＣＤＲの少なくとも１つが、ヒトメモリーＢ細胞によって産生されるＦＡＰ特異的抗体に由来することを特徴とするモノクローナルな抗ＦＡＰ抗体に関連する。本発明の抗ＦＡＰ抗体は、ＦＡＰ関連疾患、すなわち、冒された細胞および組織がＦＡＰの（上昇した）発現によって特徴づけられる疾患の免疫療法ならびにインビボ検出およびインビボ標識化において特に有用である。ヒト由来であるために、本発明の得られた組換え抗体は、治療剤として有効かつ安全であり、かつ、ＦＡＰを、インビトロで、ならびに、インビボでの両方で、細胞表面および組織内において、偽陽性を与えることなく検出するための診断試薬として非常に特異的であることが合理的に期待され得る。
【００８９】
さらなる局面において、本発明は、ＦＡＰに選択的に結合し、その酵素活性を選択的に阻害する抗ＦＡＰ抗体およびそれに同等な薬剤であって、加えて、抗凝固活性によって特徴づけられ、したがって、抗血栓溶解剤として有用である抗ＦＡＰ抗体およびそれに同等な薬剤に関連する。さらに、本発明のヒト由来の抗ＦＡＰ抗体によって認識されるＦＡＰの独特かつ新規なエピトープに基づいて、ＦＡＰを体液において、具体的には血液および血漿においてそれぞれ明らかにするための新規なインビトロアッセイが提供され、この場合、増大したレベルのＦＡＰが信頼性よく、ＦＡＰ関連疾患（例えば、ガンおよびアテローム性動脈硬化など）の存在と相関する。
【００９０】
加えて、本発明は、主題となる抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤を含む

診断組成物および医薬組成物で、具体的には、腫瘍および心臓血管疾患（例えば、血栓症など）の診断および処置において使用するための診断組成物および医薬組成物に関連する。

【００９１】

図に例示されるような添付された実施例の結果から導かれる本発明の実施形態が請求項および上記の項［１］～項［３６］において要約され、下記の説明により補われる。さらに、何らかの疑念を避けるために、背景の節で参照される先行技術の技術的内容は本発明の開示の一部を形成しており、本明細書中で主張されるどのような実施形態のためにであっても依拠される場合がある。しかしながら、このことは、これらの文書が、本発明に関しての関連のある先行技術を表していることを認めるものではない。

【００９２】

Ｉ．定義

別途言及されない限り、本明細書中で使用されるような用語には、Ｏｘｆｏｒｄ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、１９９７年、２０００年改訂及び２００３年再版、ＩＳＢＮ ０ １９ ８５０６７３ ２）において提供されるような定義が与えられる。

【００９３】

用語「ａ」又は「ａｎ」を伴う実体はそのような実体の１つ又は複数を示すことに留意しなければならない；例えば、「ａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ」（抗体）は１つ又は複数の抗体を表すことが理解される。そのようなものとして、用語「ａ」（又は「ａｎ」）、「ｏｎｅ ｏｒ ｍｏｒｅ」（１つ又は複数）及び「ａｔ ｌｅａｓｔ ｏｎｅ」（少なくとも１つ）は、本明細書中では交換可能に使用され得る。

【００９４】

本明細書中で使用される場合、ＦＡＰと「特異的に結合する」、「選択的に結合する」、または「優先的に結合する」抗体またはそれに同等な薬剤に対する言及は、他の無関係なタンパク質と結合しない抗体を示す。一例において、本明細書中に開示される抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤はヒト組換えＦＡＰまたはそのエピトープと結合することができ、かつ、他のタンパク質についてはバックグランドの約２倍を超える結合を示さない。ヒトＦＡＰのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列についての情報およびデータバンクアクセション番号が背景の節（上掲）において示される。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、ＦＡＰホモログ（例えば、ｒｈＤＰＰＩＶ、ｒｈＰＯＰ／ＰＲＥＰ、ｒｈＤＰＰ８およびｒｈＤＰＰ９など）を実質的に認識しない；特に実施例に従って評価されるときには実施例６ならびに図７Ａおよび図７Ｂを参照のこと。加えて、１つの好ましい実施形態において、抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤はマウスＦＡＰと同様に結合することができる；実施例７、実施例１０および実施例１１、ならびに、図８、図１２および図１３を参照のこと。マウスＦＡＰのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列についての情報およびデータバンクアクセション番号が背景の節（上掲）において示される。

【００９５】

さらに、本明細書中で使用される場合、ＦＡＰを「特異的に阻害する」、「選択的に阻害する」、または「優先的に阻害する」「ＦＡＰ阻害（性の）」抗体またはそれに同等な薬剤に対する言及は、ＦＡＰに選択的に結合し、その酵素活性を選択的に阻害するが、ＦＡＰホモログ（例えば、ｒｈＤＰＰＩＶ、ｒｈＰＯＰ／ＰＲＥＰ、ｒｈＤＰＰ８およびｒｈＤＰＰ９など）の酵素活性を実質的に阻害しない抗体または薬剤を示す；特に実施例に従って評価されるときには、実施例６および図７Ｃ、ならびに、実施例７および図８を参照のこと。好ましい実施形態において、本発明の抗ＦＡＰ抗体およびＦＡＰ結合薬剤により、活性な組換えヒトＦＡＰを阻害するためのより大きい効力が、以前に試験されたＦＡＰ標的化薬剤（Ｖａｌ－ｂｏｒｏ－Ｐｒｏおよび／またはＦ１９）と比較して明らかにされる；特に実施例に従って評価されるときには実施例７および図８を参照のこと。加えて

、１つの好ましい実施形態において、抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤は、活性な組換えマウスＦＡＰを同様に阻害することができる；実施例７および図８を参照のこと。

【００９６】

用語「ｐＨ」は、ラテン語用語「ｐｏｎｄｕｓ　ｈｙｄｒｏｇｅｎｉｉ」を示し、グラム原子／リットルでの水素イオン濃度の逆数の対数を表す記号であり、溶液の酸性度またはアルカリ性度を０～１４のスケールで表すために使用され、このスケールでは、７未満が酸性であることを表し、７が中性であることを表し、７超がアルカリ性であることを表す。純水はｐＨが約７である。ヒトの正常な器官、組織、または細胞の微小環境の典型的な生理学的ｐＨは７．２～７．４（平均７．４）であり、一方、腫瘍組織は、より酸性の細胞外ｐＨ（ｐＨｅ）（ｐＨ＝６．５～６．９）を有することが示されている；例えば、Ｅｓｔｒｅｌｌａ他、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．７３（２０１３）、１５２４～１５３５、および、上記で参照される参考文献を参照のこと。実施例１８において明らかにされ、また、図２４に例示されるように、本発明の１つの好ましい実施形態において、本明細書中に開示される抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤は、中性ｐＨにおける、または、より具体的には７．４の生理学的ｐＨにおけるＦＡＰに対するその結合と比較して、酸性ｐＨにおいて優先的に、好ましくはｐＨ６．４またはｐＨ６．８において優先的に膜貫通ＦＡＰに結合する。抗ＦＡＰ抗体が酸性ｐＨにおいて膜貫通ＦＡＰに優先的に結合することを、実施例１８に記載される実験設定に従って検証することができる。

【００９７】

加えて、本明細書中で使用される場合、抗凝固剤に対する言及は、最大凝固角の低下、最大血餅弾性の低下および血餅堅さの低下が好ましくは伴って、ヒト血漿の血餅形成時間を用量依存的様式で延長することができる抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤を示す；特に実施例に従って評価されるときには実施例１３および図１５を参照のこと。

【００９８】

これに関連して、本明細書中で使用される場合、血栓溶解剤または血栓溶解治療に対する言及は、α２－抗プラスミン（プラスミン媒介の血栓溶解を阻害する凝固因子）のＦＡＰ媒介活性化を阻害することができる抗ＦＡＰ抗体またはそれに同等なＦＡＰ結合薬剤およびその使用をそれぞれ示す；特に実施例に従って評価されるときには実施例１４および図１６を参照のこと。

【００９９】

本発明のＦＡＰ抗体の配列はヒト対象から得られているので、本発明のＦＡＰ抗体はまた、そのような抗体が、実際には最初はヒト対象によって発現されたものであり、合成構築物、例えば、ヒト免疫グロブリンを発現するファージライブラリー（このようなファージライブラリーはこれまで、ヒト様抗体を提供しようと試みるための１つの一般的な方法を表していた）によって生じる合成構築物ではないことを強調するために、「ヒト自己抗体」または「ヒト由来抗体」と呼ばれることがある。他方で、本発明のヒト由来抗体は、プロテインＡカラムまたは親和性カラムによって精製される場合があるヒト血清抗体そのものから区別するために、合成（的）、組換え（型）および／または生物工学（的）であると示される場合がある。

【０１００】

ペプチド

用語「ペプチド」は、その意味の範囲内において、（時には本明細書中では交換可能に使用されることがある）用語「ポリペプチド」及び用語「タンパク質」を包含することが理解される。同様に、タンパク質及びポリペプチドのフラグメントもまた包含され、タンパク質及びポリペプチドのフラグメントは本明細書中では「ペプチド」と称される場合がある。それにもかかわらず、用語「ペプチド」は好ましくは、少なくとも５個の連続するアミノ酸を含むアミノ酸ポリマーを意味し、好ましくは少なくとも１０個の連続するアミノ酸を含むアミノ酸ポリマーを意味し、より好ましくは少なくとも１５個の連続するアミ

ノ酸を含むアミノ酸ポリマーを意味し、さらにより好ましくは少なくとも２０個の連続するアミノ酸を含むアミノ酸ポリマーを意味し、特に好ましくは少なくとも２５個の連続するアミノ酸を含むアミノ酸ポリマーを意味する。加えて、本発明によるペプチドは典型的には、最大でも１００個の連続するアミノ酸、好ましくは８０個未満の連続するアミノ酸、より好ましくは５０個未満の連続するアミノ酸、更に好ましくは、ＦＡＰポリペプチドの最大でも１５個の連続するアミノ酸を有する。

【０１０１】

ポリペプチド

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、１つだけの「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られている）によって直鎖状に連結されるモノマー（アミノ酸）から構成される分子を示す。用語「ポリペプチド」は、２個以上のアミノ酸の任意の鎖（１つ又は複数）を示し、生成物の特定の長さを示さない。したがって、「ペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「オリゴペプチド」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、又は、２個以上のアミノ酸の鎖（１つ又は複数）を示すために使用される任意の他の用語が、「ポリペプチド」の定義の範囲に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりに、又は、これらの用語のどれとも交換可能に使用される場合がある。

【０１０２】

用語「ポリペプチド」はまた、限定されないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、及び、知られている保護基／ブロック基、タンパク質分解的切断による誘導体化、又は、天然に存在しないアミノ酸による修飾を含めて、当該ポリペプチドの発現後修飾の産物を示すことが意図される。ポリペプチドは天然の生物学的供給源に由来してもよく、又は、組換え技術によって産生されてもよいが、指定された核酸配列から必ずしも翻訳されない。ポリペプチドは、化学合成による様式を含めて、どのような様式において作製されてもよい。

【０１０３】

本発明のポリペプチドは、約３個以上のアミノ酸のサイズ、５個以上のアミノ酸のサイズ、１０個以上のアミノ酸のサイズ、２０個以上のアミノ酸のサイズ、２５個以上のアミノ酸のサイズ、５０個以上のアミノ酸のサイズ、７５個以上のアミノ酸のサイズ、１００個以上のアミノ酸のサイズ、２００個以上のアミノ酸のサイズ、５００個以上のアミノ酸のサイズ、１，０００個以上のアミノ酸、又は、２，０００個以上のアミノ酸のサイズである場合がある。ポリペプチドは、規定された三次元構造を有する場合があるが、ポリペプチドはそのような構造を必ずしも有さない。規定された三次元構造を有するポリペプチドは、折り畳まれたとして示される。規定された三次元構造を有するのではなく、むしろ、非常に多数の異なる立体配座を取ることができるポリペプチドは、折り畳まれていないとして示される。本明細書中で使用される場合、糖タンパク質という用語は、アミノ酸残基（例えば、セリン残基又はアスパラギン残基）の酸素含有側鎖又は窒素含有側鎖を介して当該タンパク質に結合する少なくとも１つの炭水化物成分に連結されるタンパク質を示す。

【０１０４】

「単離された」ポリペプチドあるいはそのフラグメント、変異体又は誘導体によって、その天然の環境に存在していないポリペプチドが意図される。特定の精製レベルは何ら要求されない。例えば、単離されたポリペプチドはそのネイティブ環境又は天然の環境から取り出され得る。宿主細胞において発現される組換え産生されたポリペプチド及びタンパク質は、任意の好適な技術によって分離されているか、分画されているか、あるいは、部分的又は実質的に精製されているネイティブポリペプチド又は組換えポリペプチドのように、本発明の様々な目的のために単離されていると見なされる。

【０１０５】

「組換え（の）ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質」は、組換えＤＮＡ技術によって産生される、すなわち、所望されるペプチドを含む融合タンパク質をコードする外因性

の組換えＤＮＡ発現構築物によって形質転換される細胞（微生物細胞又は哺乳動物細胞）から産生される、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を示す。ほとんどの細菌培養物において発現されるタンパク質又はペプチドは典型的にはグリカンを含まないであろう。酵母において発現されるタンパク質又はペプチドは、哺乳動物細胞において発現されるものとは異なるグリコシル化パターンを有する場合がある。

【０１０６】

本発明のポリペプチドとして、前記ポリペプチドのフラグメント、誘導体、アナログ又は変異体、及びそれらの任意の組合せも含まれる。用語「フラグメント」、「変異体」、「誘導体」及び「アナログ」には、天然ペプチドのアミノ酸配列に十分に類似するアミノ酸配列を有するペプチド及びポリペプチドが含まれる。用語「十分に類似する」は、第１のアミノ酸配列及び第２のアミノ酸配列が共通の構造的ドメイン及び／又は共通の機能的活性を有するように、第２のアミノ酸配列に対する十分な数又は最小数の同一アミノ酸残基又は等価なアミノ酸残基を含有する第１のアミノ酸配列を意味する。例えば、共通の構造的ドメインを含むアミノ酸配列で、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％又は少なくとも約１００％が同一であるアミノ酸配列は、十分に類似するとして本明細書中では定義される。好ましくは、変異体は、本発明の好ましいペプチドのアミノ酸配列に、特に、ＦＡＰ変異体、誘導体又はアナログのアミノ酸配列に十分に類似しているであろう。そのような変異体は一般に、本発明のペプチドの機能的活性を保持する。変異体には、１つ又は複数のアミノ酸欠失、アミノ酸付加及び／又はアミノ酸置換によって生来型ペプチド及びｗｔ型ペプチドとはアミノ酸配列においてそれぞれ異なるペプチドが含まれる。これらは、天然に存在する変異体、ならびに、人為的に設計された変異体である場合がある。

【０１０７】

さらに、用語「フラグメント」、「変異体」、「誘導体」及び「アナログ」は、本発明の抗体又は抗体ポリペプチドに言及するときには、対応する生来型の結合性分子、抗体又はポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも一部を保持するどのようなポリペプチドも含まれる。本発明のポリペプチドのフラグメントには、本明細書中の他のところで議論される具体的な抗体フラグメントに加えて、タンパク質分解的フラグメント、ならびに、欠失フラグメントが含まれる。本発明の抗体及び抗体ポリペプチドの変異体には、上記で記載されるようなフラグメント、及び、アミノ酸の置換、欠失又は挿入に起因する変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。変異体は天然に存在している場合があり、又は、天然に存在していない場合がある。天然に存在していない変異体は、この技術分野において知られている変異誘発技術を使用して作製される場合がある。変異体ポリペプチドは、保存的又は非保存的なアミノ酸置換、アミノ酸欠失又はアミノ酸付加を含む場合がある。ＦＡＰ特異的な結合性分子の誘導体、例えば、本発明の抗体及び抗体ポリペプチドの誘導体は、生来型ポリペプチドに対して見出されないさらなる特徴を示すように変化させられているポリペプチドである。例には、融合タンパク質が挙げられる。変異体ポリペプチドは、本明細書中では「ポリペプチドアナログ」として示される場合もある。本明細書中で使用される場合、結合性分子もしくはそのフラグメント、抗体又は抗体ポリペプチドの「誘導体」は、官能側鎖基の反応によって化学的に誘導体化される１つ又は複数の残基を有する当該ポリペプチドを示す。また、「誘導体」として、２０個の標準的アミノ酸の１つ又は複数の天然に存在するアミノ酸誘導体を含有するそのようなペプチドも含まれる。例えば、４－ヒドロキシｐｒｏリンがｐｒｏリンの代わりに使用されてもよい；５－ヒドロキシリシンがリシンの代わりに使用されてもよい；３－メチルヒスチジンがヒスチジンの代わりに使用されてもよい；ホモセリンがセリンの代わりに使用されてもよい；また、オルニチンがリシンの代わりに使用されてもよい。

【０１０８】
分子の類似性及び／又は同一性の決定：
２つのペプチドの間における「類似性」が、一方のペプチドのアミノ酸配列を第２のペプチドの配列に対して比較することによって求められる。一方のペプチドのアミノ酸が同一であるか、又は、保存的なアミノ酸置換であるならば、一方のペプチドのアミノ酸は第２のペプチドの対応するアミノ酸と類似している。保存的な置換には、Ｄａｙｈｏｆｆ，Ｍ．Ｏ．編、Ｔｈｅ Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ５（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．（１９７８））に記載される置換、及び、Ａｒｇｏｓ、ＥＭＢＯ Ｊ．８（１９８９）、７７９～７８５に記載される置換が含まれる。例えば、下記の群の１つに属するアミノ酸は、保存的な変化又は置換を表す：－Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｇｌｙ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ；－Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｙｒ、Ｔｈｒ；－Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｐｈｅ；－Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ；－Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｈｉｓ；及び、－Ａｓｐ、Ｇｌｕ。
【０１０９】
２つのポリヌクレオチドの間における「類似性」が、一方のポリヌクレオチドの核酸配列を所与のポリヌクレオチドの配列に対して比較することによって求められる。一方の核酸が同一であるならば、又は、核酸がコード配列の一部である場合、当該核酸を含むそれぞれのトリプレットが、同じアミノ酸又は保存的なアミノ酸置換をコードするならば、一方のポリヌクレオチドの核酸は第２のポリヌクレオチドの対応する核酸と類似している。
【０１１０】
２つの配列の間におけるパーセント同一性又はパーセント類似性の決定が好ましくは、Ｋａｒｌｉｎ及びＡｌｔｓｃｈｕｌ（１９９３）（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９０：５８７３～５８７７）の数学的アルゴリズムを使用して達成される。そのようなアルゴリズムが、ＮＣＢＩ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）において利用可能なＡｌｔｓｃｈｕｌ他（１９９０）（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０）のＢＬＡＳＴｎプログラム及びＢＬＡＳＴｐプログラムに組み込まれる。
【０１１１】
パーセント同一性又はパーセント類似性の決定が、ＮＣＢＩのウエブページで推奨されるような、また、特定の長さ及び組成の配列に関しての「ＢＬＡＳＴ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｇｕｉｄｅ」に記載されるような、ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索についてはＢＬＡＳＴｎプログラムの標準的なパラメーター、ＢＬＡＳＴタンパク質検索についてはＢＬＡＳＴｐプログラムの標準的なパラメーターを用いて行われる。ＢＬＡＳＴポリヌクレオチド検索が、ＢＬＡＳＴｎプログラムを用いて行われる。
【０１１２】
一般的なパラメーターについては、「Ｍａｘ Ｔａｒｇｅｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ボックスが１００に設定される場合があり、「Ｓｈｏｒｔ ｑｕｅｒｉｅｓ」ボックスにチェックが入れられる場合があり、「Ｅｘｐｅｃｔ ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ」ボックスが１０００に設定される場合があり、「Ｗｏｒｄ Ｓｉｚｅ」ボックスが７に設定される場合があり、これらはＮＣＢＩのウエブページにおいて短い配列（２０塩基未満）について推奨される通りである。より長い配列については、「Ｅｘｐｅｃｔ ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ」ボックスが１０に設定される場合があり、「Ｗｏｒｄ Ｓｉｚｅ」ボックスが１１に設定される場合がある。スコア化パラメーターについては、「Ｍａｔｃｈ／ｍｉｓｍａｔｃｈ Ｓｃｏｒｅｓ」が、１、－２に設定される場合があり、「Ｇａｐ Ｃｏｓｔｓ」ボックスが直線に設定される場合がある。フィルター及びマスキングパラメーターについては、「Ｌｏｗ ｃｏｍｐｌｅｘｉｔｙ ｒｅｇｉｏｎｓ」ボックスにチェックが入れられない場合があり、「Ｓｐｅｃｉｅｓ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ」ボックスにチェックが入れられない場合があり、「Ｍａｓｋ ｆｏｒ ｌｏｏｋｕｐ ｔａｂｌｅ ｏｎｌｙ」ボックスにチェックが入れられる場合があり、「ＤＵＳＴ Ｆｉｌｔｅｒ Ｓｅｔｔｉ

ｎｇｓ」にチェックが入れられる場合があり、「Ｍａｓｋ ｌｏｗｅｒ ｃａｓｅ ｌｅｔｔｅｒｓ」ボックスにチェックが入れられない場合がある。一般に、「Ｓｅａｒｃｈ ｆｏｒ ｓｈｏｒｔ ｎｅａｒｌｙ ｅｘａｃｔ ｍａｔｃｈｅｓ」がこの点に関して使用される場合があり、これにより、上記で示された設定のほとんどが提供される。この点に関してのさらなる情報は、ＮＣＢＩのウエブページで公開される「ＢＬＡＳＴ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｇｕｉｄｅ」に見出される場合がある。

【０１１３】

ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、ＢＬＡＳＴｐプログラムを用いて行われる。一般的なパラメーターについては、「Ｍａｘ Ｔａｒｇｅｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ボックスが１００に設定される場合があり、「Ｓｈｏｒｔ ｑｕｅｒｉｅｓ」ボックスにチェックが入れられる場合があり、「Ｅｘｐｅｃｔ ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ」ボックスが１０に設定される場合があり、「Ｗｏｒｄ Ｓｉｚｅ」ボックスが「３」に設定される場合がある。スコア化パラメーターについては、「Ｍａｔｒｉｘ」ボックスが「ＢＬＯＳＵＭ６２」に設定される場合があり、「Ｇａｐ Ｃｏｓｔｓ」ボックスが「Ｅｘｉｓｔｅｎｃｅ：１１ Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ：１」に設定される場合があり、「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎａｌ ａｄｊｕｓｔｍｅｎｔｓ”ボックスが“Ｃｏｎｄｉｔｉｏｎａｌ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎａｌ ｓｃｏｒｅ ｍａｔｒｉｘ ａｄｊｕｓｔｍｅｎｔ”に設定される場合がある。フィルター及びマスキングパラメーターについては、“Ｌｏｗ ｃｏｍｐｌｅｘｉｔｙ ｒｅｇｉｏｎｓ」ボックスにチェックが入れられない場合があり、「Ｍａｓｋ ｆｏｒ ｌｏｏｋｕｐ ｔａｂｌｅ ｏｎｌｙ」ボックスにチェックが入れられない場合があり、「Ｍａｓｋ ｌｏｗｅｒ ｃａｓｅ ｌｅｔｔｅｒｓ」ボックスにチェックが入れられない場合がある。

【０１１４】

両方のプログラムの改変、例えば、検索された配列の長さに関しての改変は、ＮＣＢＩのウエブページにおいてＨＴＭＬ版及びＰＤＦ版で公開される「ＢＬＡＳＴ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｇｕｉｄｅ」における推奨に従って行われる。

【０１１５】

ポリヌクレオチド：

用語「ポリヌクレオチド」は、１つだけの核酸ならびに複数の核酸を包含することが意図され、単離された核酸分子又は核酸構築物、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）又はプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）を示す。ポリヌクレオチドは、従来型のホスホジエステル結合又は非従来型の結合（例えば、アミド結合、例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）に見出されるアミド結合など）を含む場合がある。用語「核酸」は、ポリヌクレオチドに存在するいずれかの１つ又は複数の核酸セグメント（例えば、ＤＮＡフラグメント又はＲＮＡフラグメント）を示す。「単離された」核酸又はポリヌクレオチドによって、そのネイティブ環境から取り出されている核酸分子（ＤＮＡ又はＲＮＡ）が意図される。例えば、ベクターに含有される、抗体をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の様々な目的のために単離されていると見なされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例には、異種の宿主細胞において維持される組換えポリヌクレオチド、又は、溶液における（部分的又は実質的に）精製されたポリペプチドが含まれる。単離されたＲＮＡ分子には、本発明のポリヌクレオチドのインビボＲＮＡ転写物又はインビトロＲＮＡ転写物が含まれる。本発明による単離されたポリヌクレオチド又は核酸にはさらに、合成的に作製されるそのような分子が含まれる。加えて、ポリヌクレオチド又は核酸は、調節エレメント、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位又は転写ターミネーターなどである場合があり、あるいは、調節エレメント、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位又は転写ターミネーターなどを包含する場合がある。

【０１１６】

本明細書中で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部分である。「終止コドン」（ＴＡＧ、ＴＧＡ又はＴＡＡ）はアミノ酸に翻訳されないにもかかわらず、コード領域の一部であると見なされる場合があるが、近接配列

はどれも、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどはコード領域の一部ではない。本発明の２つ以上のコード領域を、１つのポリヌクレオチド構築物において、例えば、１つのベクターに存在させることができ、又は、別個のポリヌクレオチド構築物において、例えば、別個の（異なる）ベクターに存在させることができる。さらには、ベクターはどれも、１つだけのコード領域を含有する場合があり、又は、２つ以上のコード領域を含む場合があり、例えば、１つのベクターが免疫グロブリン重鎖可変領域及び免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードする場合がある。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド又は核酸は、結合性分子、抗体、あるいは、そのフラグメント、変異体又は誘導体をコードする核酸に融合されて、又は融合されずに、異種のコード領域をコードする場合がある。異種のコード領域には、限定されないが、特殊化されたエレメント又はモチーフ、例えば、分泌シグナルペプチド又は異種の機能的ドメインなどが含まれる。

【０１１７】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド又は核酸はＤＮＡである。ＤＮＡの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは通常、１つ又は複数のコード領域と操作可能に連係させられるプロモーターならびに／あるいは他の転写制御エレメント又は翻訳制御エレメントを含む場合がある。操作可能連係は、遺伝子産物（例えば、ポリペプチド）のためのコード領域が、当該遺伝子産物の発現を当該調節配列の影響下又は制御下に置くような様式で１つ又は複数の調節配列と連係させられるときにおいてである。２つのＤＮＡフラグメント（例えば、ポリペプチドコード領域及びそれと連係させられるプロモーターなど）は、プロモーター機能の誘導により、所望される遺伝子産物をコードするｍＲＮＡの転写が生じるならば、また、これら２つのＤＮＡフラグメントの間における連結の性質が、遺伝子産物の発現を導く発現調節配列の能力を妨げないか、又は、転写されるＤＮＡテンプレートの能力を妨げないならば、「操作可能に連係させられる」又は「操作可能に連結される」。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写を達成することができたならば、ポリペプチドをコードする核酸と操作可能に連係させられているであろう。プロモーターは、ＤＮＡの実質的な転写を所定の細胞においてのみ導く細胞特異的なプロモーターである場合がある。プロモーターのほかに、他の転写制御エレメントを、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー及び転写終結シグナルを、細胞特異的な転写を導くためにポリヌクレオチドと操作可能に連係させることができる。好適なプロモーター及び他の転写制御領域が本明細書中に開示される。

【０１１８】

様々な転写制御領域が当業者に知られている。これらには、限定されないが、脊椎動物細胞において機能する転写制御領域、例えば、サイトメガロウイルス由来のプロモーターセグメント及びエンハンサーセグメント（前初期プロモーター、イントロンＡとの併用で）、シミアンウイルス４０由来のプロモーターセグメント及びエンハンサーセグメント（初期プロモーター）、ならびに、レトロウイルス（例えば、ラウス肉腫ウイルス）由来のプロモーターセグメント及びエンハンサーセグメントなど（これらに限定されない）が含まれる。他の転写制御領域には、脊椎動物の遺伝子（例えば、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン及びウサギβ－グロビンなど）に由来する転写制御領域ならびに遺伝子発現を真核生物細胞において制御することができる他の配列が含まれる。さらなる好適な転写制御領域には、組織特異的なプロモーター及びエンハンサー、ならびに、リンホカイン誘導性プロモーター（例えば、インターフェロン又はインターロイキンによって誘導可能であるプロモーター）が含まれる。

【０１１９】

同様に、様々な翻訳制御エレメントが当業者に知られている。これらには、リボソーム結合部位、翻訳開始コドン及び翻訳終結コドン、ならびに、ピコルナウイルスに由来するエレメント（特に、配列内リボソーム進入部位、すなわち、ＩＲＥＳ、これはまたＣＩＴＥ配列とも称する）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１２０】

他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドはＲＮＡであり、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態である。

【０１２１】

本発明のポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、分泌ペプチド又はシグナルペプチドをコードし、これにより、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を導くさらなるコード領域と連係させられる場合がある。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、粗面小胞体を横断する成長途中のタンパク質鎖の移行が開始されると、成熟型タンパク質から切断されるシグナルペプチド又は分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドは一般に、当該ポリペプチドのＮ末端に融合されるシグナルペプチドで、当該ポリペプチドの分泌型形態又は「成熟型」形態をもたらすために、完全なポリペプチド又は「全長」のポリペプチドから切断されるシグナルペプチドを有することを承知している。特定の実施形態において、生来型のシグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖又は免疫グロブリン軽鎖のシグナルペプチドが使用されるか、又は、操作可能に連係させられるポリペプチドの分泌を導く能力を保持するその配列の機能的誘導体が使用される。代替では、異種の哺乳動物シグナルペプチド又はその機能的誘導体が使用されてもよい。例えば、野生型のリーダー配列がヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）又はマウスβ－グルクロニダーゼのリーダー配列により置き換えられる場合がある。

【０１２２】

「結合性分子」又は「ＦＡＰ結合剤」は、本発明に関連して使用される場合、主として抗体及びそのフラグメントに関し、しかし、ＦＡＰに結合する他の非抗体分子を示す場合もあり、これらには、ホルモン、受容体、リガンド、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）分子、シャペロン（例えば、熱ショックタンパク質（ＨＳＰ）など）、ならびに、細胞・細胞接着分子（例えば、カドヘリンスーパーファミリー、インテグリンスーパーファミリー、Ｃ型レクチンスーパーファミリー及び免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーのメンバーなど）が含まれるが、これらに限定されない。したがって、明瞭性だけのために、また、本発明の範囲を限定することなく、下記の実施形態のほとんどが、治療剤及び診断剤を開発するための好ましい結合性分子を代表する抗体及び抗体様分子に関して議論される。

【０１２３】

抗体：

用語「抗体」及び用語「免疫グロブリン」は本明細書中では交換可能に使用される。抗体又は免疫グロブリンは、重鎖の可変ドメインを少なくとも含み、かつ、通常の場合には重鎖及び軽鎖の可変ドメインを少なくとも含む結合性分子である。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は比較的よく理解されている（例えば、Ｈａｒｌｏｗ他、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、第２版、１９８８）を参照のこと）。

【０１２４】

より詳しく下記で議論されるように、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に識別することができる様々な幅広いクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ又はイプシロン（γ、μ、α、δ、ε）として、それらの中のいくつかのサブクラス（例えば、γ１～γ４）を伴って分類されることを理解するであろう。抗体の「クラス」を、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＧ又はＩｇＥとしてそれぞれ決定するのが、この鎖の性質である。免疫グロブリンのサブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１などが十分に特徴づけられており、また、機能的な特殊化を与えることが知られている。これらのクラス及びアイソタイプのそれぞれの改変された型が、本開示を考慮して当業者には容易に認識可能であり、従って、本発明の範囲内である。すべての免疫グロブリンクラスが明らかに本発明の範囲内であり、下記の議論は一般に、免疫グロブリン分子のＩｇＧクラスに関する。ＩｇＧに関し

て、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量がおよそ２３，０００ダルトンである２つの同一の軽鎖ポリペプチドと、分子量が５３，０００～７０，０００である２つの同一の重鎖ポリペプチドとを含む。これら４つの鎖は典型的には、軽鎖が、「Ｙ」字型の口部から始まり、可変領域の終わりまで続く腕木として重鎖を支える「Ｙ」字型の立体配置でジスルフィド結合によって結合される。

【０１２５】

軽鎖はカッパ又はラムダ（κ、λ）のどちらかとして分類される。それぞれの重鎖クラスがカッパ軽鎖又はラムダ軽鎖のどちらかと結合し得る。一般には、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、Ｂ細胞、又は、遺伝子操作された宿主細胞のどれかによって生じるとき、軽鎖及び重鎖は互いに共有結合により結合し、２つの重鎖の「テール」部分が共有結合性のジスルフィド連結又は非共有結合性の連結によって互いに結合する。重鎖において、アミノ酸配列が、Ｙ字型の立体配置の二叉末端におけるＮ末端から、それぞれの鎖の底部におけるＣ末端にまで延びる。

【０１２６】

軽鎖及び重鎖はともに、構造的及び機能的に相同的である領域に分けられる。用語「定常」及び「可変」が機能的に使用される。これに関連して、軽鎖部分及び重鎖部分の両方の可変ドメイン（ＶＬ及びＶＨ）により、抗原認識及び特異性が決定されることが理解されるであろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン（ＣＬ）及び重鎖の定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２又はＣＨ３）により、様々な重要な生物学的性質、例えば、分泌、経胎盤移動性、Ｆｃ受容体結合及び補体結合などが与えられる。慣例によって、定常領域ドメインの番号づけは、これらのドメインが抗体の抗原結合部位又はアミノ末端からより遠位になるにつれて大きくなる。Ｎ末端部分が可変領域であり、Ｃ末端部分が定常領域である；ＣＨ３ドメイン及びＣＬドメインが実際に、重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端をそれぞれ含む。

【０１２７】

上記で示されるように、可変領域により、抗体は抗原上のエピトープを選択的に認識し、かつ、このエピトープと特異的に結合することができる。すなわち、抗体のＶＬドメイン及びＶＨドメイン、又は、抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）のサブセットが組み合わさって、三次元の抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。この四元抗体構造が、Ｙ字型のそれぞれのアームの端部に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位がＶＨ鎖及びＶＬ鎖のそれぞれにおける３つのＣＤＲによって規定される。ＦＡＰに特異的に結合するための十分な構造を含有する抗体又は免疫グロブリンフラグメントはどれも、本明細書中では交換可能に、「結合フラグメント」又は「免疫特異性フラグメント」として示される。

【０１２８】

天然に存在する抗体において、抗体は、抗体がその三次元立体配置を水性環境において取るような抗原結合ドメインを形成するために特異的に配置されるアミノ酸の短い不連続な配列である６つの超可変領域（これらは時には、それぞれの抗原結合ドメインに存在する「相補性決定領域」又は「ＣＤＲ」と呼ばれる）を含む。「ＣＤＲ」には、分子間の変動性をそれほど示さない４つの比較的保存された「フレームワーク」領域又は「ＦＲ」が近接する。これらのフレームワーク領域は主としてβ－シートの立体配座を取り、ＣＤＲにより、このβ－シート構造をつなぐ、また、時にはこのβ－シート構造の一部を形成するループが形成される。したがって、フレームワーク領域は、ＣＤＲを鎖間の非共有結合性の相互作用によって正しい配向で配置することを提供する足場を形成するように作用する。配置されたＣＤＲによって形成される抗原結合ドメインにより、免疫反応性抗原におけるエピトープに対して相補的な表面が規定される。この相補的な表面は、抗体がその同種エピトープに非共有結合的に結合することを促進させる。ＣＤＲ及びフレームワーク領域を構成するアミノ酸が、それらは正確に規定されているので、当業者によっていずれかの所与の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域についてそれぞれ容易に特定され得る；「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、Ｋａｂａｔ，Ｅ．他編、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔ

ｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９８３）、及び、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６（１９８７）、９０１～９１７を参照のこと。

【０１２９】

この技術分野において使用される、及び／又は受け入れられる用語の２つ以上の定義が存在する場合には、本明細書中で使用されるような当該用語の定義は、反するようなことが明示的に言及される場合を除き、すべてのそのような意味を包含することが意図される。具体的な一例が、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域の中に見出される不連続な抗原結合部位を記述するための用語「相補性決定領域」（「ＣＤＲ」）の使用である。この特定の領域が、Ｋａｂａｔ他、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」（１９８３）によって、また、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６（１９８７）、９０１～９１７によって記載されており（これらは参照によって本明細書中に組み込まれる）、この場合、それらの定義は、互いに比較されたときにはアミノ酸残基の重複又はサブセットを包含する。それにもかかわらず、抗体又はその変異体のＣＤＲを示すためのどちらかの定義の適用は、本明細書中で定義され、かつ使用されるようなこの用語の範囲内であることが意図される。上記で引用された参考文献のそれぞれによって定義されるようなＣＤＲを包含する適切なアミノ酸残基が、比較として下記において表Ｉに示される。特定のＣＤＲを包含する正確な残基番号は、ＣＤＲの配列及びサイズに依存して変わる。当業者は、どの残基が、抗体の可変領域アミノ酸配列が与えられる抗体のヒトＩｇＧサブタイプの特定の超可変領域又はＣＤＲを含むかを常法により決定することができる。

【表１】

表Ｉ：ＣＤＲの定義[1]	**Kabat**	**Chothia**
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

１表Ｉにおけるすべてのｃｄｒ定義の番号表記は、Ｋａｂａｔ他によって示される番号表記慣例に従う（下記を参照のこと）。

【０１３０】

Ｋａｂａｔ他はまた、どのような抗体に対しても適用可能である可変ドメイン配列のための番号表記システムを定義した。当業者は、「Ｋａｂａｔ番号表記」のこのシステムを、配列そのものを超える実験的データに何ら頼ることなく、どのような可変ドメイン配列に対してでも一義的に割り当てることができる。本明細書中で使用される場合、「Ｋａｂａｔ番号表記」は、Ｋａｂａｔ他、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」（１９８３）によって示される番号表記システムを示す。別途指定される場合を除き、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体における具体的なアミノ酸残基位置の番号表記に対する言及は、Ｋａｂａｔ番号表記システムに従っており、しかしながら、Ｋａｂａｔ番号表記システムは理論的であり、本発明のどの抗体にも等しく適用されない場合がある。例えば、最初のＣＤＲの位置に依存して、その後のＣＤＲはどちらかの方向でずれる場合がある。

【０１３１】
本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、免疫特異性フラグメント、変異体又は誘導体には、ポリクローナル性、モノクローナル性、多特異性、ヒト型、ヒト化型、霊長類化型、マウス化型又はキメラ型の抗体、単鎖抗体、エピトープ結合フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’及びＦ（ａｂ’）２）、Ｆｄ、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単鎖抗体、ジスルフィド連結Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、ＶＬドメイン又はＶＨドメインのどちらかを含むフラグメント、Ｆａｂ発現ライブラリーによって作製されるフラグメント、ならびに、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体（例えば、本明細書中に開示される抗体に対する抗Ｉｄ抗体を含む）が含まれるが、これらに限定されない。ｓｃＦＶ分子がこの技術分野では知られており、例えば、米国特許第５，８９２，０１９号に記載される。本発明の免疫グロブリン分子又は抗体分子は、免疫グロブリン分子のどのようなタイプのものも（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ及びＩｇＹ）、どのようなクラスのものも（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２）又はどのようなサブクラスのものも可能である。

【０１３２】
１つの実施形態において、本発明の抗体は、五価構造を有するＩｇＭ又はその誘導体ではない。特に、本発明の具体的な適用において、とりわけ治療的使用において、ＩｇＭはＩｇＧ及び他の二価抗体又は対応する結合性分子よりも有用でない。これは、ＩｇＭは、その五価構造のために、また、親和性成熟化の欠如のために、非特異的な交差反応性及び非常に低い親和性を示すことが多いからである。

【０１３３】
特に好ましい実施形態において、本発明の抗体はポリクローナル抗体でない。すなわち、本発明の抗体は、血漿の免疫グロブリンサンプルから得られる混合物ではなく、むしろ、１つの特定の抗体種から実質的になる。

【０１３４】
単鎖抗体を含めて、抗体フラグメントは、可変領域（１つ又は複数）を単独で、あるいは、下記の全体又は一部分との組合せで含む場合がある：ヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメイン。また、本発明には、可変領域（１つ又は複数）と、ヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメインとのどのような組合せをも含むＦＡＰ結合フラグメントが含まれる。本発明の抗体又はその免疫特異性フラグメントは、鳥類及び哺乳動物を含めて、どのような動物起源に由来してもよい。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ又はニワトリの抗体である。別の実施形態において、可変領域が起源において（例えば、サメからの）コンドリクトイド（ｃｏｎｄｒｉｃｔｈｏｉｄ）である場合がある。

【０１３５】
１つの実施形態において、本発明の抗体は、ヒトから単離されるヒトモノクローナル抗体である。場合により、ヒト抗体のフレームワーク領域がデータベースにおける該当するヒト生殖系列可変領域配列に従ってアライメントされ、それらと一致させられる；例えば、ＭＲＣ Ｃｅｎｔｒｅ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、英国）によって提供されるＶｂａｓｅ（ｈｔｔｐ：／／ｖｂａｓｅ．ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／）を参照のこと。例えば、真の生殖系列配列から潜在的に逸脱すると見なされるアミノ酸は、クローニング過程の期間中に組み込まれるＰＣＲプライマー配列に起因し得ると思われる。人為的に作製されたヒト様抗体、例えば、ファージディスプレーされた抗体ライブラリー又は異種マウスに由来する単鎖抗体フラグメント（ｓｃＦＶ）などと比較した場合、本発明のヒトモノクローナル抗体は、（ｉ）代理動物の免疫応答ではなく、ヒトの免疫応答を使用して得られること、すなわち、抗体が、ヒト体内におけるその関連する立体配座における天然のＦＡＰに対する応答で作製されていること、（ｉｉ）個体を保護しているか、あるいは、ＦＡＰの存在について少なくとも有意であること、そして、（ｉｉｉ）抗体がヒト起源であるので、自己抗原に対する交差反応性の危険性が最小限に抑えられることによって特徴づけられる。したがって、本発明によ

れば、用語「ヒトモノクローナル抗体」、「ヒトモノクローナル自己抗体」及び「ヒト抗体」などは、ヒト起源である、すなわち、ヒト細胞（例えば、Ｂ細胞又はそのハイブリドーマなど）から単離されているか、あるいは、ｃＤＮＡがヒト細胞（例えば、ヒトメモリーＢ細胞）のｍＲＮＡから直接クローン化されているＦＡＰ結合性分子を示すために使用される。ヒト抗体は、アミノ酸置換が、例えば、結合特性を改善するために、当該抗体においてたとえ行われるにしても、依然として「ヒト」である。

【０１３６】

１つの実施形態において、本発明のヒト由来抗体は、天然の存在する抗体と比較して異種の領域を含み、例えば、フレームワーク領域におけるアミノ酸置換、可変領域に外因的に融合される定常領域、及び、Ｃ末端又はＮ末端における異なるアミノ酸などを含む。

【０１３７】

ヒト免疫グロブリンライブラリーに由来する抗体、あるいは、１つ又は複数のヒト免疫グロブリンについて遺伝子組換えであり、かつ、内因性免疫グロブリンを発現しない動物に由来する抗体（下記において、また、例えば、米国特許第５，９３９，５９８号（Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ他）に記載されるような抗体）は、本発明の真のヒト抗体から区別するためにヒト様抗体として示される。

【０１３８】

例えば、ヒト様抗体の重鎖及び軽鎖の対形成、例えば、ファージディスプレーから典型的には単離される合成抗体及び半合成抗体などは、その対形成が元々のヒトＢ細胞において生じていたような元の対形成を必ずしも反映していない。したがって、先行技術において一般に使用されるような組換え発現ライブラリーから得られるＦａｂフラグメント及びｓｃＦｖフラグメントは、免疫原性及び安定性に対するすべての可能な関連した影響に関して人為的であると見なされる。

【０１３９】

対照的には、本発明は、その治療的有用性及びヒトにおけるその寛容性によって特徴づけられる、選択されたヒト対象から得られる単離された親和性成熟している抗体を提供する。

【０１４０】

本明細書中で使用される場合、用語「齧歯類化（された）抗体」又は「齧歯類化（された）免疫グロブリン」は、本発明のヒト抗体に由来する１つ又は複数のＣＤＲと、齧歯類抗体配列に基づくアミノ酸の置換及び／又は欠失及び／又は挿入を含有するヒトフレームワーク領域とを含む抗体を示す。齧歯類を示すとき、好ましくは、マウス及びラットに起源を有する配列が使用され、この場合、そのような配列を含む抗体は、「マウス化された」又は「ラット化された」としてそれぞれ示される。ＣＤＲを提供するヒト免疫グロブリンは「親」又は「アクセプター」と呼ばれ、フレームワークの変化を提供する齧歯類抗体は「ドナー」と呼ばれる。定常領域は存在している必要はないが、定常領域が存在するならば、定常領域は通常、齧歯類抗体の定常領域と実質的に同一であり、すなわち、少なくとも約８５％～９０％が同一であり、好ましくは約９５％以上が同一である。したがって、いくつかの実施形態において、全長のマウス化されたヒト重鎖免疫グロブリン又は軽鎖免疫グロブリンは、マウスの定常領域、ヒトのＣＤＲ、及び、いくつかの「マウス化する」アミノ酸置換を有する実質的にはヒトのフレームワークを含有する。典型的には、「マウス化抗体」は、マウス化された可変軽鎖及び／又はマウス化された可変重鎖を含む抗体である。例えば、マウス化抗体は、例えば、キメラ抗体の可変領域全体が非マウス性であるので、典型的なキメラ抗体を包含しないであろう。「マウス化」のプロセスによって「マウス化」されている改変された抗体は、ＣＤＲを提供する親抗体と同じ抗原に結合し、かつ、通常の場合、マウスにおける免疫原性が、親抗体と比較してより低い。「マウス化」抗体に関しての上記説明は、他の「齧歯類化」抗体について、例えば、ラットの配列がマウスの代わりに使用される「ラット化抗体」などについて同様に当てはまる。

【０１４１】

本明細書中で使用される場合、用語「重鎖部分」には、免疫グロブリン重鎖に由来する

アミノ酸配列が含まれる。重鎖部分を含むポリペプチドは、ＣＨ１ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中央及び／又は下部のヒンジ領域）ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメインあるいはそれらの変異体又はフラグメントのうちの少なくとも１つを含む。例えば、本発明において使用されるための結合性ポリペプチドは、ＣＨ１ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、及び、ＣＨ２ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン及びＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、及び、ＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖；又は、ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖を含む場合がある。別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、ＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明において使用されるための結合性ポリペプチドは、ＣＨ２ドメインの少なくとも一部分（例えば、ＣＨ２ドメインのすべて又は一部）を欠く場合がある。上記で示されるように、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）は、天然に存在する免疫グロブリン分子からアミノ酸配列において異なるように改変され得ることが、当業者によって理解されるであろう。

【０１４２】

本明細書中に開示されるある特定の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体において、マルチマーの１つのポリペプチド鎖の重鎖部分が、当該マルチマーの第２のポリペプチド鎖における重鎖部分と同一である。代替では、本発明の重鎖部分を含有するモノマーは同一でない。例えば、それぞれのモノマーが、異なる標的結合部位を含む場合があり、これにより、例えば、二重特異性抗体又はディアボディを形成する。

【０１４３】

別の実施形態において、本明細書中に開示される抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、ただ１つのポリペプチド鎖から構成され（例えば、ｓｃＦｖ）、潜在的なインビボ治療適用及び診断適用のために細胞内で発現させられることになる（細胞内抗体）。

【０１４４】

本明細書中に開示される診断方法及び処置方法において使用されるための結合性ポリペプチドの重鎖部分が、異なる免疫グロブリン分子に由来してもよい。例えば、ポリペプチドの重鎖部分が、ＩｇＧ１分子に由来するＣＨ１ドメインと、ＩｇＧ３分子に由来するヒンジ領域とを含む場合がある。別の例において、重鎖部分は、一部がＩｇＧ１分子に由来し、かつ、一部がＩｇＧ３分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、一部がＩｇＧ１分子に由来し、かつ、一部がＩｇＧ４分子に由来するキメラなヒンジを含むことができる。

【０１４５】

本明細書中で使用される場合、用語「軽鎖部分」には、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。好ましくは、軽鎖部分はV_Lドメイン又はＣＬドメインの少なくとも一方を含む。

【０１４６】

抗体のためのペプチドエピトープ又はポリペプチドエピトープの最小サイズは約４個～５個のアミノ酸であると考えられる。ペプチドエピトープ又はポリペプチドエピトープは好ましくは、少なくとも７個のアミノ酸を含有し、より好ましくは少なくとも９個のアミノ酸を含有し、最も好ましくは少なくとも約１５個～約３０個の間のアミノ酸を含有する。ＣＤＲは抗原性のペプチド又はポリペプチドをその三次形態で認識することができるので、エピトープを含むアミノ酸は連続している必要はなく、場合により、同じペプチド鎖に存在していないことさえある。本発明において、本発明の抗体によって認識されるペプチドエピトープ又はポリペプチドエピトープは、ＦＡＰの少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、より好ましくは少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、又は、約１５個～約３０個の間の連続するアミノ酸又は非連続なアミノ酸の配列を含有する。

【０１４７】

「特異的に結合する」又は「特異的に認識する」によって、これらは本明細書中では交換可能に使用されており、結合性分子、例えば、抗体が、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、及び、この結合は、抗原結合ドメインとエピトープとの間における何らかの相補性を伴うことが一般に意味される。この定義によれば、抗体は、抗体がランダムな無関係なエピトープに結合するであろうよりも容易にその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合するとき、そのエピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、ある特定の抗体がある特定のエピトープに結合する相対的な親和性を限定するために本明細書中では使用される。例えば、抗体「Ａ」は、所与のエピトープについて、抗体「Ｂ」よりも大きい親和性を有すると見なされる場合があり、又は、抗体「Ａ」は、関連したエピトープ「Ｄ」について有するよりも大きい特異性によりエピトープ「Ｃ」に結合すると言われる場合がある。

【０１４８】

存在する場合、抗原との抗体の用語「免疫学的結合特性」又は他の結合特性はその文法的形態のすべてで、抗体の特異性、親和性、交差反応性及び他の結合特性を示す。

【０１４９】

「優先的に結合する」によって、結合性分子、例えば、抗体が、関連したエピトープ、類似したエピトープ、相同的なエピトープ又は類似的なエピトープに結合するであろうよりも容易にエピトープに特異的に結合することが意味される。したがって、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、そのような抗体が関連のエピトープと交差反応することがあるとしても、関連のエピトープよりもそのエピトープに結合する可能性が大きいであろう。

【０１５０】

非限定的な例として、結合性分子、例えば、抗体は、この抗体が第２のエピトープについての抗体のK_Dよりも小さい解離定数（K_D）により第１のエピトープと結合するならば、この第１のエピトープと優先的に結合すると見なされる場合がある。別の非限定的な例において、抗体は、この抗体が第２のエピトープについての抗体のK_Dよりも少なくとも１桁小さい親和性により第１のエピトープと結合するならば、この第１の抗原と優先的に結合すると見なされる場合がある。別の非限定的な例において、抗体は、この抗体が第２のエピトープについての抗体のK_Dよりも少なくとも２桁小さい親和性により第１のエピトープと結合するならば、この第１のエピトープと優先的に結合すると見なされる場合がある。

【０１５１】

別の非限定的な例として、結合性分子、例えば、抗体は、この抗体が第２のエピトープについての抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも小さいオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））により第１のエピトープと結合するならば、この第１のエピトープと優先的に結合すると見なされる場合がある。別の非限定的な例において、抗体は、この抗体が第２のエピトープについての抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも少なくとも１桁小さい親和性により第１のエピトープと結合するならば、この第１のエピトープと優先的に結合すると見なされる場合がある。別の非限定的な例において、抗体は、この抗体が第２のエピトープについての抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも少なくとも２桁小さい親和性により第１のエピトープと結合するならば、この第１のエピトープと優先的に結合すると見なされる場合がある。

【０１５２】

結合性分子、例えば、本明細書中に開示される抗体あるいは抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、5×10^{-2} ｓｅｃ$^{-1}$以下、10^{-2} ｓｅｃ$^{-1}$以下、5×10^{-3} ｓｅｃ$^{-1}$以下又は10^{-3} ｓｅｃ$^{-1}$以下であるオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））によりＦＡＰあるいはそのフラグメント、変異体又は特異的な立体配座と結合すると言われる場合がある。より好ましくは、本発明の抗体は、5×10^{-4} ｓｅｃ$^{-1}$以下、10^{-4} ｓｅｃ$^{-1}$以下、5×10^{-5} ｓｅｃ$^{-1}$以下又は10^{-5} ｓｅｃ$^{-1}$以下、5×10^{-6} ｓｅｃ$^{-1}$以下、10^{-6} ｓｅｃ$^{-1}$以下、5×10^{-7} ｓｅｃ$^{-1}$以下又は10^{-7} ｓｅｃ$^{-1}$以下であるオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））によりＦＡＰあるいはそのフラグメント、変

異体又は特異的な立体配座と結合すると言われる場合がある。

【０１５３】

結合性分子、例えば、本明細書中に開示される抗体あるいは抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、$10^3 M^{-1} sec^{-1}$以上、$5\times10^3 M^{-1} sec^{-1}$以上、$10^4 M^{-1} sec^{-1}$以上又は$5\times10^4 M^{-1} sec^{-1}$以上であるオン速度（ｋ（ｏｎ））によりＦＡＰあるいはそのフラグメント、変異体又は特異的な立体配座と結合すると言われる場合がある。より好ましくは、本発明の抗体は、$10^5 M^{-1} sec^{-1}$以上、$5\times10^5 M^{-1} sec^{-1}$以上、$10^6 M^{-1} sec^{-1}$以上又は$5x10^6 M^{-1} sec^{-1}$以上又は$10^7 M^{-1} sec^{-1}$以上であるオン速度（ｋ（ｏｎ））によりＦＡＰあるいはそのフラグメント、変異体又は特異的な立体配座と結合すると言われる場合がある。

【０１５４】

結合性分子、例えば、抗体は、所与のエピトープに対する参照抗体の結合をある程度阻止する程度にそのエピトープに優先的に結合するならば、そのエピトープに対する参照抗体の結合を競合的に阻害すると言われる。競合的阻害が、この技術分野において知られているいずれかの方法によって、例えば、競合的ＥＬＩＳＡアッセイによって求められてもよい。抗体は、所与のエピトープに対する参照抗体の結合を、少なくとも９０％、少なくとも８０％、少なくとも７０％、少なくとも６０％又は少なくとも５０％競合的に阻害すると言われる場合がある。

【０１５５】

本明細書中で使用される場合、用語「親和性」は、結合性分子（例えば、免疫グロブリン分子）のＣＤＲとの個々のエピトープの結合の強さの尺度を示す（例えば、Ｈａｒｌｏｗ他、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、第２版（１９８８）、２７頁～２８頁を参照のこと）。本明細書中で使用される場合、用語「アビディティー」は、免疫グロブリンの集合と抗原との複合体の全般的な安定性、すなわち、抗原との免疫グロブリン混合物の機能的結合強度を示す（例えば、Ｈａｒｌｏｗ、２９頁～３４頁を参照のこと）。アビディティーは、特異的なエピトープとの集団内の個々の免疫グロブリン分子の親和性に、及びまた、免疫グロブリン及び抗原の結合価の両方に関連づけられる。例えば、二価のモノクローナル抗体と、高度に反復するエピトープ構造を有する抗原（例えば、ポリマーなど）との間における相互作用が、高いアビディティーの１つであろう。抗原についての抗体の親和性又はアビディティーを、いずれかの好適な方法（例えば、Ｂｅｒｚｏｆｓｋｙ他、「Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ａｎｔｉｇｅｎ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ」、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｐａｕｌ，Ｗ．Ｅ．編、Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ（１９８４）；Ｋｕｂｙ，Ｊａｎｉｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ（１９９２）を参照のこと）及び本明細書中に記載される方法を使用して実験的に求めることができる。抗原についての抗体の親和性を測定するための一般的な技術には、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ及び表面プラズモン共鳴が含まれる。特定の抗体－抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件（例えば、塩濃度、ｐＨ）のもとで測定されるならば異なる可能性がある。したがって、親和性及び他の抗原結合パラメーター（例えば、K_D、IC_{50}）の測定は好ましくは、抗体及び抗原の標準化された溶液ならびに標準化された緩衝液を用いて行われる。

【０１５６】

結合性分子、例えば、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体はまた、それらの交差反応性に関して記載又は指定される場合がある。本明細書中で使用される場合、用語「交差反応性」は、抗体（これは１つの抗原について特異的である）が第２の抗原と反応する能力、すなわち、２つの異なる抗原性物質の間における関連度の度合いを示す。したがって、抗体は、その形成を誘導したエピトープとは異なるエピトープに結合するならば、交差反応性である。交差反応性エピトープは一般に、誘導用エピ

トープと同じ相補的な構造的特徴の多くを含有しており、また、場合により、実際には元のエピトープよりも良好にはまる場合がある。

【０１５７】

例えば、ある種の抗体は、関連しているが、同一でないエピトープと結合するという点で、例えば、参照エピトープに対して（この技術分野で知られている方法及び本明細書中に記載される方法を使用して計算されるように）少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％及び少なくとも５０％の同一性を有するエピトープと結合するという点で、ある程度の交差反応性を有する。抗体は、参照エピトープに対して（この技術分野で知られている方法及び本明細書中に記載される方法を使用して計算されるように）９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満及び５０％未満の同一性を有するエピトープと結合しないならば、交差反応性をほとんど有していないか、又は全く有していないと言われる場合がある。抗体は、ある特定のエピトープのどのような他のアナログ、オルソログ又はホモログとも結合しないならば、そのエピトープについて「非常に特異的」であると見なされる場合がある。

【０１５８】

結合性分子、例えば、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体はまた、ＦＡＰ及び／又はそのフラグメントに対するそれらの結合親和性に関して記載又は指定される場合がある。好ましい結合親和性には、解離定数つまりＫｄが５×１０$^{-2}$Ｍ未満、１０$^{-2}$Ｍ未満、５×１０$^{-3}$Ｍ未満、１０$^{-3}$Ｍ未満、５×１０$^{-4}$Ｍ未満、１０$^{-4}$Ｍ未満、５×１０$^{-5}$Ｍ未満、１０$^{-5}$Ｍ未満、５×１０$^{-6}$Ｍ未満、１０$^{-6}$Ｍ未満、５×１０$^{-7}$Ｍ未満、１０$^{-7}$Ｍ未満、５×１０$^{-8}$Ｍ未満、１０$^{-8}$Ｍ未満、５×１０$^{-9}$Ｍ未満、１０$^{-9}$Ｍ未満、５×１０$^{-10}$Ｍ未満、１０$^{-10}$Ｍ未満、５×１０$^{-11}$Ｍ未満、１０$^{-11}$Ｍ未満、５×１０$^{-12}$Ｍ未満、１０$^{-12}$Ｍ未満、５×１０$^{-13}$Ｍ未満、１０$^{-13}$Ｍ未満、５×１０$^{-14}$Ｍ未満、１０$^{-14}$Ｍ未満、５×１０$^{-15}$Ｍ未満又は１０$^{-15}$Ｍ未満である結合親和性が含まれる。

【０１５９】

上記で示されたように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造及び三次元立体配置が広く知られている。本明細書中で使用される場合、用語「V_Hドメイン」には、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインが含まれ、用語「ＣＨ１ドメイン」には、免疫グロブリン重鎖の第１の（最もアミノ末端側の）定常領域ドメインが含まれる。ＣＨ１ドメインはV_Hドメインに隣接しており、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域のアミノ末端側である。

【０１６０】

本明細書中で使用される場合、用語「ＣＨ２ドメイン」には、従来の番号表記スキームを使用して、例えば、抗体のおよそ残基２４４から残基３６０にまで広がる重鎖分子の一部分が含まれる（残基２４４～残基３６０、Ｋａｂａｔ番号表記システム；残基２３１～残基３４０、ＥＵ番号表記システム；Ｋａｂａｔ　ＥＡ他（前掲書中）を参照のこと）。ＣＨ２ドメインは、別のドメインと密に対形成しないという点で独特である。むしろ、２つのＮ－連結している分岐した炭水化物鎖が、無傷の生来型ＩｇＧ分子の２つのＣＨ２ドメインの間に置かれる。ＣＨ３ドメインがＩｇＧ分子のＣＨ２ドメインからＣ末端にまで広がり、およそ１０８残基を含むこともまた広く記録されている。

【０１６１】

本明細書中で使用される場合、用語「ヒンジ領域」には、ＣＨ１ドメインをＣＨ２ドメインにつなぐ重鎖分子の一部分が含まれる。このヒンジ領域はおよそ２５残基を含み、かつ、柔軟であり、したがって、２つのＮ末端の抗原結合領域が独立して動くことを可能にする。ヒンジ領域は３つの異なったドメイン（上部、中央及び下部のヒンジドメイン）に細分化することができる（Ｒｏｕｘ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１（１９９８）、４０８３～４０９０を参照のこと）。

【０１６２】
本明細書中で使用される場合、用語「ジスルフィド結合」には、２つのイオウ原子の間に形成される共有結合性の結合が含まれる。アミノ酸のシステインは、ジスルフィド結合を形成することができるか、又は、第２のチオール基と架橋することができるチオール基を含む。ほとんどの天然に存在するＩｇＧ分子において、ＣＨ１領域及びＣＬ領域がジスルフィド結合によって連結され、２つの重鎖が、Ｋａｂａｔ番号表記システムを使用して２３９位及び２４２位（２２６位又は２２９位、ＥＵ番号表記システム）に対応する位置での２つのスルフィド結合によって連結される。
【０１６３】
本明細書中で使用される場合、用語「連結される」、「融合される」又は「融合」は交換可能に使用される。これらの用語は、化学的コンジュゲート化又は組換え手段を含むどのような手段によってでも、２つ以上の要素又は成分を一緒につなぐことを示す。「インフレーム融合」は、２つ以上のポリヌクレオチド・オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を、これらの元々のＯＲＦの正しい翻訳読み枠を維持する様式で、連続したより長いＯＲＦを形成するためにつなぐことを示す。したがって、組換え融合タンパク質は、元のＯＲＦによってコードされるポリペプチドに対応する２つ以上のセグメントを含有する単一タンパク質である（そのようなセグメントは通常、自然界ではそのようにつながれない）。したがって、読み枠が、融合されたセグメントの全体にわたって連続にされるにもかかわらず、これらのセグメントは、例えば、インフレームリンカー配列によって物理的又は空間的に隔てられる場合がある。例えば、免疫グロブリン可変領域のＣＤＲをコードするポリヌクレオチドが、インフレーム融合される場合があり、しかし、「融合された」ＣＤＲが、連続したポリペプチドの一部として共翻訳される限り、少なくとも１つの免疫グロブリンフレームワーク領域又はさらなるＣＤＲ領域をコードするポリヌクレオチドによって隔てられる場合がある。
【０１６４】
用語「発現」は、本明細書中で使用される場合、遺伝子が生化学物質（例えば、ＲＮＡ又はポリペプチド）をもたらすプロセスを示す。このプロセスには、限定されないが、遺伝子ノックダウンならびに一過性発現及び安定的発現の両方を含めて、細胞内における遺伝子の機能的な存在のどのような顕在化も含まれる。このプロセスには、限定されないが、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、小さいヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、小さい干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）又は何らかの他のＲＮＡ産物への遺伝子の転写、及び、ポリペプチドへのｍＲＮＡの翻訳が含まれる。最終的な所望される産物が生化学物質であるならば、発現には、そのような生化学物質及び何らかの前駆体を生じさせることが含まれる。遺伝子の発現により、「遺伝子産物」がもたらされる。本明細書中で使用される場合、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写によって産生されるメッセンジャーＲＮＡ、又は、転写物から翻訳されるポリペプチドのどちらもが可能である。本明細書中に記載される遺伝子産物にはさらに、転写後修飾（例えば、ポリアデニル化）を伴う核酸、又は、翻訳後修飾（例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、及び、タンパク質分解的切断など）を伴うポリペプチドが含まれる。
【０１６５】
本明細書中で使用される場合、用語「サンプル」は、対象または患者から得られるどのような生物学的材料をも示す。１つの局面において、サンプルは、血液、腹腔液、ＣＳＦ、唾液または尿を含むことができる。別の局面において、サンプルは、全血、血漿、血清、血液サンプルから富化されるＢ細胞、および、培養された細胞（例えば、対象からのＢ細胞）を含むことができる。サンプルにはまた、神経組織を含む生検サンプルまたは組織サンプルが含まれ得る。さらに他の局面において、サンプルは、細胞全体および／または細胞の溶解物を含むことができる。血液サンプルを、この技術分野において知られている様々な方法によって採取することができる。１つの局面において、ペレットを、２００μｌの緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ．７．５）、０．５％　Ｎｏｎｉｄｅｔ、１ｍＭ

ＥＤＴＡ、１ｍＭ　ＰＭＳＦ、０．１Ｍ　ＮａＣｌ、ＩＸ　Ｓｉｇｍａプロテアーゼ阻害剤、ならびに、ＩＸ　Ｓｉｇｍａホスファターゼ阻害剤１および２）において４℃でボルテックス撹拌することによって再懸濁することができる。懸濁物は、断続的なボルテックス撹拌を行いながら２０分間、氷上に保つことができる。１５，０００×ｇにおける５分間の約４℃での遠心分離を行った後、上清の小分け物を約－７０℃で貯蔵することができる。

【０１６６】

疾患：

別途言及される場合を除き、用語「障害」および用語「疾患」は本明細書中では交換可能に使用され、どのような生理学的変化であれ、対象、動物、単離された器官、組織または細胞／細胞培養物における望まれない生理学的変化を含む。ＦＡＰ関連の疾患および障害は、下記の疾患を含むが、それらに限定されない：

【０１６７】

・増殖性疾患、これには、転移性乳ガン、結腸直腸ガン、腎臓ガン、慢性リンパ性白血病、膵臓腺ガン、ガン腫、浸潤性小葉ガン、非小細胞肺ガン、骨髄腫および腫瘍間質が含まれる。

・組織再構成および／または慢性炎症を伴う疾患（これには、線維性疾患、創傷治癒、ケロイド形成、変形性関節症、関節リウマチ、および、軟骨分解を伴う関連障害、アテローム硬化性疾患およびクローン病が含まれるが、これらに限定されない）。

・内分泌学的障害を伴う疾患（これには、グルコース代謝の障害が含まれるが、これらに限定されない）、および、血液凝固障害を伴う疾患。

・心臓血管疾患、これには、心臓障害、ならびに、循環系の血管の障害、例えば、血管における脂質の異常に高い濃度によって引き起こされる循環系の血管の障害、アテローム性動脈硬化、アテローム斑、アテローム血栓症、心筋梗塞、心臓発作、慢性肝臓疾患、脳静脈血栓症、深部静脈血栓症および肺塞栓症が含まれる。

【０１６８】

処置：

本明細書中で使用される場合、用語「処置する」又は「処置」は治療的処置及び予防的又は防止的な対策の両方を示し、この場合、その目的が、望まれない生理学的変化又は障害（例えば、糖尿病の発症など）を防止すること又は抑制すること（緩和すること）である。有益な臨床結果又は所望される臨床結果には、検出可能であるか、又は検出不能であるかにかかわりなく、症状の緩和、疾患の程度の減弱、疾患の安定化された（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延又は緩速化、疾患状態の改善又は緩和、及び、寛解（部分的又は全体的を問わず）が含まれるが、これに限定されない。「処置」はまた、処置を受けない場合の予想された生存と比較して、生存を延ばすことを意味することができる。処置を必要としている人々には、状態又は障害を既に有する人々ならびに状態又は障害を有する傾向がある人々、あるいは、状態又は障害の発現が防止されなければならない人々が含まれる。

【０１６９】

別途言及される場合を除き、用語「薬物」、「医薬」又は「医薬品」は本明細書中では交換可能に使用され、下記のすべてを包含するものとするが、それに限定されない：（Ａ）体内使用又は体外使用のための物品、医薬及び調製物、ならびに、ヒト又は他の動物のどちらかの疾患の診断、治療、緩和、処置又は防止のために使用されることが意図されるあらゆる物質又は物質の混合物；ならびに、（Ｂ）ヒト又は他の動物の身体の構造又はどのような機能に対してでも影響を及ぼすことが意図される（食物以外）の物品、医薬及び調製物；ならびに（Ｃ）条項（Ａ）及び条項（Ｂ）において指定されるあらゆる物品の成分としての使用のために意図される物品。用語「薬物」、「医薬」又は「医薬品」は、１つ又は複数の「薬剤」、「化合物」、「物質」又は「（化学的）組成物」をフィラー、崩壊剤、滑剤、流動促進剤、バインダーとして、また、何らかの他の関連では、他の医薬的に不活性な賦形剤もまた、フィラー、崩壊剤、滑剤、流動促進剤、バインダーとして含有

するか、あるいは、「薬物」、「医薬」又は「医薬品」の容易な輸送、崩壊、解離、溶解及び生物学的利用性を、ヒト又は他の動物の体内の意図された標的場所（例えば、皮膚、胃内又は腸内）において保証する、ヒト又は他の動物のどちらかでの使用のために意図される調製物の完全な処方を包含するものとする。用語「薬剤」、「化合物」又は「物質」は本明細書中では交換可能に使用され、より具体的な関連では、すべての薬理学的に活性な薬剤、すなわち、本発明の方法によって所望の生物学的又は薬理学的な効果を誘発するか、あるいは、そのような可能な薬理学的効果を誘発することができることについて研究又は試験される薬剤を包含するものとするが、これらに限定されない。

【０１７０】

「対象」又は「個体」又は「動物」又は「患者」又は「哺乳動物」によって、診断、予後、防止又は治療が望まれるあらゆる対象、特に哺乳動物対象、例えば、ヒト患者が意味される。

【０１７１】

医薬用キャリア：

医薬的に許容されるキャリア及び投与経路を、当業者に知られている対応する文献から選ぶことができる。本発明の医薬組成物は、この技術分野において広く知られている方法に従って配合することができる（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ（２０００）（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＩＳＢＮ０－６８３－３０６４７２）；Ｖａｃｃｉｎｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ、第２版（Ｒｏｂｉｎｓｏｎ他、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ、米国、２００３）；Ｂａｎｇａ、Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ，Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ，ａｎｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ、第２版（Ｔａｙｌｏｒ ａｎｄ Ｆｒａｎｃｉｓ（２００６）、ＩＳＢＮ：０－８４９３－１６３０－８）を参照のこと）。好適な医薬用キャリアの例がこの技術分野では広く知られており、これらには、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルション（例えば、油／水エマルションなど）、様々なタイプの湿潤化剤、無菌溶液などが含まれる。そのようなキャリアを含む組成物を、広く知られている従来の方法によって配合することができる。これらの医薬組成物は好適な用量で対象に投与することができる。好適な組成物の投与を種々の方式によって行うことができる。例には、医薬的に許容されるキャリアを含有する組成物を、経口方法、鼻腔内方法、直腸方法、局所的方法、腹腔内方法、静脈内方法、筋肉内方法、皮下方法、真皮下方法、経皮的方法、クモ膜下腔内方法及び頭蓋内方法を介して投与することが含まれる。エアロゾル配合物、例えば、鼻腔噴霧配合物などには、保存剤及び等張剤を伴う活性な薬剤の精製された水性溶液又は他の溶液が含まれる。そのような配合物は好ましくは、鼻腔粘膜と適合し得るｐＨ及び等張性状態に調節される。経口投与用の医薬組成物、例えば、単一ドメイン抗体分子（例えば、「ナノボディー（商標）」）などもまた、本発明において想定される。そのような経口配合物は、錠剤、カプセル、粉末、液体又は半固体の形態である場合がある。錠剤は、固体のキャリア、例えば、ゼラチン又はアジュバントなどを含む場合がある。直腸投与又は膣投与のための配合物が、好適なキャリアを伴う坐薬として提示される場合がある（Ｏ’Ｈａｇａｎ他、Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ，Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ２（９）（２００３）、７２７～７３５もまた参照のこと）。様々なタイプの投与のために好適である配合物に関するさらなる指針を、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＰＡ、第１７版（１９８５）及び対応する更新版）において見出すことができる。薬物送達のための方法の簡単な総説については、Ｌａｎｇｅｒ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９（１９９０）、１５２７～１５３３を参照のこと。

【０１７２】

ＩＩ．本発明の抗体

本発明は一般には、ヒト由来抗ＦＡＰ抗体及び抗原結合フラグメント、並びに生物工学

的誘導体に関連し、この場合、これらは好ましくは、実施例において例示される抗体について概略されるような免疫学的結合特性及び／又は生物学的性質を明らかにする。本発明によれば、ＦＡＰについて特異的であるヒトモノクローナル抗体が、健康なヒト対象のプールからクローン化された。しかしながら、本発明の別の態様では、ヒト抗ＦＡＰモノクローナル抗体はＦＡＰに伴う、ＦＡＰ関連疾患及び／又は障害の症状を示す患者からもクローン化され得る。

【０１７３】

本発明に従って行われた実験の過程において、培養ヒトメモリーＢ細胞の馴化培地に存在する抗体が、ＦＡＰに対する、また、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含む、１０以上の他のタンパク質に対するそれらの結合能について評価された。このスクリーニングにおいてＦＡＰタンパク質に結合することができ、しかし、他のタンパク質のどれにも結合することができないＢ細胞上清のみが、抗体クラス及び軽鎖サブクラスの決定を含めて、さらなる分析のために選択された。選択されたＢ細胞はその後、抗体クローニングのために処理された。

【０１７４】

簡単に記載すると、このことは、選択されたＢ細胞からのメッセンジャーＲＮＡの抽出、ＲＴ－ＰＣＲによる逆転写、ＰＣＲによる抗体コード領域の増幅、プラスミドベクターへのクローニングおよび配列決定にあった。選択されたヒト抗体がその後、ＨＥＫ－２９３細胞またはＣＨＯ細胞における組換え発現および精製によって産生され、続いて、ヒトＦＡＰタンパク質と結合するそれらの能力について特徴づけられた。様々な試験の組合せにより、例えば、ＨＥＫ２９３細胞またはＣＨＯ細胞における抗体の組換え発現、そして、ヒトＦＡＰタンパク質に対するそれらの結合特異性の引き続いた特徴づけ、および、ＦＡＰホモログに対するのではなく、ＦＡＰに対するそれらの弁別的な結合により、ＦＡＰについて非常に特異的であり、かつ、ＦＡＰタンパク質を弁別的に認識し、これと選択的に結合するヒト抗体が今回初めてクローン化されたことが確認された。場合により、様々なマウスキメラ抗体が、本発明のヒト抗体の可変ドメインに基づいて作製される。実施例９に記載され、また、図１０および図１１に示されるように、このようなマウスキメラ抗体は、ＦＡＰ陽性のヒト乳ガン組織切片が、マウス定常ドメインと、元の抗体のヒト可変ドメインとを有するＮＩ－２０６．８２Ｃ２の組換え操作されたキメラ形態により特異的に染色されたという点で、ヒトＦＡＰに対する、ヒト抗体と等しい結合親和性、特異性および選択性を有する。

【０１７５】

したがって、本発明は概して、組換えヒト由来抗ＦＡＰモノクローナル抗体ならびにその生物工学誘導体および合成誘導体に関連する。本発明の１つの実施形態において、抗体はヒトおよびマウスのＦＡＰと結合することができる；実施例７および図８を参照のこと。

【０１７６】

１つの実施形態において、本発明は、抗ＦＡＰ抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体または誘導体に関しており、この場合、前記抗体は、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６からなる群から選択される参照抗体と同じＦＡＰのエピトープに特異的に結合する；例えば、それぞれのエピトープについて実施例３および図４を参照のこと。実施例３において説明されるように、ＦＡＰの配列全体が、１１アミノ酸の重なりが個々のペプチドの間にある合計で１８８個の線状の１５－ｍｅｒペプチドとして合成された。したがって、実施例において例示される本発明の主題抗体は、Ｎ末端および／またはＣ末端のさらなるアミノ酸のみとの関係で、言及されたエピトープのいずれかを認識する抗体とは異なる。したがって、本発明の好ましい実施形態において、抗ＦＡＰ抗体のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６について特定されるエピトープのいずれか１つのアミノ酸配列を含むＦＡＰエピトー

プに対する抗ＦＡＰ抗体の特異的な結合が、実施例３および図４に従って、１５アミノ酸の長さおよび１１アミノ酸の重なりを有する連続するペプチドにより明らかにされる。したがって、本発明は概して、図１Ａ～図１Ｆのいずれか１つに示されるようなＣＤＲならびに／あるいは可変重鎖領域および可変軽鎖領域を有する実施例で例示される抗体と同じエピトープに結合するどのような抗ＦＡＰ抗体および抗体様分子にも関連する。

【０１７７】

１つの実施形態において、本発明の抗体は、実施例に記載されるような例示的抗体のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６の結合性質を示す。

【０１７８】

用語「実質的に認識しない」は、抗体、そのフラグメント、あるいは、特定の標的分子、特定の抗原、ならびに／または、前記標的分子および／もしくは抗原の特定の立体配座についての結合性分子を含む一群の分子の結合親和性を記述するために本出願において使用されるときには、前述の群の分子が、別の分子、抗原および／または立体配座と結合することについての前述の群の分子の結合親和性の２分の１未満である、３分の１未満である、４分の１未満である、５分の１未満である、６分の１未満である、７分の１未満である、８分の１未満である、または９分の１未満である結合親和性により、前記の分子、抗原および／または立体配座と結合することを意味する。非常に多くの場合、解離定数（ＫＤ）が、結合親和性の尺度として使用される。ときには、結合親和性の尺度として使用されるのが、例えば、ＥＬＩＳＡアッセイのような特異的アッセイでのＥＣ５０である。好ましくは、用語「実質的に認識しない」は、本出願において使用されるときには、前述の群の分子が、別の分子、抗原および／または立体配座に対する結合についての前述の群の前記分子の結合親和性の１０分の１未満である、２０分の１未満である、５０分の１未満である、１００分の１未満である、１０００分の１未満である、または１００００分の１未満である結合親和性により、前記の分子、抗原および／または立体配座と結合することを意味する。この関連で、結合親和性が、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６の各抗体について図２で示されるような範囲である場合があり、すなわち、これらの抗体は、ヒトＦＡＰについて、すなわち、図２に示されるような捕捉されたＦＡＰ（ｓＦＡＰ）、直接に被覆されたＦＡＰ（ＦＡＰ）および／または直接に被覆されたＦＡＰペプチド混合物（ｃＦＡＰ）について、最大半量有効濃度（ＥＣ５０）が約１ｐＭ～５００ｎＭであり、好ましくはＥＣ５０が約５０ｐＭ～１００ｎＭであり、最も好ましくはＥＣ５０が約１ｎＭ～２０ｎＭ、または１ｎＭ未満でさえある。

【０１７９】

いくつかの抗体は広範囲の数々の生体分子（例えば、タンパク質）に結合することができる。当業者は理解するであろうように、特異的（な）の用語は、ＦＡＰタンパク質またはそのフラグメントでない他の生体分子が抗原結合性分子（例えば、本発明の抗体の１つ）に有意に結合しないことを示すために本明細書中では使用される。好ましくは、ＦＡＰ以外の生体分子に対する結合のレベルにより、ＦＡＰに対する親和性の最大でもほんの２０％以下、１０％以下、ほんの５％以下、ほんの２％以下、または、ほんの１％以下（すなわち、５分の１未満、１０分の１未満、２０分の１未満、５０分の１未満または１００分の１未満、あるいは、それよりも小さいどのような程度でも）である結合親和性がそれぞれもたらされる；例えば、図７を参照のこと。本発明はまた、抗体、あるいは、その抗原結合フラグメント、変異体または生物工学誘導体もしくは合成誘導体に関しており、この場合、前記抗体は、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６からなる群から選択される抗体の抗原結合ドメインと同一の抗原結合ドメインを含む。

【０１８０】

本発明ではさらに、その可変領域において、例えば、結合ドメインにおいて、図１Ａ～図１Ｆに示されるアミノ酸配列のいずれか１つを含むV_H可変領域および／またはV_L可変領域の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むことによって特徴づけられることがあるいくつかの結合性分子、例えば、抗体およびその結合フラグメントが例示される。上記の可変領域をコードする対応するヌクレオチド配列が下記の表ＩＩに示される。V_H領域および／またはV_L領域の上記アミノ酸配列のＣＤＲの例示的なセットが図１Ａ～図１Ｆに示される。しかしながら、下記で議論されるように、当業者は、加えて、または代替において、様々なＣＤＲが使用されることがあり、この場合、これらのＣＤＲは、それらのアミノ酸配列が、図１Ａ～図１Ｆに示されるアミノ酸配列から、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３の場合には１つ、２つ、３つ、または、それどころか、それ以上のアミノ酸によって異なるという事実を十分に承知している。したがって、１つの実施形態において、図１Ａ～図１Ｆに示されるような少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）、ならびに／あるいは、１つまたは複数のアミノ酸置換を含むその１つまたは複数のＣＤＲをその可変領域に含む本発明の抗体またはそのＦＡＰ結合フラグメントが提供される。

【０１８１】

１つの実施形態において、本発明の抗体は、図１Ａ～図１Ｆに示されるようなV_H領域および／またはV_L領域、あるいは、１つまたは複数のアミノ酸置換を含むそのV_H領域および／またはV_L領域のアミノ酸配列を含む抗体のいずれか１つである。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトＢ細胞に存在していたような重鎖および軽鎖の同族性の対形成の保存によって特徴づけられる。

【０１８２】

本発明のさらなる実施形態において、抗ＦＡＰ抗体、そのＦＡＰ結合フラグメント、合成変異体または生物工学変異体は、標的に対する適切な結合親和性と、適切な薬物動態学的特性とを有するように最適化することができる。したがって、グリコシル化、酸化、脱アミノ化、ペプチド結合切断、イソアスパラギン酸形成および／または不対システインからなる群から選択される修飾を受けやすいＣＤＲ領域内または可変領域内の少なくとも１つのアミノ酸が、そのような変化を欠く変異アミノ酸によって置換され、あるいは、少なくとも１つの炭水化物成分が化学的または酵素的に除かれ、または抗体に付加される。アミノ酸最適化のための様々な例を、例えば、国際特許出願公開ＷＯ２０１０／１２１１４０および同ＷＯ２０１２／０４９５７０において見出すことができる。抗体の性質を最適化するさらなる修飾が、Ｇａｖｅｌ他、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ３（１９９０）、４３３～４４２、および、Ｈｅｌｅｎｉｕｓ他、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７３（２００４）、１０１９～１０４９に記載される。

【０１８３】

代替において、本発明の抗体は、ＦＡＰに対する結合について、図１Ａ～図１Ｆのいずれか１つに示されるようなV_H領域および／またはV_L領域を有する抗体の少なくとも１つと競合する抗体あるいはその抗原結合フラグメント、誘導体または変異体である。

【０１８４】

本発明の抗体は、特に治療適用のためには、ヒトのものである場合がある。代替において、本発明の抗体は、動物における診断方法および研究のために特に有用である齧歯類抗体、齧歯類化抗体または齧歯類－ヒトのキメラ抗体、好ましくは、マウス抗体、マウス化抗体またはマウス－ヒトのキメラ抗体、あるいは、ラット抗体、ラット化抗体またはラット－ヒトのキメラ抗体である。１つの実施形態において、本発明の抗体は齧歯類－ヒトのキメラ抗体または齧歯類化抗体である。

【０１８５】

上記で述べられるように、ヒト免疫応答時におけるその生成のために、本発明のヒトモノクローナル抗体は、特定の病理学的関連性を有するエピトープで、かつ、例えば、マウスモノクローナル抗体の作製のための免疫化プロセス、および、ファージディスプレーライブラリーのインビトロスクリーニングの場合には接近可能でないかもしれないエピトープ、またはそれほど免疫原性でないかもしれないエピトープをそれぞれ認識するであろう

。したがって、本発明のヒト抗ＦＡＰ抗体のエピトープは独特であること、そして、本発明のヒトモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに結合することができる他の抗体が存在しないことを明記することは賢明である。本発明の抗体が独特であることについてのさらなる指摘は、実施例において示されるように、抗体作製のための通常のプロセス（例えば、免疫化またはインビトロライブラリースクリーニング）などによって得ることができないかもしれない選択的かつ強力なＦＡＰ阻害性の抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２が初めてもたらされているという事実である。

【０１８６】

したがって、１つの実施形態において、本発明はまた、概して、ＦＡＰに対する特異的な結合について本発明のヒトモノクローナル抗体と競合する抗ＦＡＰ抗体およびＦＡＰ結合性分子にまで及ぶ。本発明はより具体的には、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体または誘導体に関しており、前記抗体は、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６からなる群から選択される参照抗体と同じＦＡＰのエピトープに特異的に結合する。

【０１８７】

抗体間の競合が、試験下にある免疫グロブリンが共通の抗原（ＦＡＰなど）に対する参照抗体の特異的な結合を阻害するアッセイによって求められる。数多くのタイプの競合的結合アッセイが知られている：例えば、固相での直接的又は間接的な放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、固相での直接的又は間接的な酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）、サンドイッチ競合アッセイ（Ｓｔａｈｌｉ他、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ９（１９８３）、２４２～２５３を参照のこと）、固相での直接的なビオチン－アビジンＥＩＡ（Ｋｉｒｋｌａｎｄ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７（１９８６）、３６１４～３６１９、及び、Ｃｈｅｕｎｇ他、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７６（１９９０）、５４６～５５２を参照のこと）、固相での直接的な標識化アッセイ、固相での直接的な標識化サンドイッチアッセイ（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ（１９８８）を参照のこと）、I^{125}標識を使用する固相での直接的な標識ＲＩＡ（Ｍｏｒｅｌ他、Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２５（１９８８）、７～１５、及び、Ｍｏｌｄｅｎｈａｕｅｒ他、Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３２（１９９０）、７７～８２を参照のこと）。典型的には、そのようなアッセイは、精製されたＦＡＰ又はそのエピトープ含有抗原と、標識されていない試験用免疫グロブリン及び標識された参照用免疫グロブリン（すなわち、本発明のヒトモノクローナル抗体）とを使用することを伴う。競合的阻害が、試験用免疫グロブリンの存在下において固体表面又は細胞に結合する標識の量を求めることによって測定される。通常、試験用免疫グロブリンは過剰に存在する。好ましくは、競合的結合アッセイが、添付された実施例においてＥＬＩＳＡアッセイについて記載されるような条件のもとで行われる。競合アッセイによって特定される抗体（競合抗体）には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、及び、立体的障害が生じるために、参照抗体が結合するエピトープに十分に近い隣接エピトープに結合する抗体が含まれる。通常の場合、競合抗体が過剰に存在するときには、競合抗体により、共通の抗原に対する参照抗体の特異的な結合が少なくとも５０％又は７５％阻害されるであろう。したがって、本発明はさらに、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体に関しており、この場合、当該抗体は、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２，ＮＩ－２０６．５９Ｂ４，ＮＩ－２０６．２２Ｆ７，ＮＩ－２０６．２７Ｅ８，ＮＩ－２０６．１２Ｇ４及びＮＩ－２０６．１７Ａ６からなる群から選択される参照抗体がＦＡＰ又はそのフラグメントに結合することを競合的に阻害する。

【０１８８】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）を含む単離されたポリペプチド、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）から本質的になる単離されたポリペプチド、又は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）からなる単離されたポリペプチ

ドであって、重鎖可変領域のＶ$_H$－ＣＤＲの少なくとも１つ、又は、重鎖可変領域のＶ$_H$－ＣＤＲの少なくとも２つが、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用重鎖のＶ$_H$－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はＶ$_H$－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である、そのような単離されたポリペプチドを提供する。代替において、Ｖ$_H$のＶ$_H$－ＣＤＲ１領域、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２領域及びＶ$_H$－ＣＤＲ３領域は、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用重鎖のＶ$_H$－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はＶ$_H$－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である。したがって、この実施形態によれば、本発明の重鎖可変領域は、図１Ａ－１Ｆのいずれか１つにそれぞれ示される群に関連づけられるＶ$_H$－ＣＤＲ１ポリペプチド配列、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２ポリペプチド配列及びＶ$_H$－ＣＤＲ３ポリペプチド配列を有する。図１Ａ－１Ｆは、Ｋａｂａｔシステムによって定義されるＶ$_H$－ＣＤＲを示すが、他のＣＤＲ定義、例えば、Ｃｈｏｔｈｉａシステムによって定義されるＶ$_H$－ＣＤＲもまた本発明に含まれ、これらは、図１Ａ－１Ｆに示されるデータを使用して当業者によって容易に特定され得る。

【０１８９】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（Ｖ$_H$）を含む単離されたポリペプチド、免疫グロブリン重鎖可変領域（Ｖ$_H$）から本質的になる単離されたポリペプチド、又は、免疫グロブリン重鎖可変領域（Ｖ$_H$）からなる単離されたポリペプチドであって、Ｖ$_H$－ＣＤＲ１領域、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２領域及びＶ$_H$－ＣＤＲ３領域が、図１Ａ－１Ｆのいずれか１つにそれぞれ示されるＶ$_H$－ＣＤＲ１群、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２群及びＶ$_H$－ＣＤＲ３群と同一であるポリペプチド配列を有する、そのような単離されたポリペプチドを提供する。

【０１９０】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（Ｖ$_H$）を含む単離されたポリペプチド、免疫グロブリン重鎖可変領域（Ｖ$_H$）から本質的になる単離されたポリペプチド、又は、免疫グロブリン重鎖可変領域（Ｖ$_H$）からなる単離されたポリペプチドであって、Ｖ$_H$－ＣＤＲ１領域、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２領域及びＶ$_H$－ＣＤＲ３領域が、いずれか１つのＶ$_H$－ＣＤＲにおける１つ、２つ、３つ、４つ、５つ又は６つのアミノ酸置換を除いて、図１Ａ－１Ｆのいずれか１つにそれぞれ示されるＶ$_H$－ＣＤＲ１群、Ｖ$_H$－ＣＤＲ２群及びＶ$_H$－ＣＤＲ３群と同一であるポリペプチド配列を有する、そのような単離されたポリペプチドを提供する。特定の実施形態において、アミノ酸置換は保存的である。

【０１９１】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン軽鎖可変領域（Ｖ$_L$）を含む単離されたポリペプチド、免疫グロブリン軽鎖可変領域（Ｖ$_L$）から本質的になる単離されたポリペプチド、又は、免疫グロブリン軽鎖可変領域（Ｖ$_L$）からなる単離されたポリペプチドであって、軽鎖可変領域のＶ$_L$－ＣＤＲの少なくとも１つ、又は、軽鎖可変領域のＶ$_L$－ＣＤＲの少なくとも２つが、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用軽鎖のＶ$_L$－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、Ｖ$_L$－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はＶ$_L$－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である、そのような単離されたポリペプチドを提供する。代替において、Ｖ$_L$のＶ$_L$－ＣＤＲ１領域、Ｖ$_L$－ＣＤＲ２領域及びＶ$_L$－ＣＤＲ３領域は、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用軽鎖のＶ$_L$－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、Ｖ$_L$－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はＶ$_L$－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である。したがって、この実施形態によれば、本発明の軽鎖可変領域は、図１Ａ－１Ｆのいずれか１つにそれぞれ示されるポリペプチドに関連づけられるＶ$_L$－ＣＤＲ１ポリペプチド配列、Ｖ$_L$－ＣＤＲ２ポリペプチド配列及びＶ$_L$－ＣＤＲ３ポリペプチド配列を有する。図１Ａ－１Ｆは、Ｋａｂａｔシステムによって定義されるＶ$_L$－ＣＤＲを示すが、他のＣＤＲ定義、例えば、Ｃｈｏｔｈｉａシステムによって定義されるＶ$_L$－ＣＤＲもまた本発明に含まれる。別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン軽鎖可変領域（Ｖ$_L$）を含

む単離されたポリペプチド、免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）から本質的になる単離されたポリペプチド、又は、免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）からなる単離されたポリペプチドであって、V_L－ＣＤＲ１領域、V_L－ＣＤＲ２領域及びV_L－ＣＤＲ３領域が、図１Ａ－１Ｆにそれぞれ示されるV_L－ＣＤＲ１群、V_L－ＣＤＲ２群及びV_L－ＣＤＲ３群と同一であるポリペプチド配列を有する、そのような単離されたポリペプチドを提供する。

【０１９２】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_L）を含む単離されたポリペプチド、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_L）から本質的になる単離されたポリペプチド、又は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_L）からなる単離されたポリペプチドであって、V_L－ＣＤＲ１領域、V_L－ＣＤＲ２領域及びV_L－ＣＤＲ３領域が、いずれか１つのV_L－ＣＤＲにおける１つ、２つ、３つ、４つ、５つ又は６つのアミノ酸置換を除いて、図１Ａ－１Ｆにそれぞれ示されるV_L－ＣＤＲ１群、V_L－ＣＤＲ２群及びV_L－ＣＤＲ３群と同一であるポリペプチド配列を有する、単離されたポリペプチドを提供する。特定の実施形態において、アミノ酸置換は保存的である。

【０１９３】

免疫グロブリン又はそのコードｃＤＮＡがさらに改変される場合がある。したがって、さらなる実施形態において、本発明の方法は、キメラ抗体、マウス化抗体、単鎖抗体、Ｆａｂフラグメント、二重特異性抗体、融合抗体、標識化抗体、又は、それらのいずれか１つのアナログを製造する工程のいずれか１つを含む。対応する様々な方法が当業者には知られており、例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」、ＣＳＨ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ（１９８８）に記載される。前記抗体の誘導体がファージディスプレー技術によって得られるとき、ＢＩＡｃｏｒｅシステムにおいて用いられるような表面プラズモン共鳴を、本明細書中に記載される抗体のいずれか１つのエピトープと同じエピトープに結合するファージ抗体の効率を増大させるために使用することができる（Ｓｃｈｉｅｒ、Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ７（１９９６）、９７～１０５；Ｍａｌｍｂｏｒｇ、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８３（１９９５）、７～１３）。キメラ抗体の製造が、例えば、国際特許出願公開ＷＯ８９／０９６２２に記載される。ヒト化抗体を製造するための方法が、例えば、欧州特許出願ＥＰ－Ａ１０２３９４００及び国際特許出願公開ＷＯ９０／０７８６１に記載される。本発明に従って利用されるための抗体のさらなる供給源は、いわゆる異種抗体である。異種抗体（例えば、ヒト様抗体）をマウスにおいて製造するための一般的原理が、例えば、国際特許出願公開ＷＯ９１／１０７４１、ＷＯ９４／０２６０２、ＷＯ９６／３４０９６及びＷＯ９６／３３７３５に記載される。上記で議論されたように、本発明の抗体は、例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ及びＦ（ａｂ）$_2$を含めて、完全な抗体のほかに様々な形態で、ならびに、単鎖で存在する場合がある（例えば、国際特許出願公開ＷＯ８８／０９３４４を参照のこと）。したがって、１つの実施形態において、単鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント及びＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントからなる群から選択される本発明の抗体が提供される。

【０１９４】

本発明の様々な抗体又はそれらの対応する免疫グロブリン鎖はさらに、この技術分野において知られている従来からの技術を使用して、例えば、この技術分野において知られているアミノ酸欠失、アミノ酸挿入、アミノ酸置換、アミノ酸付加及び／又は組換えならびに／あるいはいずれかの他の改変を単独又は組合せでのどちらかで使用することによって改変することができる。そのような改変を免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の根底にあるＤＮＡ配列に導入するための方法が、当業者には広く知られている；例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８９）、Ｎ．

Ｙ．、及び、Ａｕｓｕｂｅｌ、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ、Ｎ．Ｙ．（１９９４）を参照のこと。本発明の抗体の修飾には、アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化、及び、炭水化物成分又は脂質成分及び補因子などの連結を含む側鎖修飾、骨格修飾、ならびに、Ｎ末端修飾及びＣ末端修飾を含めて、１つ又は複数の構成アミノ酸における化学的及び／又は酵素的な誘導体化が含まれる。同様に、本発明は、記載された抗体又はその何らかのフラグメントを異種分子（例えば、カルボキシル末端での免疫刺激リガンドなど）に融合されてアミノ末端において含むキメラなタンパク質の製造を包含する；対応する技術的詳細については、例えば、国際特許出願公開ＷＯ００／３０６８０を参照のこと。

【０１９５】

加えて、重鎖ＣＤＲ３（ＨＣＤＲ３）は、より大きい度合いの可変性と、抗原－抗体相互作用における支配的な関与とを有する領域であることがしばしば認められているので、本発明は、上記で記載されるような結合性分子を含有するペプチド、例えば、述べられた抗体のいずれか１つの可変領域のＣＤＲ３領域（特に、重鎖のＣＤＲ３）を含有するペプチドを含むペプチドを包含する。そのようなペプチドが、本発明に従って有用である結合剤を製造するために容易に合成される場合があり、又は、組換え手段によって製造される場合がある。そのような方法は当業者にはよく知られている。ペプチドを、例えば、市販されている自動化されたペプチド合成機を使用して合成することができる。ペプチドはまた、ペプチドを発現するＤＮＡを発現ベクターに組み込むこと、及び、細胞を、ペプチドを産生させるために発現ベクターにより形質転換することによる組換え技術によって製造することができる。

【０１９６】

したがって、本発明は、どのようなＦＡＰ結合性分子にも関連し、例えば、抗ＦＡＰ抗体、ならびに／あるいは、ＦＡＰおよび／またはそのフラグメントと結合することができる抗体に向けられ、かつ、例示的な組換えヒト型のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６についての述べられた性質を示す抗体またはその結合フラグメントに関連する。そのような抗体および結合性分子は、本明細書中に記載されるようなＥＬＩＳＡおよび免疫組織化学によってそれらの結合特異性および結合親和性について試験することができる；例えば、実施例を参照のこと。抗体および結合性分子のこれらの特性はウエスタンブロットによって同様に試験することができる。

【０１９７】

免疫グロブリンをＢ細胞又はメモリーＢ細胞の培養から直接に得ることの代替として、これらの細胞を、その後の発現及び／又は遺伝子操作のための、再編成された重鎖遺伝子座及び軽鎖遺伝子座の供給源として使用することができる。再編成された抗体遺伝子を、ｃＤＮＡを作製するために、適切なｍＲＮＡから逆転写することができる。所望されるならば、重鎖定常領域を異なるアイソタイプの重鎖定常領域に交換することができ、又は、完全に除くことができる。可変領域を、単鎖のＦｖ領域をコードするために連結することができる。多数のＦｖ領域を、２つ以上の標的に対する結合能を与えるために連結することができ、又は、重鎖及び軽鎖のキメラな組合せを用いることができる。遺伝物質が入手可能であると、所望の標的と結合するそれらの能力をともに保持する上記で記載されるようなアナログの設計は簡単である。抗体可変領域のクローニング及び組換え抗体の作製のための方法が当業者には知られており、例えば、Ｇｉｌｌｉｌａｎｄ他、Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ ４７（１９９６）、１～２０；Ｄｏｅｎｅｃｋｅ他、Ｌｅｕｋｅｍｉａ １１（１９９７）、１７８７～１７９２に記載される。

【０１９８】

適切な遺伝物質が得られ、かつ、所望されるならば、アナログをコードするために改変されると、コード配列（これは、最低でも重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする配列を含む）を、標準的な組換え宿主細胞にトランスフェクションされ得るベクターにおいて含有

される発現系に挿入することができる。様々なそのような宿主細胞が使用してよい；しかしながら、効率的なプロセシングのためには、哺乳動物細胞が好ましい。この目的のために有用である典型的な哺乳動物細胞株には、ＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞又はＮＳＯ細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【０１９９】

抗体又はアナログの製造はその後、改変された組換え宿主を、宿主細胞の成長及びコード配列の発現のために適切である培養条件のもとで培養することによって着手される。その後、抗体が、抗体を培養物から単離することによって回収される。発現系は好ましくは、シグナルペプチドを含み、その結果、生じた抗体が培地中に分泌されるように設計される。しかしながら、細胞内産生もまた可能である。

【０２００】

上記によれば、本発明はまた、本発明の抗体又は同等な結合性分子をコードするポリヌクレオチドに関連し、抗体の場合には、好ましくは、上で記載される抗体の免疫グロブリン鎖の可変ドメインを少なくともコードするポリヌクレオチドに関連する。典型的には、ポリヌクレオチドによってコードされる前記可変領域は、前記抗体の可変領域のV_H及び／又はV_Lの少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。

【０２０１】

当業者は、上記の可変ドメインを有する抗体の可変ドメインが、所望される特異性及び生物学的機能の他のポリペプチド又は抗体を構築するために使用され得ることを容易に理解するであろう。したがって、本発明はまた、上で記載された可変ドメインの少なくとも１つのＣＤＲを含み、かつ、添付された実施例において記載される抗体と実質的に同じ又は類似する結合性質を好都合には有するポリペプチド及び抗体を包含する。当業者は、結合親和性が、アミノ酸置換をＣＤＲ内において、又は、Ｋａｂａｔによって定義されるようなＣＤＲと部分的に重なる超可変ループ（Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６（１９８７）、９０１～９１７）の内部において行うことによって強化され得ることを理解している（例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ他、Ｎａｔｕｒｅ　３３２（１９８８）、３２３～３２７を参照のこと）。したがって、本発明はまた、述べられたＣＤＲの１つ又は複数が１つ又は複数の、好ましくは２つ以下のアミノ酸置換を含む抗体に関連する。好ましくは、本発明の抗体は、その免疫グロブリン鎖の一方又は両方において、図１Ａ－１Ｆのいずれか１つに示されるような可変領域の２つのＣＤＲ又は３つすべてのＣＤＲを含む。

【０２０２】

結合性分子、例えば、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、当業者によって知られているように、１つ又は複数のエフェクター機能を媒介する定常領域を含むことができる。例えば、補体のＣ１成分が抗体の定常領域に結合することにより、補体系が活性化される場合がある。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン化及び溶解において重要である。補体の活性化は炎症応答をも刺激し、自己免疫の過敏性に関与することもある。さらに、抗体は、Ｆｃ領域を介して、すなわち、抗体のＦｃ領域におけるＦｃ受容体結合部位が細胞上のＦｃ受容体（ＦｃＲ）に結合することにより様々な細胞における受容体に結合する。ＩｇＧ（ガンマ受容体）、ＩｇＥ（イプシロン受容体）、ＩｇＡ（アルファ受容体）及びＩｇＭ（ミュー受容体）を含めて、異なるクラスの抗体について特異的であるいくつかのＦｃ受容体が存在する。抗体が細胞表面のＦｃ受容体に結合することにより、抗体被覆粒子の貪食及び破壊、免疫複合体の排除、キラー細胞による抗体被覆された標的細胞の溶解（これは抗体依存性細胞媒介性細胞傷害又はＡＤＣＣと呼ばれる）、炎症性媒介因子の放出、胎盤移行及び免疫グロブリン産生の制御を含む多数の重要かつ多様な生物学的応答が誘発される。

【０２０３】

したがって、本発明の特定の実施形態には、少なくとも定常領域ドメインの１つ又は複数の一部が欠失されているか、さもなければ変化させられており、その結果、所望される生化学的特性を提供するように、例えば、およそ同じ免疫原性の完全な未変化抗体と比較

したとき、低下したエフェクター機能、ダイマーを非共有結合により形成することができること、細胞表面におけるＦＡＰ発現部位に局在化する増大した能力、低下した血清中半減期、あるいは、増大した血清中半減期などを提供するようにされている抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体が含まれる。例えば、本明細書中に記載される診断方法及び処置方法において使用されるためのある種の抗体は、免疫グロブリン重鎖に類似するポリペプチド鎖を含むが、１つ又は複数の重鎖ドメインの少なくとも一部を欠くドメイン欠失抗体である。例えば、ある種の抗体では、改変された抗体の定常領域の１つのドメイン全体が欠失されるであろう。例えば、ＣＨ２ドメインのすべて又は一部が欠失されるであろう。他の実施形態において、本明細書中に記載される診断方法及び処置方法において使用されるためのある種の抗体は、グリコシル化を排除するために変化させられる定常領域（例えば、ＩｇＧ重鎖定常領域）を有しており、これは、本明細書中の他のところでは、非グルコシル化抗体又は「ａｇｌｙ」抗体として示される。そのような「ａｇｌｙ」抗体は、酵素学的に、ならびに、定常領域におけるコンセンサスなグリコシル化部位を操作することによって調製されてもよい。理論によって拘束されることはないが、「ａｇｌｙ」抗体は生体内での安全性及び安定性の改善されたｐｒｏフィルを有する場合があると考えられる。所望されるエフェクター機能を有する非グリコシル化抗体を製造する方法が、例えば、国際特許出願公開ＷＯ２００５／０１８５７２に見出される（その全体が参照によって組み込まれる）。

【０２０４】

本明細書中に記載されるある種の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体において、Ｆｃ部分が、この技術分野において知られている技術を使用して、エフェクター機能を低下させるために変異させられる場合がある。例えば、定常領域ドメインの（点変異又は他の手段による）欠失又は不活性化は、循環する改変された抗体のＦｃ受容体結合を低下させ、それにより、ＦＡＰの局在化を増大させる場合がある。他の場合には、本発明と一致する定常領域改変が補体結合を和らげ、したがって、抱合された細胞毒素の血清半減期及び非特異的会合を低下させることがあるかもしれない。定常領域のさらに他の改変が、増大した抗原特異性又は抗体柔軟性に起因する高まった局在化を可能にするジスルフィド連結又はオリゴ糖成分を改変するために使用される場合がある。そのような改変の得られた生理学的プロファイル、生物学的利用能及び他の生化学的影響、例えば、ＦＡＰの局在化、生体分布及び血清半減期などが、過度な実験を行うことなく、広く知られている免疫学的技術を使用して容易に測定及び定量化され得る。

【０２０５】

本明細書中に記載されるある種の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体において、Ｆｃ部分が、例として、Ｆｃγ受容体、ＬＲＰ又はＴｈｙ１受容体を介する抗体の受容体媒介性エンドサイトーシスを高めることによって、あるいは、「ＳｕｐｅｒＡｎｔｉｂｏｄｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」（これは、抗体が、生細胞を傷つけることなく生細胞内に往復させられることを可能にすると言われる）（Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．（２００５）、２３７～２４１）によって抗体の細胞取り込みを増大させるために変異させられる場合があり、又は、代わりのタンパク質配列に交換される場合がある。例えば、抗体結合領域と、細胞表面受容体の同族タンパク質リガンドとの融合タンパク質、あるいは、ＦＡＰならびに細胞表面受容体に結合する特異的な配列を有する二重特異性抗体又は多特異性抗体の作製が、この技術分野において知られている技術を使用して設計される場合がある。

【０２０６】

本明細書中に記載されるある種の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体において、Ｆｃ部分が、その血液脳関門透過を増大させるために変異させられる場合があり、又は、代わりのタンパク質配列に交換される場合があり、あるいは、抗体が化学的に改変される場合がある。

【０２０７】

本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体の改変された形態

を、この技術分野において知られている技術を使用して完全な前駆体又は親抗体から作製することができる。例示的な技術が本明細書中により詳しく議論される。本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、この技術分野において知られている技術を使用して作製又は製造することができる。特定の実施形態において、抗体分子又はそのフラグメントが「組換え製造され」、すなわち、組換えＤＮＡ技術を使用して製造される。抗体分子又はそのフラグメントを作製するための例示的な技術が本明細書中の他のところでより詳しく議論される。

【０２０８】

本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体にはまた、例えば、共有結合による結合により、抗体がその同族エピトープに特異的に結合することが妨げられないように、どのようなタイプの分子でも抗体に共有結合により結合させることによって改変される誘導体が含まれる。例えば、しかし、限定としてではなく、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、知られている保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などによって改変されている抗体が含まれる。数多くの化学的修飾のどれもが、知られている技術によって行われる場合があり、これらには、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などが含まれるが、これらに限定されない。加えて、誘導体は１つ又は複数の非古典的アミノ酸を含有する場合がある。

【０２０９】

特に好ましい実施形態において、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、有害な免疫応答を処置されるべき動物において、例えば、ヒトにおいて誘発しないであろう。特定の実施形態において、結合性分子、例えば、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントは患者、例えば、ヒト患者に由来し、続いて、抗体又はその抗原結合フラグメントが由来する同じ種、例えば、ヒトにおいて使用され、これにより、有害な免疫応答の出現を緩和するか、又は最小限に抑える。

【０２１０】

脱免疫化もまた、抗体の免疫原性を低下させるために使用することができる。本明細書中で使用される場合、用語「脱免疫化」は、Ｔ細胞エピトープを改変するための抗体の変化を包含する（例えば、国際特許出願公開ＷＯ９８／５２９７６及び同ＷＯ００／３４３１７を参照のこと）。例えば、出発抗体からのV_H配列及びV_L配列が分析され、そして、相補性決定領域（ＣＤＲ）との関連でのエピトープの所在位置、及び、配列内の他の重要な残基を示すそれぞれのＶ領域からのヒトＴ細胞エピトープ「マップ」が分析される。Ｔ細胞エピトープマップからの個々のＴ細胞エピトープが、最終的な抗体の活性を変化させる危険性が低い代わりのアミノ酸置換を特定するために分析される。アミノ酸置換の組合せを含む様々な代替的なV_H配列及びV_L配列が設計され、これらの配列が続いて、本明細書中に開示される診断方法及び処置方法における使用のために様々な結合性ポリペプチド（例えば、ＦＡＰ特異的抗体又はその免疫特異性フラグメント）に組み込まれ、その後、これらは機能について試験される。典型的には、１２個～２４個の間の変化型抗体が作製され、試験される。改変されたＶ領域及びヒトＣ領域を含む完全な重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子がその後、発現ベクターにクローン化され、それに続くプラスミドが、完全な抗体の産生のために細胞株に導入される。その後、抗体が、適切な生化学的アッセイ及び生物学的アッセイにおいて比較され、最適な変異体が特定される。

【０２１１】

モノクローナル抗体を、ハイブリドーマ技術、組換え技術及びファージディスプレー技術又はそれらの組合せの使用を含むこの技術分野において知られている広範囲の様々な技術を使用して調製することができる。例えば、モノクローナル抗体を、この技術分野において知られているハイブリドーマ技術、及び、例えば、Ｈａｒｌｏｗ他、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、第２版（１９８８）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ他、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉ

ｄｏｍａｓ、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎ．Ｙ．、５６３～６８１（１９８１）に教示されるハイブリドーマ技術を含む様々なハイブリドーマ技術を使用して製造することができる（前記参考文献はそれらの全体が参照によって組み込まれる）。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用される場合、ハイブリドーマ技術により製造される抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、真核生物クローン、原核生物クローン又はファージクローンのどのようなものも含めて、ただ１つのクローンに由来する抗体を示し、モノクローナル抗体が製造される方法に由来する抗体を示さない。したがって、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術により製造される抗体に限定されない。特定の実施形態において、本発明の抗体は、本明細書中に記載されるように、エプスタイン・バールウイルスによる形質転換により不死化されているヒトＢ細胞に由来する。

【０２１２】

広く知られているハイブリドーマプロセス（Ｋｏｈｌｅｒ他、Ｎａｔｕｒｅ　２５６（１９７５）、４９５）では、哺乳動物から得られる比較的短命の、すなわち、いつかは死滅するリンパ球、例えば、本明細書中に記載されるようなヒト対象に由来するＢ細胞が、不死性の腫瘍細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）と融合され、このようにして、不死性であり、かつ、Ｂ細胞の遺伝子コードされた抗体を産生することができるハイブリッド細胞、すなわち、「ハイブリドーマ」がもたらされる。得られたハイブリッドは、選抜、希釈及び再成長によって単一の遺伝的形質に分離され、それぞれの個々の株が単一抗体の形成のための特定の遺伝子を含む。それらにより、所望の抗原に対して均質であり、そして、それらの純粋な遺伝的起源に関連して、「モノクローナル」と呼ばれる抗体が産生される。

【０２１３】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、融合されていない元の骨髄腫細胞の成長又は生存を阻害する１つ又は複数の物質を好ましくは含有する好適な培養培地において播種され、成長させられる。当業者は、ハイブリドーマの形成、選抜及び成長のための試薬、細胞株及び培地がいくつかの供給源から市販されており、また、標準化されたプロトコルが十分に確立されていることを理解するであろう。一般に、ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地が、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性が、インビトロアッセイによって、例えば、本明細書中に記載されるような免疫沈殿、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）又は酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）などによって求められる。所望される特異性、親和性及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が特定された後、当該クローンは限界希釈手法によってサブクローン化され、標準的な方法によって成長させられる場合がある（例えば、Ｇｏｄｉｎｇ、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、５９頁～１０３頁（１９８６）を参照のこと）。サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体が、従来からの精製手段によって、例えば、プロテインＡ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーなどによって、培養培地、腹水又は血清から分離され得ることがさらに理解されるであろう。

【０２１４】

別の実施形態において、リンパ球を顕微操作によって選択することができ、可変性遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血単核細胞を、免疫化された哺乳動物又は生まれつき免疫性の哺乳動物（例えば、ヒト）から単離し、約７日間にわたってインビトロ培養することができる。培養物を、スクリーニング基準を満たす特異的なＩｇＧについてスクリーニングすることができる。陽性のウェルからの細胞を単離することができる。個々のＩｇ産生Ｂ細胞を、ＦＡＣＳによって、又は、Ｉｇ産生Ｂ細胞を補体媒介溶血プラークアッセイで特定することによって単離することができる。Ｉｇ産生Ｂ細胞をチューブの中に顕微操作することができ、V_H遺伝子及びV_L遺伝子を、例えば、ＲＴ－ＰＣＲを使用して増幅することができる。V_H遺伝子及びV_L遺伝子を抗体発現ベクターにクローン化し、発現のための細胞（例えば、真核生物細胞又は原核生物細胞）にトランスフェクショ

ンすることができる。

【０２１５】

代替では、抗体産生の細胞株が、当業者に広く知られている技術を使用して選択及び培養される場合がある。そのような技術が様々な実験室マニュアル及び一次刊行物に記載されている。これに関連して、下で記載されるような本発明における使用のために好適である技術が、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｃｏｌｉｇａｎ他編、Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９１）に記載される（これは、増刊を含めて、その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる）。

【０２１６】

特異的なエピトープを認識する抗体フラグメントが、知られている技術によって作製され得る。例えば、Ｆａｂフラグメント及びＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが、組換えによって、あるいは、例えば、パパイン（Ｆａｂフラグメントを製造するために）又はペプシン（Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントを製造するために）などの酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質分解的切断によって製造され得る。Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖のＣＨ１ドメインを含有する。そのようなフラグメントは、例えば、免疫グロブリンの免疫特異性部分を検出用試薬（例えば、放射性同位体など）に連結することを伴う免疫診断手順における使用のために十分である。

【０２１７】

１つの実施形態において、本発明の抗体は抗体分子の少なくとも１つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は１つ又は複数の抗体分子からの少なくとも２つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は１つ又は複数の抗体分子からの少なくとも３つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は１つ又は複数の抗体分子からの少なくとも４つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は１つ又は複数の抗体分子からの少なくとも５つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は１つ又は複数の抗体分子からの少なくとも６つのＣＤＲを含む。主題となるこれらの抗体に含まれ得る少なくとも１つのＣＤＲを含む例示的な抗体分子が本明細書中に記載される。

【０２１８】

本発明の抗体は、抗体を合成するためにこの技術分野において知られているいずれかの方法によって、特に、化学合成によって、又は、好ましくは、本明細書中に記載されるような組換え発現技術によって製造することができる。

【０２１９】

１つの実施形態において、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、１つ又は複数のドメインが部分的又は完全に欠失される合成された定常領域を含む（「ドメイン欠失抗体」）。特定の実施形態において、適合し得る改変された抗体は、ＣＨ２ドメイン全体が除かれているドメイン欠失の構築物又は変異体（ΔＣＨ２構築物）を含むであろう。他の実施形態については、短い連結ペプチドが、動きの柔軟性及び自由を可変領域に与えるために欠失ドメインの代わりに使用される場合がある。当業者は、そのような構築物が抗体の異化速度に対するＣＨ２ドメインの調節的特性のために特に好ましいことを理解するであろう。ドメイン欠失された構築物を、ＩｇＧ$_1$ヒト定常ドメインをコードするベクターを使用して得ることができる（例えば、国際特許出願公開ＷＯ０２／０６０９５５及び同ＷＯ００２／０９６９４８Ａ２を参照のこと）。このベクターは、ＣＨ２ドメインを欠失し、かつ、ドメイン欠失されたＩｇＧ$_1$定常領域を発現する合成ベクターを提供するために操作される。

【０２２０】

特定の実施形態において、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体はミニボディ（ｍｉｎｉｂｏｄｙ）である。ミニボディを、この技術分野において記載される方法を使用して作製することができる（例えば、米国特許第５，８３７，８

２１号又は国際特許出願公開ＷＯ９４／０９８１７を参照のこと）。
【０２２１】
１つの実施形態において、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、モノマーサブユニット間の会合を可能にする限り、数個のアミノ酸の欠失もしくは置換、又は、１個だけのアミノ酸の欠失もしくは置換を有する免疫グロブリン重鎖を含む。例えば、ＣＨ２ドメインの選択された領域における１個だけのアミノ酸の変異が、Ｆｃ結合を実質的に低下させるために、そして、それにより、ＦＡＰの局在化を増大させるために十分である場合がある。同様に、調節されるべきエフェクター機能（例えば、補体結合）を制御する１つ又は複数の定常領域ドメインのその部分を単に欠失することが望ましい場合がある。定常領域のそのような部分的欠失は抗体の選択された特性（血清半減期）を改善し、一方で、当該定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能を損なわないままにし得る。そのうえ、上記において暗に示されるように、開示された抗体の定常領域は、生じた構築物のプロファイルを高める１つ又は複数のアミノ酸の変異又は置換により合成物である場合がある。これに関連して、改変された抗体の立体配置及び免疫原性プロファイルを実質的に維持しながら、保存されている結合部位（例えば、Ｆｃ結合）によって提供される活性を妨げることが可能である場合がある。さらに他の実施形態は、１つ又は複数のアミノ酸を、望ましい特性（例えば、エフェクター機能など）を高めるために、あるいは、細胞毒素又は炭水化物のより多くの結合を提供するために定常領域に付加することを含む。そのような実施形態では、選択された定常領域ドメインに由来する特異的な配列を挿入すること、又は複製することが望ましい場合がある。
【０２２２】
本発明はまた、本明細書中に記載される抗体分子（例えば、V_H領域及び／又はV_L領域）の変異体（誘導体を含む）を含む抗体、本明細書中に記載される抗体分子（例えば、V_H領域及び／又はV_L領域）の変異体（誘導体を含む）から本質的になる抗体、あるいは、本明細書中に記載される抗体分子（例えば、V_H領域及び／又はV_L領域）の変異体（誘導体を含む）からなる抗体を提供し、そのような抗体又はそのフラグメントはＦＡＰに免疫特異的に結合する。当業者に知られている様々な標準的技術を、抗体をコードするヌクレオチド配列に変異を導入するために使用することができ、そのような技術には、アミノ酸置換をもたらす部位特異的変異誘発及びＰＣＲ媒介変異誘発が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、変異体（誘導体を含む）は、基準となるV_H領域、V_H－ＣＤＲ１、V_H－ＣＤＲ２、V_H－ＣＤＲ３、V_L領域、V_L－ＣＤＲ１、V_L－ＣＤＲ２又はV_L－ＣＤＲ３に対して５０未満のアミノ酸置換、４０未満のアミノ酸置換、３０未満のアミノ酸置換、２５未満のアミノ酸置換、２０未満のアミノ酸置換、１５未満のアミノ酸置換、１０未満のアミノ酸置換、５未満のアミノ酸置換、４未満のアミノ酸置換、３未満のアミノ酸置換又は２未満のアミノ酸置換をコードする。「保存的（な）アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似する電荷を伴う側鎖を有するアミノ酸残基により置き換えられるアミノ酸置換である。類似する電荷を伴う側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーがこの技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベーター分岐した側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。代替において、変異を、例えば、飽和変異誘発などによってコード配列の全体又は一部に沿ってランダムに導入することができ、得られた変異体を、活性（例えば、ＦＡＰと結合し、阻害する能力）を保持する変異体を特定するために生物学的活性についてスクリーニングすることができる。
【０２２３】

例えば、変異を抗体分子のフレームワーク領域においてのみに、又は、抗体分子のＣＤＲ領域においてのみに導入することが可能である。導入された変異はサイレント変異又は中立のミスセンス変異である場合があり、例えば、抗体の抗原結合能に対する影響を全く有しないか、又はほとんど有しない場合があり、実際、いくつかのそのような変異はアミノ酸配列を全く変化させない。これらのタイプの変異は、コドン使用を最適化するために、又は、ハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用である場合がある。本発明の抗体をコードするコドン最適化コード領域が本明細書中の他のところで開示される。代替において、非中立的なミスセンス変異により、抗体の抗原結合能が変化する場合がある。ほとんどのサイレント変異及び中立的ミスセンス変異の位置はフレームワーク領域内である可能性が高く、一方、ほとんどの非中立的ミスセンス変異の位置はＣＤＲ内である可能性が高く、だが、このことは絶対的要件でない。当業者であれば、所望される性質、例えば、抗原結合活性における変化がないこと又は結合活性における変化（例えば、抗原結合活性における改善又は抗体特異性における変化）などを有する変異体分子を設計し、試験することができるであろう。変異誘発後、コードされたタンパク質が常法により発現させられる場合があり、そして、コードされたタンパク質の機能的活性及び／又は生物学的活性（例えば、ＦＡＰの少なくとも一つのエピトープと免疫特異的に結合する能力）を、本明細書中に記載される技術を使用して、又は、この技術分野において知られている技術を常法により改変することによって求めることができる。

【０２２４】

ＩＩＩ．抗体をコードするポリヌクレオチド

抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体をコードするポリヌクレオチドは、どのようなポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチド（これらは非修飾のＲＮＡ又はＤＮＡあるいは修飾されたＲＮＡ又はＤＮＡである場合がある）からでも構成され得る。例えば、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体をコードするポリヌクレオチドは、一本鎖及び二本鎖のＤＮＡ、一本鎖領域及び二本鎖領域の混合物であるＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖のＲＮＡ、ならびに、一本鎖領域及び二本鎖領域の混合物であるＲＮＡ、一本鎖である場合がある、あるいは、より典型的には、二本鎖である場合があるか、又は、一本鎖領域及び二本鎖領域の混合物である場合があるＤＮＡ及びＲＮＡを含むハイブリッド分子から構成され得る。加えて、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体をコードするポリヌクレオチドは、ＲＮＡ又はＤＮＡ、あるいは、ＲＮＡ及びＤＮＡの両方を含む三本鎖領域から構成され得る。抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体をコードするポリヌクレオチドはまた、安定性又は他の理由のために改変される１つ又は複数の修飾された塩基あるいはＤＮＡ骨格又はＲＮＡ骨格を含有してもよい。「修飾（改変）（された）」塩基には、例えば、トリチル化塩基及び非通常的塩基（例えば、イノシンなど）が含まれる。様々な修飾をＤＮＡ及びＲＮＡに対して行うことができる；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的又は代謝的に改変された形態を包含する。

【０２２５】

免疫グロブリン（例えば、免疫グロブリンの重鎖部分又は軽鎖部分）に由来するポリペプチドの非天然型変異体をコードする単離されたポリヌクレオチドを、１つ又は複数のアミノ酸置換、アミノ酸付加又はアミノ酸欠失が、コードされたタンパク質に導入されるように、１つ又は複数のヌクレオチド置換、ヌクレオチド付加又はヌクレオチド欠失を免疫グロブリンのヌクレオチド配列に導入することによって作出することができる。変異は、標準的な技術によって、例えば、部位特異的変異誘発及びＰＣＲ媒介変異誘発などによって導入される場合がある。好ましくは、保存的なアミノ酸置換が１つ又は複数の非必須アミノ酸残基において行われる。

【０２２６】

よく知られているように、ＲＮＡが、標準的な技術、例えば、イソチオシアン酸グアニジウム抽出及び沈殿化、その後、遠心分離又はクロマトグラフィーなどによって、元のＢ細胞、ハイブリドーマ細胞又は他の形質転換細胞から単離される場合がある。望ましい場

合、ｍＲＮＡが、標準的な技術、例えば、オリゴｄＴセルロースでのクロマトグラフィーなどによって総ＲＮＡから単離される場合がある。好適な技術がこの技術分野では熟知されている。１つの実施形態において、抗体の軽鎖及び重鎖をコードするｃＤＮＡが、逆転写酵素及びＤＮＡポリメラーゼをよく知られている方法に従って使用して、同時又は別個に作製される場合がある。ＰＣＲが、コンセンサスな定常領域プライマーによって、又は、公開された重鎖及び軽鎖のＤＮＡ配列及びアミノ酸配列に基づくより特異的なプライマーによって開始される場合がある。上記で議論されるように、ＰＣＲはまた、抗体の軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡクローンを単離するために使用される場合がある。この場合、ライブラリーが、コンセンサスなプライマー又はより大きい相同的プローブ（例えば、ヒト定常領域プローブなど）によってスクリーニングされる場合がある。

【０２２７】

ＤＮＡ、典型的にはプラスミドＤＮＡが、この技術分野において知られている技術を使用して細胞から単離され、そして、例えば、組換えＤＮＡ技術に関連する前記の参考文献に詳しく示される標準的なよく知られている技術に従って制限酵素マッピング及び配列決定に供される場合がある。当然のことながら、ＤＮＡは、単離プロセス又はその後の分析の期間中のどの時点であっても、本発明に従う合成物である場合がある

【０２２８】

この関連において、本発明はまた、本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の結合ドメイン又は可変領域を少なくともコードするポリヌクレオチドに関連する。１つの実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）をコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチド、そのような核酸から本質的になる単離されたポリヌクレオチド、又は、そのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドであって、重鎖可変領域のＣＤＲの少なくとも１つ、又は、重鎖可変領域のV_H－ＣＤＲの少なくとも２つが、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用重鎖のV_H－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、V_H－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はV_H－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である、そのような単離されたポリヌクレオチドを提供する。代替において、V_HのV_H－ＣＤＲ１領域、V_H－ＣＤＲ２領域又はV_H－ＣＤＲ３領域は、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用重鎖のV_H－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、V_H－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はV_H－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である。したがって、この実施形態によれば、本発明の重鎖可変領域は、図１Ａ－１Ｆに示されるポリペプチド配列に関連づけられるV_H－ＣＤＲ１ポリペプチド配列、V_H－ＣＤＲ２ポリペプチド配列又はV_H－ＣＤＲ３ポリペプチド配列を有する。

【０２２９】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）をコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチド、そのような核酸から本質的になる単離されたポリヌクレオチド、又は、そのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドであって、軽鎖可変領域のV_L－ＣＤＲの少なくとも１つ、又は、軽鎖可変領域のV_L－ＣＤＲの少なくとも２つが、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用軽鎖のV_L－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、V_L－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はV_L－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である、そのような単離されたポリヌクレオチドを提供する。代替において、V_LのV_L－ＣＤＲ１領域、V_L－ＣＤＲ２領域又はV_L－ＣＤＲ３領域は、本明細書中に開示される抗体から得られる参照用軽鎖のV_L－ＣＤＲ１のアミノ酸配列、V_L－ＣＤＲ２のアミノ酸配列又はV_L－ＣＤＲ３のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％又は９５％同一である。したがって、この実施形態によれば、本発明の軽鎖可変領域は、図１Ａ－１Ｆのいずれか１つに示されるポリペプチド配列に関連づけられるV_L－ＣＤＲ１ポリペプチド配列、V_L－ＣＤＲ２ポリペプチド配列又はV_L－ＣＤＲ３ポリペプチド配列を有する。

【０２３０】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）をコードする

核酸を含む単離されたポリヌクレオチド、そのような核酸から本質的になる単離されたポリヌクレオチド、又は、そのような核酸からなる単離されたポリヌクレオチドであって、V_H－ＣＤＲ１領域、V_H－ＣＤＲ２領域及びV_H－ＣＤＲ３領域が、図１Ａ－１Ｆのいずれか１つに示されるV_H－ＣＤＲ１群、V_H－ＣＤＲ２群及びV_H－ＣＤＲ３群と同一であるポリペプチド配列を有する、そのような単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【０２３１】

この技術分野において知られているように、２つのポリペプチド又は２つのポリヌクレオチドの間における「配列同一性」が、一方のポリペプチド又はポリヌクレオチドのアミノ酸配列又は核酸配列を第２のポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列に対して比較することによって求められる。本明細書中で議論されるとき、任意の特定のポリペプチドが別のポリペプチドと少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％同一であるかどうかを、この技術分野において知られている方法及びコンピュータープログラム／ソフトウエア（例えば、ＢＥＳＴＦＩＴプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ、Ｖｅｒｓｉｏｎ ８ ｆｏｒ Ｕｎｉｘ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ、５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ、５３７１１）（これに限定されない）など）を使用して決定することができる。ＢＥＳＴＦＩＴでは、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ（Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ ２（１９８１）、４８２～４８９）の局所的相同性アルゴリズムを、２つの配列の間における相同性の最も良いセグメントを見出すために使用する。ＢＥＳＴＦＩＴ又はいずれかの他の配列アライメントプログラムを使用して、特定の配列が、例えば、本発明による参照配列と９５％同一であるかどうかを決定するときには、当然のことながら、同一性の百分率が参照ポリペプチド配列の全長にわたって計算され、かつ、参照配列におけるアミノ酸の総数の５％までの相同性におけるギャップが許容されるように、パラメーターが設定される。

【０２３２】

本発明の好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドは、表ＩＩに示されるような、抗ＦＡＰ抗体及び／又はＦＡＰ種を認識する抗体及び／又はそれらのフラグメントのV_H領域又はV_L領域のポリヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、あるいは、そのような核酸から本質的になるか、あるいは、そのような核酸からなる。これに関連して、当業者は、軽鎖及び／又は重鎖の可変ドメインを少なくともコードするポリヌクレオチドが両方の免疫グロブリン鎖又は一方の免疫グロブリン鎖のみの可変ドメインをコードし得ることを容易に理解するであろう。したがって、１つの実施形態において、ポリヌクレオチドは、表ＩＩに示されるような、抗ＦＡＰ抗体及び／又はそのフラグメントのV_H領域及びV_L領域のポリヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、あるいは、そのような核酸から本質的になるか、あるいは、そのような核酸からなる。

表ＩＩ：ヒトＦＡＰ又はそのペプチドを認識する抗体のV_H領域及びV_L領域のヌクレオチド配列

【表２－１】

抗体	可変重鎖（VH）及び可変軽鎖（VL）又は可変カッパ軽鎖（VK）のヌクレオチド配列
NI-206.82C2-VH (PIMC ではない)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCAC TCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTTACTTGGAACTGGAT CAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAG TGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAGGTCGAATAACCATCAATCCAGACACTT CCAAGAACCAGTTCTACCTGCAGTTGAAATCTGTGACTCCCGAGGATGCGGCTGTCTA TTATTGTGCAAGAGATAGTAGCATCTTATATGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTCTCCTCG 配列番号１
NI-206.82C2-VH (PIMC)	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCAC TCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTTACTTGGAACTGGAT CAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAG TGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAGGTCGAATAACCATCAATCCAGACACTT CCAAGAACCAGTTCTACCTGCAGTTGAAATCTGTGACTCCCGAGGATGCGGCTGTCTA TTATTGTGCAAGAGATAGTAGCATCTTATATGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTCTCCTCG 配列番号３
NI-206.82C2-VL (デフォルトの PIMC)	CAGGCTGTGCTGACTCAGCCGTCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCATCAGCCAGTC TCACCTGCACCTTGCCCAGTGGCATCAATGTTGGTACCTACAGGATATTCTGGTTCCA GCAGAAGCCAGGGAGTCCTCCCCAGTATCTCCTGAGTTACAAATCAGACTCAGATAAT CACCAGGGCTCTGGAGTCCCCAGCCGCTTCTCTGGATCCAAAGATGCTTCGGCCAATG CAGGGATTTTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAT GATTTGGCACAGCAGCGCTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA 配列番号５
NI-206.59B4-VH (PIMC)	CAGGTACAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGG TCTCCTGCAAGACTTCTGGATACACCTTCACCGACTACTATATACACTGGGTGCGACA GGCCCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGAGGTGGCACA AACTATGCACAAAAATTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACCTCCATCGCTA CAGCCTACATGGAGTTGAGTAGACTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GACTGCGTCGCTAAAAATAGCAGCAGTTGGTACATTTGACTGCTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACCGTCTCCTCG 配列番号７

【表２－２】

NI-206.59B4-VL (PIMC)	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGACGGCCAGGA TCACCTGCTCTGGAGATGCATTGTCAAAGCAATATGCTTTTTGGTTCCAGCAGAAGCC AGGCCAGGCCCCTATATTGGTGATATATCAAGACACTAAGAGGCCCTCAGGGATCCCT GGGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAACAGTCACGTTGACCATCAGTGGAGCCC AGGCAGACGACGAGGCTGACTATTATTGTCAATCAGCAGACAGCAGTGGTACTTATGT CTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA 配列番号９
NI-206.22F7-VH (PIMC ではない)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTCAGTACCCATGGCATGTACTGGGTCCGCCA GCCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTGATAAA AAGTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA CGGTGTATTTGGAAATGAGCAGCGTGAGAGCTGAGGACACGGCTCTATATTACTGTTT CTGCCGCCGGGATGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG 配列番号１１
NI-206.22F7-VL (PIMC ではない)	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAAACGGCCAGGA TCACCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAAAAGTATGCTTATTGGTACCAGCAGAAGTC AGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCATCTATGAGGACACCAAACGACCCTCCGGGATCCCT GAGAGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAATGGCCACCTTGACTATCAGTGGGGCCC AGGTGGAGGATGAAGCTGACTATTACTGTTACTCAACAGACAGCAGCGGTAATTATTG GGTATTCGGCGGAGGGACCGAGGTGACCGTCCTA 配列番号１３
NI-206.27E8-VH (デフォルトの PIMC)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTGAGCCTGGGGGGTCCCTAAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGTTTCACTTTCAGTGATGCCTGGATGAACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGGCGTATTAAAACGAAAAGCGATGGTGGG ACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAGAGGCAGATTTTCCATCTCAAGAGATGATTCAA AAAACACACTGTTTCTGGAAATGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACAGCCATATATTA TTGTTTTATTACTGTCATAGTAGTATCCTCCGAATCTCCACTTGACCACTGGGGCCAG GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG 配列番号１５
NI-206.27E8-VL (デフォルトの PIMC)	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGACGGCCAGGA TCACCTGCTCTGGAGACGAACTGCCAAAACAATATGCTTATTGGTACCAGCAGAAGCC AGGCCAGGCCCCTGTGTTGGTGATATATAAGGACAGACAGAGGCCCTCAGGGATCCCT GAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAACAGTCACGTTGACCATCAGTGGAGTCC AGGCAGAAGACGAGGCTGACTATTACTGTCAATCAGCATACAGCATTAATACTTATGT GATTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA 配列番号１７

【表２－３】

NI-206.12G4-VH (PIMC ではない)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATTTCTTATATTAGTAGTGGTAGTAGTTACACA AACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGT CAGTGTATCTGGAAGTCAACGGCCTGACAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC GAGAGTTCGATATGGGGACCGGGAGATGGCAACAATCGGAGGATTTGATTTCTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG 配列番号19
NI-206.12G4-VL (デフォルトの PIMC)	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGACGGCCAGGA TCACCTGCTCTGGAGATGCACTGCCAAAGCAATATGCTTATTGGTATCAACAGAGCCC AGGCCAGGCCCCTGTGTTGGTGATATATAAAGACAGTGAGAGGCCCTCAGGGATCCCT GAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAACAGTCACGTTGACCATCAGTGGAGTCC AGGCAGAAGACGAGGCTGACTATTACTGTCAATCAGCAGACAGCGGTGGTACTTCTAG GATATTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTG 配列番号21
NI-206.17A6-VH (デフォルトの PIMC)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAGGTCTACGGAGACCCTGTCCC TCACCTGCCTTGTCTCTGGTGACTCCATCAACAGTCACTACTGGAGTTGGCTCCGGCA GTCCCCAGGGAGGGGCCTGGAATGGATTGGGTACATTTACTACACTGGGCCCACCAAC TACAATCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCTCCATATCACTGGGCACGTCCAAGGACCAGT TCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCAGATATTACTGTGCGAG AAATAAGGTCTTTTGGCGTGGTTCTGACTTCTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG 配列番号23
NI-206.17A6-VK (PIMC ではない)	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCTAGGGGAAAGAGCCA CCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTGCCAACAACTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATGTATGACGCATCCACCAGGGCCACTGGC ATCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGCCAGCAATTTGTTACCTCACACCA CATGTACATTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAA 配列番号25

【０２３３】

クローニング戦略に起因して、重鎖および軽鎖のＮ末端およびＣ末端におけるアミノ酸配列は潜在的にはプライマー誘発変化をＦＲ１およびＦＲ４に含有する場合があり、しかしながら、この変化は抗体の生物学的活性には実質的な影響を与えない。コンセンサスなヒト抗体を提供するために、最初のクローンのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列をデータベースにおける該当するヒト生殖系列可変領域配列とアライメントし、それらと一致させることができる；例えば、上記で記載されるようなＶｂａｓｅ２を参照のこと。ヒト抗体のアミノ酸配列は、Ｎ末端およびＣ末端のアミノ酸が、ＰＣＲプライマーに起因してコンセンサスな生殖系列配列から逸脱している可能性があると見なされ、したがって、プライマー誘発変異補正（ＰＩＭＣ）によって置き換えられているときには太字で示される。

【０２３４】

本発明にはまた、他のところで記載されるように、本発明のポリヌクレオチドのフラグメントが含まれる。加えて、本明細書中に記載されるように、融合ポリヌクレオチド、Ｆａｂフラグメント及び他の誘導体をコードするポリヌクレオチドも本発明によって包含される。ポリヌクレオチドは、この技術分野において知られているいずれかの方法によって

作製又は製造される場合がある。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られているならば、当該抗体をコードするポリヌクレオチドが、例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒ他、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１７（１９９４）、２４２に記載されるように、化学合成されたオリゴヌクレオチドから組み立てられる場合があり、これには、簡単に記載すると、抗体をコードする配列の一部分を含有する重複するオリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及び連結、ならびに、連結されたオリゴヌクレオチドのＰＣＲによる増幅を伴う。

【０２３５】

代替において、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体をコードするポリヌクレオチドが、好適な供給源から得られる核酸から作製される場合がある。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンが入手できず、しかし、抗体分子の配列が知られているならば、当該抗体をコードする核酸が化学合成される場合があるか、あるいは、好適な供給源（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリー、あるいは、ＦＡＰ特異的抗体を発現するいずれかの組織もしくは細胞（例えば、抗体を発現させるために選択されるハイブリドーマ細胞など）から作製されるｃＤＮＡライブラリー、又は、そのようなものから単離される核酸、好ましくはポリＡ$^{+}$ＲＮＡ）から、配列の３’末端及び５’末端にハイブリダイゼーション可能である合成プライマーを使用するＰＣＲ増幅によって得られる場合があり、又は、例えば、抗体をコードするｃＤＮＡライブラリーからｃＤＮＡクローンを特定するために特定の遺伝子配列について特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得られる場合がある。ＰＣＲによって生じる増幅された核酸がその後、この技術分野において広く知られているいずれかの方法を使用して、複製可能なクローニングベクターにクローン化される場合がある。したがって、本発明の１つの実施形態では、抗体、免疫グロブリン鎖、又はそれらのフラグメントをコードするｃＤＮＡが抗ＦＡＰ抗体の産生のために使用される。

【０２３６】

抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体のヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列が決定されると、そのヌクレオチド配列が、異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製するために、例えば、アミノ酸の置換、欠失及び／又は挿入をもたらすために、ヌクレオチド配列の操作についてこの技術分野においてよく知られている方法、例えば、組換えＤＮＡ技術、部位特異的変異誘発、ＰＣＲなどを使用して操作される場合がある（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、第２版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．（１９９０）、及び、Ａｕｓｕｂｅｌ他編、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９８）に記載される技術を参照のこと。これらはともに、それらの全体において参照によって本明細書中に組み込まれる）。

【０２３７】

ＩＶ．抗体ポリペプチドの発現

単離された遺伝物質が、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体を提供するために操作された後、抗体をコードするポリヌクレオチドは典型的には、所望される量の抗体を産生させるために使用されることがある宿主細胞への導入のために発現ベクターに挿入される。抗体あるいはそのフラグメント、誘導体又はアナログ（例えば、標的分子に結合する抗体の重鎖又は軽鎖）の組換え発現が本明細書中に記載される。本発明の抗体分子又は抗体の重鎖もしくは軽鎖あるいはその一部分（好ましくは重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインを含有するその一部分）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子を産生させるためのベクターが、この技術分野においてよく知られている技術を使用する組換えＤＮＡ技術によって作製される場合がある。したがって、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現させることによってタンパク質を調製するための方法が本明細書中に記載される。当業者によく知られてい

る方法を、抗体コード配列ならびに適切な転写制御シグナル及び翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築するために使用することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術及びインビボ遺伝子組換えが含まれる。したがって、本発明は、本発明の抗体分子あるいはその重鎖又は軽鎖あるいは重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列をｐｒｏモーターに機能的に連結されて含む複製可能なベクターを提供する。そのようなベクターは抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含む場合があり（例えば、国際特許出願公開ＷＯ８６／０５８０７及びＷＯ８９／０１０３６、ならびに、米国特許第５，１２２，４６４号を参照のこと）、また、抗体の可変ドメインが、重鎖全体又は軽鎖全体を発現させるためにそのようなベクターにクローン化される場合がある。

【０２３８】

用語「ベクター」又は「発現ベクター」は、所望される遺伝子を宿主細胞に導入し、その遺伝子をその宿主細胞において発現させるためのビヒクルとして本発明に従って使用されるベクターを意味するために本明細書中では使用される。当業者には知られているように、そのようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス及びレトロウイルスからなる群から容易に選択される場合がある。一般に、本発明と適合し得るベクターは、選択マーカー、所望される遺伝子のクローニングを容易にするための適切な制限部位、ならびに、真核生物細胞又は原核生物細胞における進入能及び／又は複製能を含む。本発明の目的のために、数多くの発現ベクター系が用いられる場合がある。例えば、１つのクラスのベクターでは、動物ウイルス、例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ＲＳＶ、ＭＭＴＶ又はＭＯＭＬＶ）又はＳＶ４０ウイルスなどに由来するＤＮＡエレメントが利用される。他では、内部リボソーム結合部位を伴う多シストロン系の使用を伴う。加えて、ＤＮＡをその染色体に組み込んでいる細胞が、トランスフェクションされた宿主細胞の選択を可能にする１つ又は複数のマーカーを導入することによって選択される場合がある。マーカーにより、栄養要求性宿主に対する原栄養性、殺生物剤抵抗性（例えば、抗生物質）、又は、重金属（例えば、銅など）に対する抵抗性が与えられる場合がある。選択マーカー遺伝子は、発現させられるＤＮＡ配列に直接に連結することができるか、又は、共形質転換によって同じ細胞に導入することができる。さらなるエレメントがまた、ｍＲＮＡの最適な合成のために必要となる場合がある。これらのエレメントには、シグナル配列、スプライス信号ならびに転写プロモーター、エンハンサー及び終結シグナルが含まれる場合がある。

【０２３９】

特に好ましい実施形態において、クローン化された可変領域遺伝子が、上記で議論されるような重鎖定常領域遺伝子及び軽鎖定常領域遺伝子（好ましくはヒトの遺伝子）と一緒に発現ベクターに挿入される。このベクターは、サイトメガロウイルスのプロモーター／エンハンサー、マウスのベータグロビン主要プロモーター、ＳＶ４０の複製起点、ウシ成長ホルモンのポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエクソン１及びエクソン２、ジヒドロ葉酸レダクターゼの遺伝子及びリーダー配列を含有する。このベクターは、可変領域遺伝子及び定常領域遺伝子の取り込み、ＣＨＯ細胞におけるトランスフェクション、それに続く、Ｇ４１８含有培地における選択、及び、メトトレキサート増幅を行ったとき、抗体の非常に高いレベルの発現をもたらすことが見出されている。当然のことながら、発現を真核生物細胞において誘発することができる発現ベクターはどれも、本発明において使用される場合がある。好適なベクターの例には、プラスミドのｐｃＤＮＡ３、ｐＨＣＭＶ／Ｚｅｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＥＦ１／Ｈｉｓ、ｐＩＮＤ／ＧＳ、ｐＲｃ／ＨＣＭＶ２、ｐＳＶ４０／Ｚｅｏ２、ｐＴＲＡＣＥＲ－ＨＣＭＶ、ｐＵＢ６／Ｖ５－Ｈｉｓ、ｐＶＡＸ１及びｐＺｅｏＳＶ２（これらはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）から入手可能である）、ならびに、プラスミドのｐＣＩ（これはＰｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）から入手可能である）が含まれるが、これらに限定されない。一般に、非常に多数の形質転換細胞を、好適に高レベルの免疫グロブリンの重鎖

及び軽鎖を発現する形質転換細胞についてスクリーニングすることは、例えば、ロボットシステムによって行うことができる日常的な実験である。ベクター系はまた、米国特許第５，７３６，１３７号及び第５，６５８，５７０号に教示される（これらのそれぞれがその全体において参照によって本明細書中に組み込まれる）。この系は、例えば、３０ｐｇ／細胞／日を超える高い発現レベルを提供する。他の例示的なベクター系が、例えば、米国特許第６，４１３，７７７号に開示される。

【０２４０】

他の好ましい実施形態において、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体が、多シストロン構築物、例えば、米国特許出願公開第２００３－０１５７６４１号Ａ１（その全体が本明細書中に組み込まれる）に開示される多シストロン構築物などを使用して発現させられる場合がある。これらの発現系において、目的とする多数の遺伝子産物（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖など）がただ１つの多シストロン構築物からもたらされる場合がある。これらの系では、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）が、比較的高いレベルの抗体を提供するために都合よく使用される。適合し得るＩＲＥＳ配列が米国特許第６，１９３，９８０号（これもまた本明細書中に組み込まれる）に開示される。当業者は、そのような発現系が、本出願において開示される抗体の完全な範囲を効果的に産生するために使用されることがあることを理解するであろう。したがって、１つの実施形態において、本発明は、抗体の免疫グロブリン鎖の結合ドメイン又は可変領域を少なくともコードするポリヌクレオチドを、場合により、前記結合性分子の他の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードするポリヌクレオチドとの組合せで含むベクターを提供する。

【０２４１】

より一般的には、抗体のモノマーサブユニットをコードするベクター又はＤＮＡ配列が調製されると、発現ベクターが、適切な宿主細胞に導入される場合がある。宿主細胞へのプラスミドの導入を、当業者にはよく知られている様々な技術によって達成することができる。これらには、例えば、Ｆｕｇｅｎｅ（登録商標）又はリポフェクタミンを使用するリポトランスフェクションを含むトランスフェクション、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、包まれたＤＮＡを用いた細胞融合、顕微注入、及び、無傷のウイルスによる感染が含まれるが、これらに限定されない。典型的には、宿主へのプラスミド導入が、標準的なリン酸カルシウム共沈殿法により行われる。発現構築物を有する宿主細胞が、軽鎖及び重鎖を産生させるために適切である条件のもとで成長させられ、重鎖及び／又は軽鎖のタンパク質合成についてアッセイされる。例示的なアッセイ技術には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）又は蛍光活性化細胞分取器分析（ＦＡＣＳ）及び免疫組織化学などが含まれる。

【０２４２】

発現ベクターが従来からの技術によって宿主細胞に移され、トランスフェクションされた細胞がその後、抗体を本明細書中に記載される方法における使用のために産生させるため従来からの技術によって培養される。したがって、本発明には、好ましくは異種プロモーターに機能的に連結される、本発明の抗体又はその重鎖もしくは軽鎖、あるいは、少なくともその免疫グロブリンの結合ドメイン又は可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞が含まれる。加えて、又は、代替において、本発明にはまた、抗体の免疫グロブリン鎖の結合ドメイン又は可変領域を少なくともコードするポリヌクレオチドを、場合により、前記結合性分子の他の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードするポリヌクレオチドとの組合せで含む本明細書中上記で定義されるようなベクターを含む宿主細胞が含まれる。二重鎖抗体を発現させるための好ましい実施形態において、重鎖及び軽鎖の両方をコードする単一のベクター又は複数のベクターが、下記で詳述されるように、完全な免疫グロブリン分子の発現のために宿主細胞において共発現させられる場合がある。

【０２４３】

宿主細胞が本発明の２つの発現ベクターにより共トランスフェクションされる場合があり、この場合、第１のベクターが重鎖由来のポリペプチドをコードし、第２のベクターが軽鎖由来のポリペプチドをコードする。これら２つのベクターは、重鎖ポリペプチド及び

軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同一の選択マーカーを含有する場合がある。代替では、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードするただ１つのベクターが使用される場合がある。そのような状況では、軽鎖が好都合には、毒性のない重鎖の過剰を避けるために重鎖の前に置かれる（Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ、Ｎａｔｕｒｅ　３２２（１９８６）、５２；Ｋｏｈｌｅｒ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７（１９８０）、２１９７を参照のこと）。重鎖及び軽鎖のためのコード配列がｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡを含む場合がある。

【０２４４】

本明細書中で使用される場合、「宿主細胞」は、組換えＤＮＡ技術を使用して構築され、少なくとも１つの異種遺伝子をコードするベクターを有する細胞を示す。抗体を組換え宿主から単離するためのプロセスの記載において、用語「細胞」及び「細胞培養（物）」が、別途明確に指定される場合を除き、抗体の供給源を示すために交換可能に使用される。別の言い方をすれば、「細胞」からのポリペプチドの回収は、遠心分離された細胞全体から、又は、培地及び懸濁された細胞の両方を含有する細胞培養物からのどちらをも意味する場合がある。

【０２４５】

様々な宿主－発現ベクター系が、本明細書中に記載される方法において使用されるための抗体分子を発現させるために利用される場合がある。そのような宿主－発現系は、目的とするコード配列が産生され、続いて精製されることがあるビヒクルを表し、しかし、適切なヌクレオチドコード配列により形質転換又はトランスフェクションされたとき、本発明の抗体分子をその場で発現する細胞もまた表す。これらには、微生物、例えば、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ発現ベクター、プラスミドＤＮＡ発現ベクター又はコスミドＤＮＡ発現ベクターにより形質転換される細菌（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターにより形質転換される酵母（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａ）；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）が感染させられる昆虫細胞系；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスＣａＭＶ；タバコモザイクウイルスＴＭＶ）が感染させられるか、又は、抗体コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）により形質転換される植物細胞系；あるいは、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）を含有する組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えば、ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞、ＮＳＯ細胞、ＢＬＫ細胞、２９３細胞、３Ｔ３細胞）が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、完全な組換え抗体分子の発現のためにはとりわけ、細菌細胞（例えば、大腸菌など）、より好ましくは真核生物細胞が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ベクター（例えば、ヒトサイトメガロウイルスからの主要前初期遺伝子プロモーターエレメントなど）と併せての哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞などが、抗体のための効果的な発現系である（例えば、Ｆｏｅｃｋｉｎｇ他、Ｇｅｎｅ　４５（１９８６）、１０１；Ｃｏｃｋｅｔｔ他、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８（１９９０）、２を参照のこと）。

【０２４６】

タンパク質発現のために使用される宿主細胞株は多くの場合、哺乳動物起源である；当業者には、宿主細胞株において発現させられる所望の遺伝子産物のために最もよく適する特定の宿主細胞株を優先的に決定する能力があると思われる。例示的な宿主細胞株には、ＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）、ＤＧ４４及びＤＵＸＢ１１（チャイニーズハムスター卵巣株、ＤＨＦＲ欠損）、ＨＥＬＡ（ヒト子宮頸ガン）、ＣＶ１（サル腎臓株）、ＣＯＳ（ＳＶ４０のＴ抗原を有するＣＶ１の誘導体）、ＶＥＲＹ、ＢＨＫ（ベビーハムスター腎臓）、ＭＤＣＫ、ＷＩ３８、Ｒ１６１０（チャイニーズハムスター線維芽細胞）、ＢＡＬＢＣ／３Ｔ３（マウス線維芽細胞）、ＨＡＫ（ハムスター腎臓株）、ＳＰ２／Ｏ（

マウス骨髄腫）、Ｐ３ｘ６３－Ａｇ３．６５３（マウス骨髄腫）、ＢＦＡ－１ｃ１ＢＰＴ（ウシ内皮細胞）、ＲＡＪＩ（ヒトリンパ球）及び２９３（ヒト腎臓）が含まれるが、これらに限定されない。ＣＨＯ細胞及び２９３細胞が特に好ましい。宿主細胞株は典型的には、商用サービスから、すなわち、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから入手可能であり、又は、発表された文献から入手可能である。

【０２４７】

加えて、挿入された配列の発現を調節するか、あるいは、遺伝子産物を所望される特定の様式で修飾し、また、プロセシングする宿主細胞系統が選ばれる場合がある。タンパク質産物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）及びプロセシング（例えば、切断）が当該タンパク質の機能のために重要である場合がある。種々の宿主細胞が、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後のプロセシング及び修飾のための特徴的かつ特異的な機構を有する。適切な細胞株又は宿主系を、発現される外来タンパク質の正しい修飾及びプロセシングを保証するために選ぶことができる。この目的を達成するために、一次転写物の適正なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化及びリン酸化のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が使用される場合がある。

【０２４８】

組換えタンパク質の長期間にわたる高収量の産生のためには、安定的発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞株が操作される場合がある。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使用するのではなく、むしろ、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）及び選択マーカーによって制御されるＤＮＡにより形質転換することができる。外来ＤＮＡを導入した後、操作された細胞は富化培地において１日間～２日間にわたって成長させられる場合があり、その後、選択培地に切り換えられる。組換えプラスミドにおける選択マーカーは選択に対する抵抗性を与え、また、細胞がプラスミドをその染色体に安定的に組み込み、成長して、結果としてクローン化され、かつ、細胞株に拡大することができる増殖巣を形成することを可能にする。この方法は、抗体分子を安定的に発現する細胞株を操作するために都合よく使用される場合がある。

【０２４９】

数多くの選択システムが使用される場合があり、これらには、下記のものが含まれるが、それらに限定されない：単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子（Ｗｉｇｌｅｒ他、Ｃｅｌｌ　１１（１９７７）、２２３）、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ＆Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　４８（１９９２）、２０２）及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Ｌｏｗｙ他、Ｃｅｌｌ　２２（１９８０）、８１７）をｔｋ－細胞、ｈｇｐｒｔ－細胞又はａｐｒｔ－細胞においてそれぞれ用いることができる。また、代謝拮抗物質抵抗性を下記の遺伝子のための選択の基礎として使用することができる：ｄｈｆｒ、これはメトトレキサートに対する抵抗性を与える（Ｗｉｇｌｅｒ他、Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７（１９８０）、３５７；Ｏ’Ｈａｒｅ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８（１９８１）、１５２７）；ｇｐｔ、これはミコフェノール酸に対する抵抗性を与える（Ｍｕｌｌｉｇａｎ＆Ｂｅｒｇ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８（１９８１）、２０７２）；ｎｅｏ、これはアミノグリコシドＧ－４１８に対する抵抗性を与える（Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌ他、Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２（１９９３）、４８８～５０５；Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕ、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　３（１９９１）、８７～９５；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２（１９９３）、５７３～５９６；Ｍｕｌｌｉｇａｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０（１９９３）、９２６～９３２；ならびに、Ｍｏｒｇａｎ　ａｎｄ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２（１９９３）、１９１～２１７；ＴＩＢ　ＴＥＣＨ　１１（１９９３）、１５５～２１５）；及び、ｈｙｇｒｏ、これはヒグロマイシンに対する抵抗性を与える（Ｓａｎｔｅｒｒｅ他、Ｇｅｎｅ　３０（１９８４）、１４７）。使用することができる、組換えＤＮＡ

技術の技術分野において一般に知られている様々な方法が、Ａｕｓｕｂｅｌ他（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ、Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ（１９９０）に記載させ、また、第１２章及び第１３章、Ｄｒａｃｏｐｏｌｉ他（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ他、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１（１９８１）に記載される（これらはその全体において参照によって本明細書中に組み込まれる）。

【０２５０】

抗体分子の発現レベルをベクター増幅によって増大させることができる（総説については、Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｈｅｎｔｓｃｈｅｌ、Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｖｅｃｔｏｒｓ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｇｅｎｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｃｌｏｎｅｄ ｇｅｎｅｓ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ＤＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、第３巻（１９８７）を参照のこと）。抗体を発現させるベクター系におけるマーカーが増幅可能であるときには、宿主細胞の培養において存在する阻害剤のレベルにおける増大はマーカー遺伝子のコピー数を増大させるであろう。増幅された領域は抗体遺伝子に付随するので、抗体の産生もまた増大するであろう（Ｃｒｏｕｓｅ他、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３（１９８３）、２５７を参照のこと）。

【０２５１】

インビトロ産生では、スケールアップにより、多量の所望されるポリペプチドを与えることが可能である。組織培養条件のもとでの哺乳動物細胞培養のための様々な技術がこの技術分野において知られており、これらには、均一懸濁培養、例えば、エアーリフト型リアクター又は連続撹拌槽リアクターにおける培養、あるいは、固定化細胞又は包括化細胞の培養、例えば、中空繊維、マイクロカプセル、アガロースマイクロビーズ又はセラミックカートリッジにおける培養が含まれる。必要及び／又は所望されるならば、ポリペプチドの溶液を、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的な生合成の後で、あるいは、本明細書中に記載されるＨＩＣクロマトグラフィー工程の前又は後で、慣例的なクロマトグラフィー方法、例えば、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ＤＥＡＥ－セルロースでのクロマトグラフィー、又は、（免疫）アフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。

【０２５２】

本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体をコードする遺伝子はまた、哺乳動物以外の細胞、例えば、細菌細胞又は昆虫細胞又は酵母細胞又は植物細胞において発現させることができる。核酸を容易に取り込む細菌には、腸内細菌科のメンバー、例えば、大腸菌又はサルモネラ属の菌株など；バチルス科、例えば、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）など；肺炎球菌（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ）；連鎖球菌属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）及びインフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）が含まれる。細菌において発現させられるとき、異種ポリペプチドは典型的には封入体の一部となることがさらに理解されるであろう。異種ポリペプチドは単離され、精製され、その後、機能的な分子に組み立てられなければならない。四価形態の抗体が所望される場合、そのサブユニットは四価抗体に自己集合するであろう（例えば、国際特許出願公開ＷＯ０２／０９６９４８を参照のこと）。

【０２５３】

細菌系において、多数の発現ベクターが、抗体分子が発現されるための意図される使用に依存して、都合よく選択される場合がある。例えば、多量のそのようなタンパク質が抗体分子の医薬組成物の作製のために産生させられることになるときには、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を導くベクターが望ましい場合がある。そのようなベクターには、Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターｐＵＲ２７８（Ｒｕｔｈｅｒ他、ＥＭＢＯ

Ｊ．２（１９８３）、１７９１）（この場合、抗体コード配列がｌａｃＺコード領域とインフレームでベクターに個々に連結され、その結果、融合タンパク質が産生されるようにされる場合がある）；ｐＩＮベクター（Ｉｎｏｕｙｅ＆Ｉｎｏｕｙｅ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３（１９８５）、３１０１～３１０９；Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ＆Ｓｃｈｕｓｔｅｒ、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４（１９８９）、５５０３～５５０９）などが含まれるが、これらに限定されない。ｐＧＥＸベクターもまた、外来ポリペプチドをグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として発現させるために使用される場合がある。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン－アガロースビーズのマトリックスへの吸着及び結合、その後の遊離したグルタチオンの存在下での溶出によって溶解細胞から容易に精製することができる。ｐＧＥＸベクターは、トロンビン又は第Ｘａ因子のプロテアーゼ切断部位を含み、その結果、クローン化された標的遺伝子産物がＧＳＴ成分から放出され得るように設計される。

【０２５４】

原核生物に加えて、真核生物の微生物もまた使用される場合がある。サッカロミセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、すなわち、普通のパン酵母が、真核生物の微生物の中で最も一般に使用されるが、多くの他の菌株が一般に利用可能である（例えば、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ））。サッカロミセス属における発現のために、例えば、プラスミドＹＲｐ７（Ｓｔｉｎｃｈｃｏｍｂ他、Ｎａｔｕｒｅ ２８２（１９７９）、３９；Ｋｉｎｇｓｍａｎ他、Ｇｅｎｅ ７（１９７９）、１４１；Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒ他、Ｇｅｎｅ １０（１９８０）、１５７）が一般に使用される。このプラスミドは、トリプトファン中で成長する能力を欠く酵母の変異菌株（例えば、ＡＴＣＣ第４４０７６号又はＰＥＰ４－１（Ｊｏｎｅｓ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ８５（１９７７）、１２））のための選択マーカーを提供するＴＲＰ１遺伝子を既に含有する。その場合、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのｔｒｐ１損傷の存在により、形質転換をトリプトファンの不在下での成長によって検出するための効果的な環境が提供される。

【０２５５】

昆虫系において、オートグラファ・カリフォルニカ（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）が典型的には、外来タンパク質を発現させるためのベクターとして使用される。このウイルスはヨトウガ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞において成長する。抗体コード配列がウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）の中に個々にクローン化され、ＡｃＮＰＶプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置かれる場合がある。

【０２５６】

本発明の抗体分子が組換え発現させられると、本発明の完全な抗体、それらのダイマー、個々の軽鎖及び重鎖又は他の免疫グロブリン形態を、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、特に、プロテインＡの後での特異的抗原についてのアフィニティー、及び、サイズ分画カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、示差的溶解度（例えば、硫酸アンモニウム沈澱）、又は、タンパク質の精製のためのいずれかの他の標準的な技術によることを含めて、この技術分野の標準的な手順に従って精製することができる（例えば、Ｓｃｏｐｅｓ、「Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ」、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ、Ｎ．Ｙ．（１９８２）を参照のこと）。代替では、本発明の抗体の親和性を増大させるための好ましい方法が米国特許出願公開第２００２－０１２３０５７号Ａ１に開示される。したがって、１つの実施形態において、本発明はまた、抗ＦＡＰ抗体又はその生物工学若しくは合成誘導体、或いはそれらの免疫グロブリン鎖を調製するための方法であって、

（ａ）本明細書中上記で定義されるようなポリヌクレオチド又はベクターを含む本明細書中上記で定義されるような宿主細胞を培養すること、及び

（ｂ）前記抗体又はその免疫グロブリン鎖を培養物から単離すること

を含む方法を提供する。

【０２５７】
さらには、本発明は１つの実施形態として、本明細書中上記で定義されるようなポリヌクレオチドによってコードされる抗体又はその免疫グロブリン鎖、あるいは、抗ＦＡＰ抗体を調製するための前記方法によって得ることができる抗体又はその免疫グロブリン鎖に関連する。
【０２５８】
Ｖ．融合タンパク質及びコンジュゲート
特定の実施形態において、抗体ポリペプチドは、通常の場合には抗体に付随しないアミノ酸配列あるいは１つ又は複数の成分を含む。例示的な改変が下記においてより詳細に記載される。例えば、本発明の単鎖Ｆｖ抗体フラグメントは柔軟なリンカー配列を含む場合があり、又は、機能的成分（例えば、ＰＥＧ、薬物、毒素又は標識（例えば、蛍光性、放射性、酵素、核磁気性及び重金属など））を付加するために改変される場合がある。
【０２５９】
本発明の抗体ポリペプチドは融合タンパク質を含む場合があり、融合タンパク質から本質的になる場合があり、又は、融合タンパク質からなる場合がある。融合タンパク質は、例えば、少なくとも１つの標的結合部位を伴う免疫グロブリンのＦＡＰ結合ドメインと、少なくとも１つの異種部分、すなわち、自然界では生来的に連結されない部分とを含むキメラ分子である。これらのアミノ酸配列は、融合ポリペプチドにおいて一緒にされる別個のタンパク質において正常に存在する場合があり、又は、同じタンパク質において正常に存在する場合があるが、融合ポリペプチドにおいては新しい配置で置かれる。融合タンパク質が、例えば、化学合成によって、又は、ペプチド領域が所望の関係でコードされるポリヌクレオチドを作出し、翻訳することによって作出される場合がある。
【０２６０】
用語「異種（の）」は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドに適用される場合、当該ポリヌクレオチド又はポリペプチドが、比較されている実体の残部のものとは異なる実体に由来することを意味する。例えば、本明細書中で使用されるように、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又はアナログに融合されるための“異種ポリペプチド”は、同じ種の非免疫グロブリンポリペプチド、あるいは、異なる種の免疫グロブリンポリペプチド又は非免疫グロブリンポリペプチドに由来する。本明細書中の他のところでより詳細に議論されるように、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体はさらに、Ｎ末端又はＣ末端において異種ポリペプチドに組換え融合される場合があり、あるいは、ポリペプチド又は他の組成物に化学的にコンジュゲート化される場合がある（共有結合によるコンジュゲート化及び非共有結合によるコンジュゲート化を含む）。例えば、抗体が、検出アッセイにおいて標識として有用である分子に、また、エフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種又は毒素など）に組換え融合されるか、又はコンジュゲート化される場合がある（例えば、国際特許出願公開ＷＯ９２／０８４９５、ＷＯ９１／１４４３８、ＷＯ８９／１２６２４、米国特許第５，３１４，９９５号及び欧州特許出願ＥＰ０３９６３８７を参照のこと）。
【０２６１】
本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、ペプチド結合又は修飾型ペプチド結合（すなわち、ペプチドアイソスター）によって互いにつながれるアミノ酸から構成されることが可能であり、また、遺伝子によりコードされる２０個のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有する場合がある。抗体は、天然のプロセス（例えば、翻訳後プロセシングなど）によって、又は、この技術分野ではよく知られている化学的修飾技術によって改変される場合がある。そのような修飾が、基礎的な教本において、また、より詳しいモノグラフにおいて、ならびに、膨大な数の研究文献において十分に記載されている。修飾を、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖及びアミノ末端又はカルボキシル末端を含めて、抗体においてどこにでも、あるいは、炭水化物などの成分に対して行うことができる。同じタイプの修飾が、所与の抗体において、いくつかの部位において同じ程度又は種々の程度で存在する場合があることが理解されるであろう。また、所与の抗体が多くのタ

イプの修飾を含有する場合がある。抗体は、例えば、ユビキチン化の結果として分岐する場合があり、また、分岐を伴って、又は伴うことなく、環状である場合がある。環状の抗体、分岐した抗体、及び、分岐した環状の抗体が、翻訳後の天然のプロセスから生じる場合があり、又は、合成的方法によって作製される場合がある。修飾には、アセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合連結、ヘム成分の共有結合連結、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合連結、脂質又は脂質誘導体の共有結合連結、ホスファチジルイノシトールの共有結合連結、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、ガンマ－カルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解的プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化（ｓｅｌｅｎｏｙｌａｔｉｏｎ）、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸の転移ＲＮＡ媒介付加（例えば、アルギニル化など）、及び、ユビキチン化が含まれる（例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ－Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、第２版（１９９３）；Ｐｏｓｔｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｖａｌｅｎｔ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、Ｂ．Ｃ．Ｊｏｈｎｓｏｎ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１頁～１２頁（１９８３）；Ｓｅｉｆｔｅｒ他、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２（１９９０）、６２６～６４６；Ｒａｔｔａｎ他、Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６３（１９９２）、４８～６２を参照のこと）。

【０２６２】

本発明はまた、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体と、異種ポリペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。１つの実施形態において、本発明の融合タンパク質は、本発明の抗体のV_H領域のいずれか１つ又は複数のアミノ酸配列、あるいは、本発明の抗体のV_L領域又はそのフラグメントもしくは変異体のいずれか１つ又は複数のアミノ酸配列と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含むか、あるいは、そのようなポリペプチドから本質的になるか、あるいは、そのようなポリペプチドからなる。別の実施形態において、本明細書中に開示される診断方法及び処置方法において使用されるための融合タンパク質は、抗体のV_H－ＣＤＲ又はそのフラグメント、変異体もしくは誘導体のいずれか１つ、２つ、３つのアミノ酸配列、あるいは、抗体のV_L－ＣＤＲ又はそのフラグメント、変異体もしくは誘導体のいずれか１つ、２つ、３つのアミノ酸配列と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含むか、あるいは、そのようなポリペプチドから本質的になるか、あるいは、そのようなポリペプチドからなる。１つの実施形態において、融合タンパク質は、本発明の抗体のV_H－ＣＤＲ３又はそのフラグメント、誘導体もしくは変異体のアミノ酸配列と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含み、そのような融合タンパク質はＦＡＰに特異的に結合する。別の実施形態において、融合タンパク質は、本発明の抗体の少なくとも１つのV_H領域のアミノ酸配列と、本発明の抗体の少なくとも１つのV_L領域又はそのフラグメント、誘導体もしくは変異体のアミノ酸配列と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含む。好ましくは、融合タンパク質のV_H領域及びV_L領域は、ＦＡＰと特異的に結合する単一供給源の抗体（あるいはｓｃＦｖフラグメント又はＦａｂフラグメント）に対応する。さらに別の実施形態において、本明細書中に開示される診断方法及び処置方法において使用されるための融合タンパク質は、抗体のV_HＣＤＲのいずれか１つ、２つ、３つ又はそれ以上のアミノ酸配列と、抗体のV_LＣＤＲ又はそのフラグメントもしくは変異体のいずれか１つ、２つ、３つまたそれ以上のアミノ酸配列と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含む。好ましくは、V_H－ＣＤＲ又はV_L－ＣＤＲの２つ、３つ、４つ、５つ、６つ又はそれ以上が、本発明の単一供給源の抗体（あるいはｓｃＦｖフラグメント又はＦａｂフラグメント）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子もまた本発明によって包含される。

【０２６３】

文献に報告される例示的な融合タンパク質には、下記の融合物が含まれる：Ｔ細胞受容体（Ｇａｓｃｏｉｇｎｅ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４（１９８７）、２９３６～２９４０）；ＣＤ４（Ｃａｐｏｎ他、Ｎａｔｕｒｅ　３３７（１９８９）、５２５～５３１；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ他、Ｎａｔｕｒｅ　３３９（１９８９）、６８～７０；Ｚｅｔｔｍｅｉｓｓｌ他、ＤＮＡ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．ＵＳＡ　９（１９９０）、３４７～３５３；及びＢｙｒｎ他、Ｎａｔｕｒｅ　３４４（１９９０）、６６７～６７０）；Ｌ－セレクチン（ホーミング受容体）（Ｗａｔｓｏｎ他、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１１０（１９９０）、２２２１～２２２９；及びＷａｔｓｏｎ他、Ｎａｔｕｒｅ　３４９（１９９１）、１６４～１６７）；ＣＤ４４（Ａｒｕｆｆｏ他、Ｃｅｌｌ　６１（１９９０）、１３０３～１３１３）；ＣＤ２８及びＢ７（Ｌｉｎｓｌｅｙ他、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３（１９９１）、７２１～７３０）；ＣＴＬＡ－４（Ｌｉｓｌｅｙ他、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４（１９９１）、５６１～５６９）；ＣＤ２２（Ｓｔａｍｅｎｋｏｖｉｃ他、Ｃｅｌｌ　６６（１９９１）、１１３３～１１４４）；ＴＮＦ受容体（Ａｓｈｋｅｎａｚｉ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８（１９９１）、１０５３５～１０５３９；Ｌｅｓｓｌａｕｅｒ他、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７（１９９１）、２８８３～２８８６；及びＰｅｐｐｅｌ他、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４（１９９１）、１４８３～１４８９（１９９１））；ならびにＩｇＥ受容体α（Ｒｉｄｇｗａｙ　ａｎｄ　Ｇｏｒｍａｎ、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１１５（１９９１）、アブストラクト番号：１４４８）。

【０２６４】

本明細書中の他のところで議論されるように、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、ポリペプチドのインビボ半減期を増大させるために、又は、この技術分野において知られている方法を使用する免疫アッセイにおける使用のために異種ポリペプチドに融合される場合がある。例えば、１つの実施形態において、ＰＥＧを、本発明の抗体に、その半減期をインビボにおいて増大させるためにコンジュゲート化することができる（例えば、Ｌｅｏｎｇ他、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ、１６（２００１）、１０６～１１９；Ａｄｖ．ｉｎ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５４（２００２）、５３１；又はＷｅｉｒ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ　３０（２００２）、５１２を参照のこと）。

【０２６５】

そのうえ、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、マーカー配列（例えば、それらの精製又は検出を容易にするためのペプチドなど）に融合することができる。好ましい実施形態において、マーカーのアミノ酸配列は、多くのものが市販されているが、とりわけ、ヘキサ－ヒスチジンペプチド（ＨＩＳ）であり、例えば、ｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．、９２５９　Ｅｔｏｎ　Ａｖｅｎｕｅ、Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、Ｃａｌｉｆ．、９１３１１）において提供されるタグなどである。例えば、Ｇｅｎｔｚ他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６（１９８９）、８２１～８２４に記載されるように、ヘキサ－ヒスチジンは融合タンパク質の便利な精製をもたらす。精製のために有用である他のペプチドタグには、「ＨＡ」タグ（これは、インフルエンザの赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する）（Ｗｉｌｓｏｎ他、Ｃｅｌｌ　３７（１９８４）、７６７）、ＧＳＴ、ｃ－ｍｙｃ及び「ｆｌａｇ」タグが含まれるが、これらに限定されない（例えば、エピトープタグ化技術の総説については、Ｂｉｌｌ　Ｂｒｉｚｚａｒｄ、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４４（２００８）、６９３～６９５を、また本発明において使用可能である最も一般的なエピトープタグを列挙するその６９４頁における表１を参照のこと。これらの主題は、本明細書により明示的に、参照によって組み込まれる）。

【０２６６】

融合タンパク質を、この技術分野においてよく知られている方法を使用して調製することができる（例えば、米国特許第５，１１６，９６４号及び第５，２２５，５３８号を参照のこと）。融合が行われるまさにその部位が、融合タンパク質の分泌又は結合特性を最

適化するために経験的に選択される場合がある。融合タンパク質をコードするＤＮＡがその後、本明細書中上で記載されるように行われる発現のために宿主細胞にトランスフェクションされる。

【０２６７】

本発明の抗体は非コンンジュゲート化形態で使用される場合があり、あるいは、例えば、分子の治療的性質を改善するために、標的検出を容易にするために、又は、患者の画像化もしくは治療のために様々な分子の少なくとも１つにコンジュゲート化される場合がある。本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、精製が行われるときには精製前又は精製後のどちらでも標識化又はコンジュゲート化することができる。特に、本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的応答調節物質、医薬剤又はＰＥＧにコンジュゲート化される場合がある。

【０２６８】

従来の抗体を含む免疫毒素であるコンジュゲートがこの技術分野において幅広く記載されている。毒素が従来からのカップリング技術によって抗体にカップリングされる場合があり、又は、タンパク質毒素部分を含有する免疫毒素を融合タンパク質として作製することができる。本発明の抗体は、そのような免疫毒素を得るための対応する方法で使用することができる。そのような免疫毒素を例示するものが、Ｂｙｅｒｓ、Ｓｅｍｉｎａｒｓ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２（１９９１）、５９～７０、及び、Ｆａｎｇｅｒ、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １２（１９９１）、５１～５４によって記載される免疫毒素である。

【０２６９】

当業者は、コンジュゲートがまた、コンジュゲート化されるための選択された薬剤に依存して様々な技術を使用して組み立てられ得ることを理解するであろう。例えば、ビオチンとのコンジュゲートが、例えば、ＦＡＰ結合ポリペプチドをビオチンの活性化エステル（例えば、ビオチンＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルなど）と反応することによって調製される。同様に、蛍光性マーカーとのコンジュゲートがカップリング剤（例えば、本明細書中に列挙されるカップリング剤）の存在下で調製される場合があり、又は、イソチオシアン酸塩との反応によって、好ましくはイソチオシアン酸フルオレセインとの反応によって調製される場合がある。本発明の抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体のコンジュゲートが同様な様式で調製される。

【０２７０】

本発明はさらに、診断剤又は治療剤にコンジュゲート化される本発明の抗体、生物工学及び合成誘導体、あるいはそれらと同等なＦＡＰ結合剤を包含する。抗体を、例えば、ＦＡＰの存在を明らかにして、ＦＡＰに関連付づけられる疾患に罹る危険性を示すために、そのような疾患（すなわち、ＦＡＰの出現を示す、あるいは、ＦＡＰの上昇したレベルに関連づけられる疾患）の発症又は進行をモニターして、又は臨床検査手順の一部として、例えば、所与の処置療法及び／又は防止療法の効力を明らかにするために、診断的に使用することができる。したがって、１つの実施形態において、本発明は、検出可能に標識される抗体に関連する。さらには、１つの実施形態において、本発明は、薬物に結合させられる抗体に関連する。検出を、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体を検出可能な物質にカップリングすることによって容易にすることができる。検出可能な物質又は標識は一般に、酵素、重金属（好ましくは金）、色素（好ましくは蛍光性色素又は発光性色素）又は放射性標識である場合がある。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光性物質、発光性物質、生物発光性物質、放射性物質、様々な陽電子放出断層撮影法を使用する陽電子放出金属、及び、非放射性常磁性金属イオンが含まれる（本発明に従って診断剤として使用されるために抗体にコンジュゲート化することができる金属イオンについては、例えば、米国特許第４，７４１，９００号を参照のこと）。好適な酵素の例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；好適な補欠分子族複合体の例として、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンが挙げられる；好適な

蛍光性物質の例として、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリトリンが挙げられる；発光性物質の一例として、ルミノールが挙げられる；生物発光性物質の例として、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンが挙げられる；好適な放射性物質の例として、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ又は^{99}Ｔｃが挙げられる。したがって、１つの実施形態において、本発明は、検出可能な標識が、酵素、放射性同位体、蛍光団及び重金属からなる群から選択される検出可能に標識された抗体を提供する。ＦＡＰターゲッティングにおける更なる好適な放射性ラベル及び細胞毒素は当業者に公知である。例えば、国際出願ＷＯ　２０１１／０４０９７２を参照。

【０２７１】

抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体はまた、化学発光化合物にカップリングすることによって検出可能に標識することができる。化学発光標識された抗体の存在がその後、化学反応の経過の期間中に生じる発光の存在を検出することによって求められる。特に有用な化学発光性の標識用化合物の例が、ルミノール、イソルミノール、テロマティック（ｔｈｅｒｏｍａｔｉｃ）アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルである。抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体が検出可能に標識され得る方法の１つは、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体を酵素に連結し、連結された生成物を酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）において使用することによってである（Ｖｏｌｌｅｒ，Ａ．、「Ｔｈｅ Ｅｎｚｙｍｅ Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ）」、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｑｕａｒｔｅｒｌｙ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ、Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ、Ｍｄ．、Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｈｏｒｉｚｏｎｓ ２（１９７８）、１～７）；Ｖｏｌｌｅｒ他、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈｏｌ．３１（１９７８）、５０７～５２０；Ｂｕｔｌｅｒ、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．７３（１９８１）、４８２～５２３；Ｍａｇｇｉｏ，Ｅ．（編）、Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ、Ｆｌａ．（１９８０）；Ｉｓｈｉｋａｗａ，Ｅ．他（編）、Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ、Ｋｇａｋｕ Ｓｈｏｉｎ、Ｔｏｋｙｏ（１９８１））。酵素は、抗体に結合しているので、例えば、分光光度法的手段、蛍光定量法的手段又は目視的手段によって検出することができる化学的成分を生成するような様式で、適切な基質（好ましくは発色性基質）と反応するであろう。抗体を検出可能に標識するために使用することができる酵素には、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ－グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベーターガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限定されない。加えて、検出を、酵素のための発色性基質を用いる比色法によって達成することができる。検出はまた、類似して調製された標準物との比較における基質の酵素反応の程度の目視比較によって達成される場合がある。

【０２７２】

検出はまた、様々な他の免疫アッセイのいずれかを使用して達成される場合がある。例えば、抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体を放射能標識することによって、抗体を放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）の使用により検出することが可能である（例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｂ．、Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ（Ｍａｒｃｈ、１９８６）を参照のこと。これは参照によって本明細書中に組み込まれる）。放射性同位体を、ガンマカウンター、シンチレーションカウンター又はオートラジオグラフィー（これらに限定されない）を含む手段によって検出することがで

きる。抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体はまた、蛍光放射金属（例えば、ランタニド系列の^{152}Euなど）を使用して検出可能に標識することができる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）又はエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のような金属キレート化基を使用して抗体に結合させることができる。

【０２７３】

様々な成分を抗体あるいはその抗原結合フラグメント、変異体又は誘導体にコンジュゲート化するための技術がよく知られている；例えば、Ａｒｎｏｎ他、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｒｅｉｓｆｅｌｄ他（編）、２４３頁～５６頁、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．（１９８５）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ他、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（第２版）、Ｒｏｂｉｎｓｏｎ他（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．、６２３頁～５３頁（１９８７）；Ｔｈｏｒｐｅ、「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ‘８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｐｉｎｃｈｅｒａ他（編）、４７５頁～５０６頁（１９８５）；「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｂａｌｄｗｉｎ他（編）、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、３０３頁～１６頁（１９８５）、及び、Ｔｈｏｒｐｅ他、「Ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．、６２（１９８２）、１１９～１５８を参照のこと。述べられたように、特定の実施形態において、結合性分子、例えば、結合性ポリペプチド、例えば、抗体又はその免疫特異性フラグメントの安定性又は効力を高める成分をコンジュゲート化することができる。例えば、１つの実施形態において、ＰＥＧを、本発明の結合性分子に、その半減期をインビボにおいて増大させるためにコンジュゲート化することができる。Ｌｅｏｎｇ他、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ、１６（２００１）、１０６；Ａｄｖ．ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５４（２００２）、５３１；又は、Ｗｅｉｒ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ ３０（２００２）、５１２。

【０２７４】

ＶＩ．有用な組成物および方法

添付された実施例において明らかにされ、また、図に例示されるように、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、ＦＡＰとインビトロにおいて、また、信頼性のあるＦＡＰの非侵襲的かつ組織非存在の検出アッセイのために提供されるそのエピトープと選択的に結合することができる。さらに、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、ＦＡＰとインビボにおいて、ヒト血漿において、また、ＦＡＰの存在によって特徴づけられる疾患組織において、例えば、乳ガン組織、ガン腫、多発性骨髄腫組織など、ならびに、アテローム斑および閉塞性冠状動脈血栓において選択的に結合することができる。そのうえ、いくつかの実施形態において、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、ＦＡＰセリンプロテアーゼ活性に対する阻害作用を有しており、インビボにおいて生物学的に活性であり、これにより、様々な治療効果（例えば、血液凝固時間および動脈閉塞時間を延長すること）、ならびに、例えば、結腸直腸ガンに対する抗腫瘍効果を発揮する。これらのすべての性質のために、前節において記載される本発明の抗ＦＡＰ抗体およびその同等物は様々な診断適用および治療適用において有用となる。

【０２７５】

したがって、本発明は、本明細書中前記で定義されるような上述のＦＡＰ結合性分子（例えば、本発明の抗体またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体）、あるいは、本発

明のポリヌクレオチド、ベクター、細胞またはペプチドを含む組成物、および、その使用に関連する。１つの実施形態において、本発明の組成物は医薬組成物であり、かつ、医薬的に許容され得る担体をさらに含む。さらには、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の意図された使用に依存して、さらなる薬剤（例えば、抗腫瘍剤、インターロイキンまたはインターフェロンなど）を含む場合がある。増大したレベルのＦＡＰの出現を示す疾患または障害、あるいは、増大したレベルのＦＡＰに関連づけられる疾患または障害の処置における使用のために、さらなる薬剤が、小さい有機分子、抗ＦＡＰ抗体およびそれらの組合せからなる群から選択される場合がある。したがって、特定の好ましい実施形態において、本発明は、ＦＡＰに伴う疾患または障害の予防的処置および治療的処置、ＦＡＰに伴う疾患もしくは障害の進行またはＦＡＰ標的化処置に対する応答を対象においてモニターすること、あるいは、ＦＡＰに伴う疾患または障害を発症することについての対象の危険性を明らかにすることのための医薬組成物または診断組成物を調製するための、ＦＡＰ結合性分子（例えば、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント）の使用、あるいは、それらのいずれか１つの実質的に同じ結合特異性を有する結合性分子、本発明のポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞の使用に関連する。

【０２７６】

したがって、１つの実施形態において、本発明は、冒された組織および器官におけるＦＡＰの異常な発現によって特徴づけられる疾患または障害（例えば、ガン、血管系における疾患または障害など、上記もまた参照のこと）を処置する方法であって、その必要性のある対象に、本発明の上記のＦＡＰ結合性分子、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞またはペプチドのいずれか１つの治療効果的な量を投与することを含む方法に関連する。

【０２７７】

本発明のこの治療的アプローチの特定の利点の１つが、本発明の組換え抗体は、体細胞成熟、すなわち、抗体の可変領域の体細胞変化による、標的ＦＡＰ分子に対する高親和性結合における選択性および有効性に関しての最適化を既に首尾良く経ているヒトメモリーＢ細胞に由来するという事実にある。

【０２７８】

そのような細胞は生体内において、例えば、ヒト体内において、自己免疫学的反応又はアレルギー反応の意味で、関連した、又は他の生理学的なタンパク質又は細胞構造によって活性化されていないという認識はまた、臨床試験段階を首尾よく生き残るという相当に増大した可能性がこれにより意味されるので、非常に医学的に重要である。いわば、効率、許容性及び耐容性が、少なくとも１名のヒト対象において予防的抗体又は治療的抗体の前臨床開発及び臨床開発の前に既に実証されている。したがって、本発明のヒト由来抗ＦＡＰ抗体は、治療剤としてのその標的構造特異的効率と、副作用のその低下した可能性との両方により、成功のその臨床的可能性を著しく増大させることが予想され得る。

【０２７９】

本発明はまた、上記で記載された成分（例えば、本発明の抗ＦＡＰ抗体、その結合フラグメント、誘導体もしくは変異体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞および／またはペプチド）の１つまたは複数により満たされる１つまたは複数の容器を含む医薬用および診断用のそれぞれのパックまたはキットを提供する。そのような容器には、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府当局によって定められる形式での通知が伴い得る（ただし、そのような通知は、ヒト投与のための製造、使用または販売の当局による承認を反映する）。加えて、または代替において、キットは、適切な診断アッセイにおいて使用されるための試薬および／または説明書を含む。本発明の組成物、例えば、キットは、当然のことではあるが、ＦＡＰの存在が伴う疾患または障害の危険性評価、診断、防止および処置のために特に適しており、具体的には、ガン、アテローム性動脈硬化および凝固障害などの疾患および／または障害を含む、ＦＡＰ発現によって一般には特徴づけられる障害を処置するために適用可能である；上記を参照のこと。

【０２８０】

本発明の医薬組成物はこの技術分野においてよく知られている方法に従って配合することができる（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ（２０００）（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＩＳＢＮ０－６８３－３０６４７２）を参照のこと）。好適な医薬用キャリアの例がこの技術分野ではよく知られており、これらには、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルション（例えば、油／水エマルションなど）、様々なタイプの湿潤化剤、無菌溶液などが含まれる。そのようなキャリアを含む組成物を、よく知られている従来の方法によって配合することができる。これらの医薬組成物は好適な用量で対象に投与することができる。好適な組成物の投与が、種々の方法によって、例えば、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、局所的投与又は皮内投与あるいは脊髄送達又は脳送達によって行われる場合がある。エアロゾル配合物、例えば、鼻腔噴霧配合物などには、保存剤及び等張剤を伴う活性な薬剤の精製された水性溶液又は他の溶液が含まれる。そのような配合物は好ましくは、鼻腔粘膜と適合し得るｐＨ及び等張性状態に調節される。直腸投与又は膣投与のための配合物が、好適なキャリアを伴う坐薬として提示される場合がある。

【０２８１】

投薬計画が主治医及び臨床上の要因によって決定されるであろう。医療技術分野ではよく知られているように、どのような患者であれ、患者のための投薬量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与されるべき具体的な化合物、性別、投与時間及び投与経路、全身の健康状態、ならびに、同時に投与されている他の薬物を含めて、多くの要因に依存する。典型的な用量が、例えば、０．００１μｇ～１０００μｇの範囲（あるいは、この範囲における発現又は発現阻害のための核酸の範囲）であり得る；しかしながら、この例示的な範囲よりも少ない用量又は大きい用量が、とりわけ上述の要因を考慮して想定される。一般に、投薬量は、例えば、宿主体重の約０．０００１～１００ｍｇ／ｋｇの範囲が可能であり、より通常的には０．０１～５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．０２ｍｇ／ｋｇ、０．２５ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．７５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇなど）が可能である。例えば、投薬量は、１ｍｇ／ｋｇ体重又は１０ｍｇ／ｋｇ体重、あるいは、１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲内、好ましくは少なくとも１ｍｇ／ｋｇであり得る。上記範囲において中間的である用量もまた、本発明の範囲内で意図される。対象には、そのような用量を毎日、１日おきに、毎週、又は、経験的分析によって決定されるいずれかの他のスケジュールに従って投与することができる。例示的な処置は、例えば、少なくとも６ヶ月の長期間にわたる多数回の投薬での投与を伴う。さらなる例示的な処置計画は、２週間毎に１回、又は、１ヶ月に１回、又は、３ヶ月毎～６ヶ月毎に１回での投与を伴う。例示的な投薬スケジュールには、連続した毎日での１～１０ｍｇ／ｋｇ又は１５ｍｇ／ｋｇ、１日おきでの３０ｍｇ／ｋｇ、あるいは、毎週での６０ｍｇ／ｋｇが含まれる。一部の方法では、異なる結合特異性を有する２つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、そのような場合、投与されるそれぞれの抗体の投薬量が、示される範囲内である。進行を定期的な評価によってモニターすることができる。非経口投与のための調製物には、無菌の水性又は非水性の溶液、懸濁物及びエマルションが含まれる。非水性溶媒の例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油など）、及び、注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）が挙げられる。水性キャリアには、生理的食塩水及び緩衝媒体を含めて、水、アルコール性溶液／水溶液、エマルション又は懸濁物が含まれる。非経口用ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖及び塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル又は固定油が含まれる。静脈内用ビヒクルには、流体及び栄養補充液及び電解質補充液（例えば、リンゲルブドウ糖に基づくものなど）などが含まれる。保存剤及び他の添加剤もまた存在する場合がある（例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤及び不活性ガスなど）。さらには、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の意図された使用に依存して、さらなる薬剤（例えば、ドーパミン又は精神薬理学的薬物など）を含む場合がある。

【０２８２】

１つの実施形態において、本発明の抗体の組換えＦａｂフラグメント（ｒＦａｂ）及び単鎖フラグメント（ｓｃＦｖ）を使用することが有益である場合がある。これは、それらがより容易に細胞膜に浸透するかもしれないからである。エフェクター機能を欠く小さいＦａｂ及びｓｃＦｖの操作された抗体様式を使用することの認識された利点には、血液脳関門をより効率的に通過すること、及び、炎症性の副反応を誘発する危険性を最小限に抑えることが含まれる。さらには、ｓｃＦＶ及び単鎖ドメイン抗体は全長抗体の結合特異性を保持することのほかに、それらは単一遺伝子として発現させることができ、また、折り畳み、相互作用、修飾、又は、それらの標的の細胞内局在化の変化についての潜在的可能性が伴うが、細胞内抗体として哺乳動物細胞において細胞内に発現させることができる（総説については、例えば、Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍｅｓｓｅｒ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、１２（２００５）、３９４～４０１を参照のこと）。

【０２８３】

異なる取り組みにおいて、Ｍｕｌｌｅｒ他、Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．（２００５）、２３７～２４１は、抗体が、生細胞を傷づけることなく生細胞内に往復させられることを可能にすると言われる技術基盤（いわゆる「ＳｕｐｅｒＡｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」）を記載する。そのような細胞浸透抗体により、新しい診断範囲及び治療範囲が開拓される。用語「ＴｒａｎｓＭａｂｓ」がこれらの抗体のために案出されている。

【０２８４】

さらなる実施形態において、他のＦＡＰ標的化薬剤の共投与または逐次投与が望ましい場合がある。対象を処置するために使用することができる薬剤の例には、下記の薬剤が含まれるが、それらに限定されない：ＦＡＰ四量体を安定化する薬剤、例えば、タファミジスメグルミン、ジフルシナール（ｄｉｆｌｕｓｉｎａｌ）、ウルソデオキシコール酸を伴うドキシサイクリン（ｄｏｘｙｃｙｃｌｉｎ）など；抗炎症剤、例えば、ジフルシナール、コルチコステロイド類、２－（２，６－ジクロルアニリノ）フェニル酢酸（ジクロフェナク）、イソ－ブチルプロパノイックフェノール酸（ｉｓｏ－ｂｕｔｙｌ－ｐｒｏｐａｎｏｉｃ－ｐｈｅｎｏｌｉｃ ａｃｉｄ）（イブプロフェン）など；利尿剤、没食子酸エピガロカテキン、メルファラン塩酸塩、デキサメタゾン、ボルテゾミブ、ボルテゾミブ－メルファラン、ボルテゾミブ－デキサメタゾン、メルファラン－デキサメタゾン、ボルテゾミブ－メルファラン－デキサメタゾン；抗うつ剤、抗精神病薬、神経遮断剤、抗認知症薬（例えば、ＮＭＤＡ受容体アンタゴニストのメマンチン）、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤（例えば、ドネペジル，ＨＣｌ、リバスチグミン、ガランタミン）、グルタミン酸アンタゴニストおよび他の向知性剤血圧薬剤（例えば、ジヒドララジン、メチルドパ）、細胞増殖抑制剤、グルココルチコイド類、アンギオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）阻害剤；抗炎症剤、または、どのような組合せであれ、それらの組合せ。

【０２８５】

臨床臓器移植の後における臓器拒絶を処置または防止するために使用されることがある薬剤の例には、免疫系の弱化を引き起こす一群の薬剤、すなわち、例えば、カルシニューリン阻害剤（例えば、シクロスポリンおよびタクロリムスなど）などを含む免疫抑制剤、増殖の阻害剤、例えば、エベロリムスおよびシロリムス（ラパマイシン）を含むｍＴＯＲ阻害剤など、ならびに、代謝拮抗剤、例えば、アザチオプリン、ミコフェノラート、モフェチル／ＭＭＦおよびミコフェノール酸が含まれるが、それらに限定されず、また、コルチコステロイド類、例えば、コルチゾンおよびコルチゾールなど、ならびに、合成物質、例えば、プレドニソンまたはプレドニソロンなどを使用することができる。加えて、様々な抗体を使用することができる：例えば、抗ＩＬ２受容体モノクローナル抗体（例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブ）、ならびに、抗ＣＤ３モノクローナル抗体（例えば、ムロモナブ－ＣＤ３）、および、ポリクローナル組成物、例えば、抗胸腺細胞グロブリン（ＡＴＧ）など；ならびにグルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）受容体アゴニスト（例えば、Ｎｏｇｕｃｈｉ他、Ａｃｔａ Ｍｅｄ．Ｏｋａｙａｍａ、６０（２００６）、および、国際特許出願公開ＷＯ２０１２／０８８１５７を参照のこと）。さらに、さらなる薬

剤には、臓器移植後の感染症および他の副作用の予防および／または処置のための薬剤が含まれる場合があり、これらには、バルガンシクロビル、サイトメガリエ（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｉｅ）－免疫グロブリン、ガンシクロビル、アムホテリシンＢ、ピリメタミン、ラニチジン、ラミプリル、フロセミド、ベンズブロマロンが含まれる。したがって、１つの実施形態において、ＦＡＰアミロイドーシスを処置するために有用であり、かつ／あるいは、例えば、臨床肝臓移植の後における臓器拒絶を処置または防止することにおいて有用であるさらなる薬剤をさらに含む組成物が提供される。

【０２８６】

特定の好ましい実施形態において、本発明は、本明細書中上記で特徴づけられるようなＦＡＰに伴う疾患に罹患する、または、そのような疾患を発症する危険性がある患者の処置において使用するための治療剤（好ましくはＦＡＢ標的化薬剤）であって、患者の血液のサンプルのＦＡＰレベルが、健康な対象からのコントロールサンプルと比較して上昇しており、ＦＡＰレベルが、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列からなる、またはそのようなアミノ酸配列を含むＦＡＰのエピトープを検出することによって明らかにされることを特徴とする治療剤に関連する。好ましくは、患者は、下記でさらに記載されるような本発明の方法に従って診断されている。実際には、ＦＡＰ標的化薬剤による薬物療法、具体的には、抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２ならびにその生物工学誘導体および合成誘導体、同様にまた、それらに同等なＦＡＰ結合薬剤による薬物療法がほとんどの場合、エピトープ「５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５」を定量し、それにより、「薬物標的」ＦＡＰの量を特異的に測定し、したがって、薬物療法のための治療効果的な量を服用することを可能にする、実施例において例示される本発明の方法およびアッセイと組み合わされるであろう。

【０２８７】

治療効果的な用量又は量は、症状又は状態を改善するために十分である有効成分のそのような量を示す。そのような化合物の治療効力及び毒性を、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学手順によって、例えば、ED_{50}（集団の５０％において治療効果的な用量）及びLD_{50}（集団の５０％に対して致死的な用量）によって求めることができる。治療効果と毒性影響との間における用量比が治療指数であり、これはLD_{50}／ED_{50}の比率として表すことができる。

【０２８８】

前記から、本発明は、上記抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含むＦＡＰ結合性分子のどのような使用をも包含し、具体的には、上記で述べられるような、ＦＡＰに関連づけられる疾患又は障害の診断及び／又は処置のためのそのような分子のどのような使用をも包含することが明らかである。好ましくは、前記結合性分子は本発明の抗体である。加えて、本発明は、本明細書中前記で記載される述べられた抗体のいずれかの１つの様々な抗イディオタイプ抗体に関連する。これらは、抗原結合部位の近くにおいて抗体の可変領域に位置する特有の抗原性ペプチド配列に結合する抗体又は他の結合性分子であり、例えば、対象から得られるサンプルにおける抗ＦＡＰ抗体を検出するために有用である。１つの実施形態において、本発明は、ＦＡＰに関連づけられる疾患又は障害の予防的処置、治療的処置、ならびに／あるいは、ＦＡＰに関連づけられる疾患又は障害の進行又は処置に対する応答をモニターすることにおいて使用されるための、本明細書中上記において、また下記で定義されるような抗体、又は、前記抗体のいずれか１つの実質的に同じ結合特異性を有するＦＡＰ結合性分子、本明細書中で定義されるようなポリヌクレオチド、ベクター又は細胞、あるいは、それらのいずれか１つを含む医薬組成物又は診断組成物を提供する。

【０２８９】

別の実施形態において、本発明は、本発明の上記で記載されたＦＡＰ結合性分子、抗体、抗原結合フラグメント、ポリヌクレオチド、ベクターあるいは細胞のいずれか１つと、場合により、検出のための好適な手段（例えば、免疫又は核酸に基づく診断方法において従来から使用される試薬など）とを含む診断組成物に関連する。本発明の抗体は、例えば、抗体を液相において利用することができるか、又は、固相キャリアに結合させることが

できる免疫アッセイにおける使用のために適している。本発明の抗体を利用することができる免疫アッセイの例が、直接的様式又は間接的様式でのどちらであれ、競合的免疫アッセイ及び非競合的免疫アッセイである。そのような免疫アッセイの例が、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、サンドイッチアッセイ（イムノメトリックアッセイ）、フローサイトメトリーアッセイ及びウエスタンブロットアッセイである。本発明の抗原及び抗体は多くの異なるキャリアに結合させることができ、また、それらに特異的に結合する細胞を単離するために使用することができる。よく知られているキャリアの例には、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然セルロース及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及びマグネタイトが含まれる。キャリアの性質は本発明の目的のために可溶性又は不溶性のどちらでも可能である。多くの異なる標識及び標識化方法が当業者には知られている。本発明において使用することができる標識のタイプの例には、酵素、放射性同位体、コロイド状金属、蛍光性化合物、化学発光化合物及び生物発光化合物が含まれる（本明細書中上記で議論された実施形態もまた参照のこと）。

【０２９０】

さらなる実施形態によって、ＦＡＰ結合性分子はまた、特に、本発明の抗体はまた、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプル、リンパサンプル又はいずれかの他の体液サンプル（例えば、唾液サンプル又は尿サンプルなど）である場合がある体液サンプルを検査された個体から得ること、及び、体液サンプルを、抗体－抗原複合体の形成を可能にする条件のもとで本発明の抗体と接触させることによって、ＦＡＰ関連疾患又は障害を個体において診断するための方法において使用される場合がある。そのような複合体のレベルがその後、この技術分野において知られている方法によって求められ、コントロールサンプルにおいて形成されるレベルよりも有意に大きいレベルにより、疾患が、検査された個体において示される。同じ様式で、本発明の抗体が結合する特異的抗原もまた使用される場合がある。したがって、本発明は、結合性分子、例えば、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントを含むインビトロ免疫アッセイに関連する。好ましくは、ＦＡＰ結合性分子は抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２或いはその組換え、生物工学又は合成誘導体である。

【０２９１】

本発明のさらなる実施形態において、ＦＡＰ結合性分子、具体的には本発明の抗体はまた、個体における疾患または障害の診断を、皮膚、唾液腺、毛根、心臓、結腸、神経、皮下脂肪生検物、または、どのような罹患器官からでもその生検物であり得る生検物を検査された個体から得ることによって行うための方法において使用される場合がある。

【０２９２】

この関連において、本発明はまた、この目的のために具体的に設計される手段に関連する。例えば、抗体に基づくアレイが使用される場合があり、アレイには、例えば、ＦＡＰを特異的に認識する本発明の抗体又はその同等な抗原結合性分子が負荷される。マイクロアレイでの免疫アッセイの設計が、Ｋｕｓｎｅｚｏｗ他、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　５（２００６）、１６８１～１６９６において要約される。したがって、本発明はまた、本発明に従って特定されるＦＡＰ結合性分子が負荷されるマイクロアレイに関連する。

【０２９３】

１つの実施形態において、本発明は、ＦＡＰに関連づけられる疾患又は障害を対象において診断する方法であって、診断される対象から得られるサンプルにおけるＦＡＰの存在を、本発明の少なくとも１つの抗体、ＦＡＰ結合フラグメント、又は、それらのいずれか１つの実質的に同じ結合特異性を有するＦＡＰ結合性分子を用いて明らかにすることを含み、この場合、ＦＡＰの存在が、ＦＡＰ関連疾患を示すものであり、また、健常コントールのレベルとの比較において、ＦＡＰのレベルの増大が、前記対象のＦＡＰアミロイドーシスの進行について示すものである方法に関連する。

【０２９４】

診断されるべき対象は疾患について無症候性又は病状発現前である場合がある。好ましくは、コントロール対象は、上記で記載されるように、ＦＡＰに伴う疾患を有しており、ただし、この場合、ＦＡＰのレベルと、参照標準との間における類似性により、診断されるべき対象が、ＦＡＰ関連疾患を有すること、或いは、ＦＡＰ関連疾患を発症する危険性があることが示される。代替において、又は加えて、第２のコントロールとして、コントロール対象はＦＡＰ関連疾患を有しておらず、ただし、この場合、生理学的ＦＡＰのレベルと、参照標準との間における違いにより、診断されるべき対象が、ＦＡＰ関連疾患を有すること、或いは、ＦＡＰ関連疾患を発症する危険性があることが示される。好ましくは、診断されるべき対象と、コントロール対象とは、年齢が一致している。分析されるべきサンプルは、ＦＡＰを含有することが疑われる、どのような体液であってもよく、例えば、血液、血漿、血清、尿、腹腔液、唾液又は脳脊髄液（ＣＳＦ）である場合がある。

【０２９５】

ＦＡＰレベルが、例えば、ＦＡＰを、ウエスタンブロット、免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、蛍光活性化細胞分取（ＦＡＣＳ）、二次元ゲル電気泳動、質量分析法（ＭＳ）、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化－飛行時間型ＭＳ（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、表面増強レーザー脱離イオン化－飛行時間（ＳＥＬＤＩ－ＴＯＦ）、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）、多次元液体クロマトグラフィー（ＬＣ）それに続くタンデム質量分析（ＭＳ／ＭＳ）、及び、レーザーデンシトメトリーから選ばれる１つ又は複数の技術によって分析することを含む、この技術分野で知られている好適な方法のどれによって評価されてもよい。好ましくは、ＦＡＰの前記インビボ画像化は、シンチグラフィー、陽電子放射断層撮影法（ＰＥＴ）、単一光子放射型断層撮影法（ＳＰＥＣＴ）、近赤外（ＮＩＲ）光学的画像法又は磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を含む。

【０２９６】

特定の好ましい実施形態において、本発明は、対象が、ＦＡＰに伴う疾患に罹患しているかどうか、または、対象が、ＦＡＰ特異的な治療剤による処置に適するかどうかを診断するインビトロ方法であって、前記対象の体液（好ましくは血液）に由来するサンプルにおいてＦＡＰの存在を明らかにすることを含み、健康な対象からのコントロールサンプルにと比較したＦＡＰレベルの上昇が、前記疾患、および前記薬剤による前記処置のための可能性があることの指標となり、前記ＦＡＰレベルが、配列番号３０～配列番号３２のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはそのようなアミノ酸配列からなるＦＡＰのエピトープを検出することによって求められることを特徴とする、インビトロ方法に関連する。実施例１５において明らかにされ、また、図１７～図２０に例示されるように、ＦＡＰを体液において、具体的には血液においてアッセイするための新規なアッセイが、本発明の主題抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の新規なエピトープに基づいて開発されている。実施例１４に記載されるように、サンドイッチ型免疫アッセイ形式（＝サンドイッチ免疫アッセイまたはサンドイッチＥＬＩＳＡ）が特に好ましい。最も好ましくは、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２またはその生物工学誘導体もしくは合成誘導体が検出抗体として使用され、抗ＦＡＰ抗体Ｆ１９またはその誘導体が捕捉抗体として使用される。代替において、別の抗ＦＡＰ抗体（例えば、ラットモノクローナル抗ＦＡＰ抗体クローンのＤ８、Ｄ２８およびＤ４３など）が捕捉抗体として使用される場合がある。

【０２９７】

上記で示されるように、本発明の抗体、そのフラグメント及び、本発明の抗体及びそのフラグメントと同じ結合特異性の分子は、インビトロだけでなく、インビボにおいても同様に使用される場合があり、ただし、この場合、診断的適用のほかに、治療的適用が同様に実行される場合がある。したがって、１つの実施形態において、本発明はまた、ヒト又は動物の身体におけるＦＡＰのインビボ検出のための組成物、或いは、治療剤及び／又は診断剤をヒト又は動物の身体においてＦＡＰに対して標的化するための組成物を調製するための、本発明の抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含むＦＡＰ結合性分子に関連する。潜在的可能性のある治療剤及び／又は診断剤が、本明細書中上記で示されるような、ＦＡＰ

関連疾患の処置において有用である治療剤、並びに、潜在的可能性のある標識の非網羅的な列挙から選ばれる場合がある。インビボ画像化に関して、１つの好ましい実施形態において、本発明は、本発明の抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含む前記ＦＡＰ結合性分子を提供し、ただし、この場合、前記インビボ画像化が、シンチグラフィー、陽電子放射断層撮影法（ＰＥＴ）、単一光子放射型断層撮影法（ＳＰＥＣＴ）、近赤外（ＮＩＲ）光学的画像法又は磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を含む。さらなる実施形態において、本発明はまた、本発明の抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含む前記ＦＡＰ結合性分子、又は、上記で指定されるインビボ画像化方法のための組成物を調製するための前記分子を、本明細書中上記で定義されるような、対象におけるＦＡＰに関連づけられる疾患又は障害を診断する、或いはその進行をモニターする方法における使用のために提供する。

【０２９８】

ＶＩＩ．特異的なＦＡＰエピトープを有するペプチド

さらなる局面において、本発明は、本発明のいずれかの抗体（ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６）によって特異的に認識されるＦＡＰのエピトープを有するペプチドに関連する。好ましくは、そのようなペプチドは、上記抗体によって認識される独特の線状エピトープとして配列番号５～配列番号１２に示されるようなアミノ酸配列、または、１つもしくは複数のアミノ酸が置換され、欠失され、かつ／もしくは付加される改変配列を含み、あるいは、そのようなアミノ酸配列またはそのような改変配列からなり、このペプチドは本発明のいずれかの抗体によって認識され、好ましくは、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４またはＮＩ－２０６．１７Ａ６の抗体によって認識される。

【０２９９】

本発明の１つの実施形態において、そのようなペプチドは、対象におけるＦＡＰ種および／またはそのフラグメントに関連づけられる疾患または障害を診断するために、またはモニターするために使用される場合があり、そのような診断またはモニタリングは、前記対象の生物学的サンプルにおけるペプチドに結合する抗体の存在を明らかにする工程を含み、本発明の上記ペプチドを認識する抗体のレベルを測定すること、および、測定結果を、比較可能な年齢および性別の健康な対象において見出されるレベルに対して比較することによって前記対象におけるそのような疾患の診断のために使用される。

【０３００】

さらには、本発明のペプチドは、ヒトに由来する治療的に有用な抗体のエピトープを含有するので、そのようなペプチドは当然のことながら、抗原として、すなわち、免疫応答を対象において誘発させ、インビボでの本発明の抗体の産生を刺激するための免疫原として使用することができる。本発明のペプチドは、本明細書中上で記載されるように、アレイ、キットおよび組成物（例えば、ワクチンなど）においてそれぞれ配合される場合がある。これに関連して、本発明はまた、ＦＡＰ関連疾患を診断すること、またはその進行をモニターすることにおいて有用なキットであって、本発明の少なくとも１つの抗体または前記抗体のいずれか１つの実質的に同じ結合特異性を有するＦＡＰ結合性分子、本明細書中上でそれぞれ定義されるようなポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞および／またはペプチドを、必要な場合には使用のための試薬および／または説明書と一緒に含むキットに関連する。

【０３０１】

ＶＩＩＩ．製造品

本発明の別の局面において、上で記載される障害の処置、防止および／または診断のために有用である材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器、および、前記容器における、または前記容器に付随する標識または添付文書を含む。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、ＩＶ溶液バッグなどが含まれる。容器は、様々な材料から、例えば、ガラスまたはプラスチックなどから形成される場合がある。容器は、それ自

体が、状態の処置、防止および／または診断のためのものである組成物、あるいは、状態の処置、防止および／または診断のために効果的である別の組成物と組み合わされる組成物を収容し、また、無菌の出し入れ口を有する場合がある（例えば、容器は、皮下注射針によって突き刺すことができる栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルである場合がある）。組成物における少なくとも１つの活性な薬剤が本発明の抗体である。標識または添付文書により、組成物が、選ばれた状態を処置するために使用されることが示される。そのうえ、製造品は、（ａ）本発明の抗体を含む組成物が含有される第１の容器と、（ｂ）さらなる細胞傷害性薬剤または他の場合には治療剤を含む組成物が含有される第２の容器とを含む場合がある。本発明のこの実施形態における製造品はさらに、組成物が、特定の状態を処置するために使用され得ることを示す添付文書を含む場合がある。代替において、または加えて、製造品はさらに、医薬的に許容され得る緩衝剤（例えば、静菌性注射用水など）を含む第２（または第３）の容器を含む場合がある。

【０３０２】

これらの実施形態および他の実施形態が本発明の説明および実施例によって開示され、包含される。本発明に従って用いられるための材料、方法、使用法および化合物のいずれか１つに関するさらなる文献が、例えば、電子デバイスを使用して、公開されている図書館およびデータベースから検索される場合がある。例えば、公開されているデータベースの「Ｍｅｄｌｉｎｅ」が利用される場合がある（このデータベースは国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）および／または国立衛生研究所の国立医学図書館（ＮＬＭ．ＮＩＨ）によって提供される）。さらなるデータベースおよびウエブアドレスが、例えば、欧州バイオインフォマティクス研究所（ＥＢＩ）（これは欧州分子生物学研究所（ＥＭＢＬ）の一部である）のデータベースなどが当業者には知られており、これらもまた、インターネット検索エンジンを使用して得ることができる。バイオテクノロジーにおける特許情報、ならびに、遡及的検索および現在の認識のために有用な特許情報の関連原典の調査の概略が、Ｂｅｒｋｓ、ＴＩＢＴＥＣＨ　１２（１９９４）、３５２～３６４に示される。

【０３０３】

上記開示は本発明を概して記載する。別途言及されない限り、本明細書中で使用されるような用語には、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ、１９９７年、２０００年改訂及び２００３年再版、ＩＳＢＮ　０　１９　８５０６７３　２）において提供されるような定義が与えられる。いくつかの文書が本明細書の本文を通して引用される。完全な書誌的引用が請求項の直前において明細書の最後に見出される場合がある。すべての引用された参考文献（本出願明細書を通して引用されるような文献参照物、発行された特許、公開された特許出願、及び、製造者の仕様書、説明書などを含む）の内容が、本明細書により明示的に、参照によって組み込まれる；しかしながら、どのような文書であれ、引用される文書は実際に本発明に関して先行技術であることを何ら認めるものではない。より完全な理解を、例示のみの目的のために本明細書中に提供され、かつ、本発明の範囲を限定するために意図されない下記の具体的な実施例を参照することによって得ることができる。

【実施例】

【０３０４】

ＦＡＰを標的とするヒト由来抗体を、国際特許出願公開ＷＯ２００８／０８１００８に記載される方法を改変しつつ利用して特定した。具体的には、ＦＡＰを標的とするヒト由来抗体を、臨床的に選択されたドナーに由来するヒトメモリーＢ細胞レパートリーの補体のハイスループット分析によって特定した。直接に被覆された標的に対するＦＡＰ抗体スクリーニングのために、９６ウエルマイクロプレート（Ｃｏｓｔａｒ、Ｃｏｒｎｉｎｇ、米国）を、炭酸塩緩衝液（１５ｍＭ　$Ｎａ_2ＣＯ_3$、３５ｍＭ　$ＮａＨＣＯ_3$、ｐＨ９．４）において５μｇ／ｍｌの濃度に希釈される組換えヒトＦＡＰ（ｒＦＡＰ）、ｃＦＡＰ（下記ペプチドの混合物：３７８－ＨＹＩＫＤＴＶＥＮＡＩＱＩＴＳ－３９２、６２２－

ＧＷＳＹＧＧＹＶＳＳＬＡＬＡＳ－６３６および７２１－ＱＶＤＦＱＡＭＷＹＳＤＱＮＨＧＬ－７３６）またはＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｂｕｃｈｓ、スイス）により４℃で一晩被覆した。捕捉ＥＬＩＳＡのために、マイクロプレートを、ＰＢＳにおいて３μｇ／ｍｌの濃度に希釈されるマウス抗Ｈｉｓモノクローナル抗体（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）により被覆し、その後、プレートをブロッキング処理し、ｒＦＡＰまたはＢＳＡをＰＢＳにおいて２μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、捕捉されるためのプレートに加えた。その後、プレートをＰＢＳ－Ｔ（ｐＨ７．６）で洗浄し、非特異的な結合部位を、ＲＴで１時間、２％のＢＳＡを含有するＰＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０によりブロッキング処理した。Ｂ細胞馴化培地をメモリーＢ細胞培養プレートからＥＬＩＳＡプレートに移し、ＲＴで１時間インキュベーションした。ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ－Ｔで洗浄し、結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート化抗ヒト免疫グロブリンポリクローナル抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｎｅｗｍａｒｋｅｔ、英国）を使用して、その後、ＨＲＰ活性を標準的な比色アッセイで測定して求めた。培地に含有される抗体の結合が、ＢＳＡに対してではなく、ＦＡＰ（直接に被覆された、もしくは捕捉されたｒＦＡＰ、またはｃＦＡＰのどちらか）に対して示されているＢ細胞培養物のみを、抗体クローニングに供した。

【０３０５】

上記で特定された抗ＦＡＰ抗体の可変領域のアミノ酸配列をそれらのｍＲＮＡ配列に基づいて決定した；図１を参照のこと。簡単に記載すると、選択された不死化されていないメモリーＢ細胞培養物の生存Ｂ細胞を集めた。続いて、選択された抗ＦＡＰ抗体を産生する細胞からのｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡに変換し、抗体の可変領域をコードする配列をＰＣＲによって増幅し、プラスミドベクターにクローン化し、配列決定した。簡単に記載すると、ヒト免疫グロブリン生殖系列レパートリーのすべての配列ファミリーを表すプライマーの組合せを、リーダーペプチド、ＶセグメントおよびＪセグメントの増幅のために使用した。１回目の増幅を、５’末端におけるリーダーペプチド特異的プライマーと、３’末端における定常領域特異的プライマーとを使用して行った（Ｓｍｉｔｈ他、Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃ．４（２００９）、３７２～３８４）。重鎖およびカッパ軽鎖のために、２回目の増幅を、５’末端におけるＶセグメント特異的プライマーと、３’末端におけるＪセグメント特異的プライマーとを使用して行った。ラムダ軽鎖のために、２回目の増幅を、５’末端におけるＶセグメント特異的プライマーと、３’末端におけるＣ領域特異的プライマーとを使用して行った（Ｍａｒｋｓ他、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２（１９９１）、５８１～５９７；ｄｅ　Ｈａａｒｄ他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６（１９９９）、１８２１８～１８２３０）。

【０３０６】

所望の特異性を有する抗体クローンの特定を、完全な抗体を組換え発現させたときにＥＬＩＳＡでの再スクリーニングによって行った。完全なヒトＩｇＧ１抗体の組換え発現が、可変重鎖配列および可変軽鎖配列を、可変領域配列を５’末端において、リーダーペプチドをコードする配列により補い、かつ、３’末端において、適切な定常ドメインをコードする配列により補う発現ベクターに「正しい読み枠で」挿入したときに達成された。その目的を達成するために、プライマーは、抗体発現ベクターへの可変重鎖配列および可変軽鎖配列のクローニングを容易にするために設計される制限部位を含有した。重鎖免疫グロブリンを、免疫グロブリン重鎖のＲＴ－ＰＣＲ産物を、シグナルペプチドとヒト免疫グロブリンガンマ１またはマウス免疫グロブリンガンマ２ａの定常ドメインとを有する重鎖発現ベクターに読み枠を合わせて挿入することによって発現させた。カッパ軽鎖免疫グロブリンを、カッパ軽鎖のＲＴ－ＰＣＲ産物を、シグナルペプチドとヒトまたはマウスのカッパ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメインとを提供する軽鎖発現ベクターに読み枠を合わせて挿入することによって発現させた。ラムダ軽鎖免疫グロブリンを、ラムダ軽鎖のＲＴ－ＰＣＲ産物を、シグナルペプチドとヒトまたはマウスのラムダ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメインとを提供するラムダ軽鎖発現ベクターに読み枠を合わせて挿入することによって発現させた。

【０３０７】
機能的な組換えモノクローナル抗体を、Ｉｇ重鎖発現ベクターとカッパＩｇ軽鎖発現ベクターまたはラムダＩｇ軽鎖発現ベクターのＨＥＫ２９３細胞またはＣＨＯ細胞（あるいは、どのようなレシピエント細胞株であれ、ヒト起源またはマウス起源の他の適切なレシピエント細胞株）へのコトランスフェクションによって得た。組換えヒトモノクローナル抗体を続いて、標準的なプロテインＡカラム精製を使用して馴化培地から精製した。組換えヒトモノクローナル抗体を、一過性トランスフェクション細胞または安定的トランスフェクション細胞のどちらかを使用して無限の量で製造することができる。組換えヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株を、Ｉｇ発現ベクターをそのまま使用することによって、または、Ｉｇ可変領域を異なる発現ベクターに再クローニングすることによってそのどちらでも樹立することができる。誘導体、例えば、Ｆ（ａｂ）、Ｆ（ａｂ）２およびｓｃＦｖなどもまた、これらのＩｇ可変領域から作製することができる。
【０３０８】
フレームワーク領域および相補性決定領域をデータベース（例えば、Ａｂｙｓｉｓ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｙｓｉｓ／）など）において利用可能な参照抗体配列との比較によって決定し、これらの領域に、Ｋａｂａｔ番号表記スキーム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｓ／）を使用して注釈を付けた。フレームワーク領域（ＦＲ）および相補性決定領域（ＣＤＲ）を示すことを含む、主題抗体のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６の可変領域のアミノ酸配列が図１Ａ～図１Ｆに示される。
【０３０９】
実施例１：ＦＡＰ抗体の結合特異性
ＥＬＩＳＡアッセイを、ＦＡＰに対する本発明の例示的抗体の結合を確認するために、また、それらの５０％最大有効濃度（ＥＣ５０）を決定することができるようにするために様々な抗体濃度を用いて行った。例示的な組換えヒト抗体のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６について、９６ウエルマイクロプレート（Ｃｏｓｔａｒ、Ｃｏｒｎｉｎｇ、米国）を直接的ＥＬＩＳＡのために、炭酸塩のＥＬＩＳＡ被覆緩衝液（１５ｍＭ Na_2CO_3、３５ｍＭ $NaHCO_3$、ｐＨ９．４）において５μｇ／ｍｌの濃度に希釈されるＦＡＰ、３つのペプチドの混合物、またはＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｂｕｃｈｓ、スイス）により被覆した。捕捉ＥＬＩＳＡのために、マイクロプレートを、ＰＢＳにおいて３μｇ／ｍｌの濃度に希釈されるマウス抗Ｈｉｓモノクローナル抗体（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）により被覆し、その後、プレートをブロッキング処理し、ＦＡＰまたはＢＳＡをＰＢＳにおいて２μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、捕捉されるためのプレートに加えた。その後、抗体の結合効率を調べた。例示的なＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗体が、捕捉されたＦＡＰには特異的に強く結合し、直接に被覆されたＦＡＰにはそれほど効率的に結合していない。例示的なＮＩ－２０６．５９Ｂ４抗体が、捕捉されたＦＡＰに対して、また、直接に被覆されたＦＡＰに対して特異的に強く、かつ類似して結合する。結合がＢＳＡに対しては何ら認められなかった；図２Ａ～図２Ｄを参照のこと。
【０３１０】
EC_{50}値を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、米国）ソフトウエアを使用して非線形回帰によって推定した。組換えヒト由来抗体のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８およびＮＩ－２０６．１７Ａ６が、捕捉されたＦＡＰ（ｓＦＡＰ）に対して大きい親和性で結合し、EC_{50}がそれぞれ、０．０１４ｎＭ、０．０４４ｎＭ、３．３６ｎＭおよび５０．２ｎＭであった。ＮＩ－２０６．２２Ｆ７はｓＦＡＰに対する結合を何ら示さなかった。ＮＩ－２０６．１２Ｇ４のｓＦＡＰに対する結合は調べられなかった。組換えヒト由来抗体のＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およ

びＮＩ－２０６．１７Ａ６が、直接に被覆されたＦＡＰ（ＦＡＰ）に対して大きい親和性で結合し、$ＥＣ_{５０}$がそれぞれ、０．６１ｎＭ、０．０９６ｎＭ、０．３３ｎＭ、１．４ｎＭおよび１０．５ｎＭであった。ＮＩ－２０６．２２Ｆ７は、直接に被覆されたＦＡＰに対する結合を何ら示さなかった。組換えヒト由来抗体のＮＩ－２０６．２２Ｆ７が、直接に被覆されたＦＡＰペプチド混合物（ｃＦＡＰ）に対して大きい親和性で結合し、$ＥＣ_{５０}$が０．１２ｎＭであった。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６は、ｃＦＡＰに対する結合を何ら示さなかった；図２Ｅ参照のこと。

【０３１１】

実施例２：ＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合速度の決定

ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の結合速度を検討するために、組換えヒトＦＡＰ（ｒｈｕＦＡＰ、Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１０４６４－Ｈ０７Ｈ）をＧＬＣセンサーチップ（Ｂｉｏｒａｄ ＃１７６－５０１１）にアミノカップリングした（ただし、１つの流路が、さらなる参照表面を提供するために非修飾のままにされた）。このことを、それぞれの流路で使用される活性化試薬の濃度を変えることによって達成した。３つの活性化溶液を、０．４Ｍ ＥＤＣ＋０．１Ｍスルホ－ＮＨＳを含有するストック混合物の３倍連続希釈を使用して調製し、３６０秒間注入した。その後、カップリング緩衝液（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、３，４ｍＭ ＥＤＴＡ、０．００５％ Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ５．２）における２．５μｇ／ｍｌでのｒｈｕＦＡＰを２５μＬ／分で１０２０秒間カップリングさせた。過剰な反応性エステルを１Ｍエタノールアミン塩酸塩により６００秒間にわたってブロッキング処理した。これにより、７００ＲＵの最終的な固定化レベルに及ぶｒｈｕＦＡＰの均一なストリップがもたらされた。１６μｇ／ｍＬ（１０６．７ｎＭ）から始まるｒｈｕＦＡＰの５倍連続希釈物を６０μＬ／分で４００秒間にわたって注入した。単回注入により、完全な濃度系列が、６つのサンプルからなる一列を補い、かつ、応答データを二重参照するためのインライン・ブランクを提供するために緩衝液を使用して送達された。会合段階および解離段階を４００秒間および３６００秒間それぞれ測定した。固定化ｒｈｕＦＡＰを、それぞれの結合サイクルの後、１００μＬ／分で３０秒間、１．５Ｍグリシン（ｐＨ３）により再生させ、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２を、サイクル対サイクルの再現性を確認するために同じ実験の中で二連の注入で分析した；図３を参照のこと。

【０３１２】

実施例３：ＦＡＰ特異的抗体の結合エピトープの評価

例示的なＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗体の結合エピトープを決定するために、結合分析を、重複するペプチドを用いてＦＡＰの配列全体をマッピングして行った。抗体の結合能を、ニトロセルロースメンブラン（ＪＰＴ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｒｌｉｎ、ドイツ）にスポットされるこれらのペプチドに対して、かつ、ＨＲＰコンジュゲート化されたロバ抗ヒトＩｇＧ二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ ｉｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、Ｎｅｗｍａｒｋｅｔ、英国）を使用し、その後、ＨＲＰ活性の検出を行って調べた（図４Ａ）。簡単に記載すると、エピトープマッピングを、重複するペプチドのスキャンを使用して行った。ＦＡＰの配列全体を、１１アミノ酸の重なりが個々のペプチドの間にある合計で１８８個の線状の１５－ｍｅｒペプチドとして合成した。それらのペプチドをニトロセルロースメンブラン（ＪＰＴ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｒｌｉｎ、ドイツ）にスポットした。メンブランをメタノール中で５分間活性化し、その後、ＲＴで１０分間、ＴＢＳで洗浄した。非特異的な結合部位を、ＲＴで２時間、Ｒｏｔｉ（登録商標）－Ｂｌｏｃｋ（Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ ＧｍｂＨ＋Ｃｏ．ＫＧ、Ｋａｒｌｓｒｕｈｅ、ドイツ）によりブロッキング処理した。ヒト抗体（１μｇ／ｍｌ）を、ＲＴで３時間、Ｒｏｔｉ（登録商標）－Ｂｌｏｃｋにおいてインキュベーションした。一次抗体の結合を、ＨＲＰコンジュゲート化ロバ抗ヒトＩｇＧ二次抗体を使用して求めた。ブロットを、ＥＣＬおよびＩｍａｇｅＱｕａｎｔ３５０検出（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｏｔｅｌｆｉｎｇｅｎ、スイス）を使用して発色させ、評価した。

【０３１３】
抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２により、ＦＡＰにおける配列５２５－ＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰ－５３５に対応するスポット１３１およびスポット１３２（Ｇ列、１１番目および１２番目のスポット）が認識される；図４Ａを参照のこと。抗体ＮＩ－２０６．５９Ｂ４により、ＦＡＰにおける配列５３－ＳＹＫＴＦＦＰ－５９が認識される。抗体ＮＩ－２０６．２２Ｆ７により、ＦＡＰにおける配列３８１－ＫＤＴＶＥＮＡＩＱＩＴ－３９１が認識される。抗体ＮＩ－２０６．２７Ｅ８により、ＦＡＰにおける配列１６９－ＮＩＹＬＫＱＲ－１７５が認識される。抗体ＮＩ－２０６．１２Ｇ４により、ＦＡＰにおける配列４８１－ＴＤＱＥＩＫＩＬＥＥＮＫＥＬＥ－４９５が認識される。抗体ＮＩ－２０６．１７Ａ６により、ＦＡＰにおける配列７７－ＶＬＹＮＩＥＴＧＱＳＹ－８７が認識される。

【０３１４】
抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の最小エピトープ領域を決定するために、抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２のエピトープを包含する（Ｎ末端およびＣ末端からの）ペプチドを１アミノ酸ずつ連続して短縮化し（この場合、スポット２１が全長ペプチドに対応し、スポット２２～スポット３３が、Ｃ末端からの段階的な１アミノ酸短縮化形態に対応し、スポット３４～スポット４５が、Ｎ末端からの段階的な１アミノ酸短縮化形態に対応する）、合成し、ニトロセルロースメンブラン（ＪＰＴ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｒｌｉｎ、ドイツ）にスポットした。これらのスポットされたペプチドに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合を上記のように可視化した。抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、ＦＡＰにおける配列５２８－ＦＤＲＳＫ－５３２（配列番号３９）に対応するスポット２１～スポット２８およびスポット３４～スポット４１を認識する；図２６を参照のこと。

【０３１５】
ＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合のために不可欠なアミノ酸を決定するために、ＦＡＰの５２１－ＫＭＩＬＰＰＱＦＤＲＳＫＫＹＰＬＬＩＱ－５３９（配列番号３８）からのアミノ酸を１つずつ、不可欠なアミノ酸（すなわち、変異させたときにＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合の喪失を引き起こすアミノ酸）を決定するために、逐次的にアラニンに変異させた。単一アラニン変異の線状エピトープを有するこれらの線状ペプチド配列を合成し、ニトロセルロースメンブラン（ＪＰＴ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｒｌｉｎ、ドイツ）にスポットした。これらのスポットされたペプチドに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合を、上記の実施例に記載されるように可視化し、それにより、対応するＦＡＰペプチドがアラニン置換を５２９位および５３２位にそれぞれ含有した２つのスポット（スポット１０およびスポット１３）に対する結合の非存在が認められ、したがって、このことから、ＦＡＰのＤ－５２９およびＫ－５３２のアミノ酸がＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合のために不可欠であることが明らかにされた；図２７を参照のこと。

【０３１６】
実施例４：組換えヒトモノクローナル抗体がＦＡＰ酵素活性を阻害することができるかどうかの決定

黒色で、平底の標準的な９６ウエルＥＬＩＳＡプレートを、滅菌されたブロッキング緩衝液（リン酸塩緩衝化生理的食塩水（ＰＢＳ）における５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ））を使用して３７℃で１時間、ブロッキング処理した。ブロッキング緩衝液を除き、４０μＬの新鮮なブロッキング緩衝液、ＰＢＳにおける４０μＬの抗体、ＰＢＳにおける１０μＬの２０ｎＭの活性な組換えヒトＦＡＰ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１０４６４－Ｈ０７Ｈ）、および、ＰＢＳにおける１０μＬのＤＱ－ゼラチン（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｄ－１２０５４）により置き換えた。蛍光強度を、プレートをどの測定の前でも２０秒間穏やかに振とうしながら、４５分の総時間にわたって３分毎に４８５ｎＭの励起および５３０ｎＭの放射で測定した。活性割合を計算するために、定常状態での速度（Δ５３０ｎＭ放射／Δ時間）が、抗体のそれぞれの濃度で認められる速度によって除される。結果が図５に示される。

【０３１７】
実施例５：ｒｈｕＦＡＰ媒介ＰＥＰ（Ｚ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ）切断の競合阻害、非

競合阻害または不競合阻害の決定

黒色で、平底の標準的な９６ウエルＥＬＩＳＡプレートを、滅菌されたブロッキング緩衝液（リン酸塩緩衝化生理的食塩水（ＰＢＳ）における５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ））を使用して３７℃で１時間、ブロッキング処理した。１０μＬの組換えヒトＦＡＰ溶液（２２５ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．４）における０．４ｎＭ組換えヒトＦＡＰ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１０４６４－Ｈ０７Ｈ））をそれぞれのウエルに加えた。その後、ＰＢＳにおける示された濃度での８０μＬのＮＩ－２０６．８２Ｃ２をウエルに加え、３７℃で１時間インキュベーションした。その後、１０μＬの蛍光発生基質溶液（４０％のメタノールおよび６０％の２５ｎＭ　ＰＢＳ／１０ｎＭ　ＥＤＴＡにおけるＺ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ）をそれぞれのウエルに加えた。蛍光強度を２時間の総読み取り時間にわたって３分毎に３６０ｎＭの励起および４６０ｎＭの放射で測定した。結果が図６に示される。

【０３１８】

実施例６：ＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合特異性の決定

マウス抗６Ｘヒスチジンタグ抗体（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）をＰＢＳにおける３μｇ／ｍｌの濃度で９６ウエルＥＬＩＳＡプレートに被覆し、その後、プレートをＰＢＳにおける５％ＢＳＡによりブロッキング処理し、Ｎ末端の６Ｘヒスチジンタグを有する酵素活性な組換えヒトＦＡＰを、捕捉されるためのプレートに加えた。その後、ｓＦＡＰに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２の（２０ｎＭ、４ｎＭおよび０．８ｎＭでの）結合効率を、１時間のインキュベーション、その後、ＰＢＳによる洗浄、および、比色アッセイを使用するＨＲＰ標識化ヤギ抗ヒト抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）による検出によって調べた。他の標的と結合するＮＩ－２０６．８２Ｃ２を評価するために、組換えヒトＣＤ２６および１４個の他の無関係な組換えヒトタンパク質（Ａ～Ｎ）を個々に９６ウエルＥＬＩＳＡプレートに三連で加え、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２の結合効率を評価した（図７Ａ）。

【０３１９】

ＦＡＰに対する配列類似性を有するＳＢ９オリゴペプチダーゼファミリーの他のメンバーに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２の結合効率および阻害能を明らかにするために、間接的ＥＬＩＳＡアッセイおよび阻害アッセイを、活性な酵素標的に対して行った。このアッセイにおいて評価される活性な組換えヒト酵素には、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ；Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１０４６４－Ｈ０７Ｈ）、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰＩＶ、ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　８００４０）、ジペプチジルペプチダーゼ８（ＤＰＰ８、ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　８００８０）、ジペプチジルペプチダーゼ９（ＤＰＰ９、ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　８００８０）およびプロリルオリゴペプチダーゼ／プロリルエンドペプチダーゼ（ＰＯＰ／ＰＲＥＰ、ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　８０１０５）が含まれる。それぞれの組換えペプチダーゼを精製タグと一緒に発現させ、マウス抗ヒスチジン抗体（ＣｌｏｎｅＴｅｃｈ）またはマウス抗グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ、Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１１２１３－ＭＭ０２）タグ抗体のどちらかを使用して９６ウエルＥＬＩＳＡプレートに結合させた。それぞれの酵素が、酵素特異的な蛍光発生基質を使用して、結合することが確認され、ＥＬＩＳＡプレート上で活性なままであった。Ｈ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ（ＡＴＴ　Ｂｉｏｑｕｅｓｔ、１３４５０）を、ＤＰＰ４、ＤＰＰ９およびＤＰＰ８の存在および活性を確認するために使用した。Ｚ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ（ＢａＣｈｅｍ、Ｉ１１４５）を、ＦＡＰおよびＰＯＰ／ＰＲＥＰの活性を評価するために使用した。それぞれの酵素標的に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２の結合効率を明らかにするために、抗体をＨＲＰにより標識し、ＰＢＳにおける４００ｎＭ、１２６．５ｎＭ、４０．１ｎＭ、１２．７ｎＭ、４ｎＭ、１．３ｎＭ、０．４ｎＭ、０．１３ｎＭ、０．０４ｎＭ、０．０１３ｎＭ、０．００４ｎＭおよび０ｎＭの濃度で加えた。洗浄工程の後、結合した抗体を、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質を使用して検出した。反応を、２ＮのＨ$_2$ＳＯ$_4$を加えることによって１０分後に停止させ、光学密度における生じた

変化を、ＥＬＩＳＡプレートリーダーを使用して４５０ｎＭの吸光度で定量した（図７Ｂ）。

【０３２０】

抗体の阻害能を明らかにするために、黒色の９６ウエルプレートをブロッキング緩衝液により１時間にわたってブロッキング処理した。ＮＩ－２０６．８２Ｃ２を、ＰＢＳにおける１０００ｎＭ、５０ｎＭ、１０ｎＭ、３．０３ｎＭ、１．０１ｎＭ、０．０３１ｎＭ、０．００１ｎＭおよび０ｎＭの濃度で対応のウエルにピペット分注した。酵素を０．２ｎＭの濃度で加えた。最後に、蛍光発生基質をその後、ミカエリス定数（K_m）に等しい濃度でウエルに加え、基質切断速度を３６０ｎｍの励起および４６０ｎｍの放射での蛍光によって定量した。Ｈ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ（ＡＡＴ Ｂｉｏｑｕｅｓｔ、１３４５０）を、ＤＰＰ４、ＤＰＰ９およびＤＰＰ８のために使用した。Ｚ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－ＡＭＣ（ＢａＣｈｅｍ、Ｉ１１４５）を、ＰＯＰ／ＰＲＥＰの活性を評価するために使用した。ＦＡＰ活性を、ＤＱ－ゼラチン（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｄ１２０５４）を使用して評価し、切断を４９５ｎＭの励起および５１５ｎＭの放射で定量した。

【０３２１】

実施例７：以前に試験されたＦＡＰ阻害剤と比較した、活性な組換えヒトＦＡＰおよび活性な組換えマウスＦＡＰに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２阻害能の決定

活性な組換えヒトＦＡＰ（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１０４６４－Ｈ０７Ｈ）に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２の阻害能を明らかにするために、黒色の９６ウエルＥＬＩＳＡプレートを、滅菌された５％ＢＳＡ／ＰＢＳにより３７℃で１時間にわたってブロッキング処理した。ブロッキング溶液を除いた後、ＰＢＳにおける４０ｕＬの１２．５％ＢＳＡをそれぞれのウエルに加えた。その後、ＦＡＰ標的化薬剤（ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、Ｆ１９およびＶａｌ－Ｂｏｒｏ－Ｐｒｏ（ＰＴ－１００；Ｐｏｉｎｔ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ））を適切なウエルに、５００ｎＭ、１０ｎＭ、３．０３ｎＭ、１．０１ｎＭ、０．０３１ｎＭ、０．００１ｎＭおよび０ｎＭの最終濃度のために加えた。その後、１０ｕＬの活性な組換えヒトＦＡＰをウエルのすべてに、２０ｎＭの最終アッセイ濃度のために加えた。最後に、１０μＬのＤＱ－ゼラチン溶液をそれぞれのウエルに、６０μｇ／ｍＬの濃度のために加えた。その後、蛍光強度を、プレートをそれぞれの測定の前に２０分間穏やかに振とうしながら、４５分間にわたって３分毎に４８５ｎＭの励起および５３０ｎＭの放射で測定した。その後、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ６ソフトウエアを使用するとき、定常状態での速度を使用して、活性割合を、阻害剤が何ら与えられなかった定常状態濃度と比較したそれぞれの濃度で計算し、３パラメーター変数適合モデルに合わせて、IC_{50}（最大阻害の５０％が達成された濃度）を計算した（図８Ａ）。

【０３２２】

活性な組換えマウスＦＡＰに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２の阻害能を明らかにするために、組換えマウスＦＡＰを、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインならびにＮ末端の６Ｘヒスチジンタグを伴うことなく、ＨＥＫ２９３細胞株において発現させた。その後、９６ウエルＥＬＩＳＡプレートを、ＰＢＳにおける６μｇ／ｍＬでの５０ｕＬのマウス抗Ｈｉｓタグ抗体により４℃で一晩被覆した。その後、ウエルをＰＢＳにおける６０μＬの２％ＢＳＡにより室温で１時間にわたってブロッキング処理し、５０μＬの１：４希釈された組換えマウスＦＡＰ含有細胞培養上清をウエルに加え、穏やかに振とうしながら４℃で一晩インキュベーションした。ＰＢＳによる３回の洗浄工程の後、２０ｕＬの滅菌された１２．５％ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液をすべてのウエルに加えた。その後、ＦＡＰ標的化薬剤（ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、Ｆ１９およびＶａｌ－Ｂｏｒｏ－Ｐｒｏ（ＰＴ－１００；Ｐｏｉｎｔ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ））を適切なウエルに、５００ｎＭ、１０ｎＭ、３．０３ｎＭ、１．０１ｎＭ、０．０３１ｎＭ、０．００１ｎＭおよび０ｎＭの最終濃度のために加えた。最後に、ＰＢＳにおける５μＬのＤＱ－ゼラチン溶液をその後、２４μｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度のために加えた。その後、ＤＱゼラチンの切断を、プレートをそれぞれの測定の前に２０秒間穏やかに振とうしながら、６０分の総時間にわたって３分毎に４８５ｎＭの励起および５３０ｎＭの放射での蛍光強度によって測定した。Ｇｒａｐｈ

Ｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ６ソフトウエアを使用するとき、定常状態での速度を使用して、活性割合をそれぞれの濃度で計算し、３パラメーター変数モデル回帰を行って、ＩＣ５０（最大阻害の５０％が達成された濃度）を計算した（図８Ｂ）。

【０３２３】

実施例８：ヒトガン腫凍結切片に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合の共焦点免疫蛍光による決定

ＮＩ－２０６．８２Ｃ２を蛍光画像化のためにシアニン３により標識し（Ｃｙ３コンジュゲート化キット：Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、３４０－００３０）、抗体の標識化を、分光光度計を使用して確認した。ヒト浸潤性腺管ガン組織からの凍結切片（図９、Ａ）およびヒト浸潤性小葉ガンからの凍結切片（図９、Ｂ）を氷冷アセトンにおいて５分間にわって固定処理し、１０分間乾燥させ、その後、ＰＢＳで洗浄した。その後、切片をＰＢＳにおける５％ＢＳＡにおいて室温で１時間インキュベーションした。その後、組織切片を、シアニン３により事前に標識された抗体と４℃で一晩インキュベーションし、その後、ＰＢＳで３回洗浄し、その後、０．５μｇ／ｍＬでのＤＡＰＩとインキュベーションした。その後、切片をＰＢＳでさらに３回洗浄し、Ｌｉｓｂｅｔｈ封入剤での封入標本にし、その後、ＳＰ８共焦点顕微鏡（Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ）で画像化した。

【０３２４】

実施例９：ヒト乳ガン組織切片に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合の免疫組織化学による決定

ヒト乳ガン組織切片を室温で１０分間乾燥させ、その後、４％パラホルムアルダヒド（ｐａｒａｆｏｒｍａｌｄａｈｙｄｅ）において１５分間にわたって固定処理し、その後、ＰＢＳで３回、５分間洗浄した。その後、スライド片をＰＢＳにおける０．３％H_2O_2において５分間インキュベーションして、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロッキング処理し、続いて、ＰＢＳで３回、５分間洗浄した。その後、内因性ビオチンを、Ｂｉｏｔｉｎ－Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＤＡＫＯ　Ｘ０５９０）を使用してブロッキング処理し、その後、ＰＢＳによる数回の洗浄を行った。非特異的な抗体結合のブロッキング処理および組織切片の透過処理を、ブロッキング緩衝液（ＰＢＳにおける５％ヤギ血清、５％ウマ血清、０．３Ｍグリシン、５％ＢＳＡおよび０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ１００）を使用して行った。その後、組織切片を、マウス定常ドメインと、元の抗体のヒト可変ドメインとを伴うＮＩ－２０６．８２Ｃ２の組換え操作されたキメラ形態、および、一致させたアイソタイプコントロール（４３Ａ１１）を透過処理緩衝液において１０μｇ／ｍＬで用いて４℃で一晩染色した。３回のＰＢＳ洗浄工程の後、切片をビオチン化ヤギ抗マウス抗体と室温で１時間インキュベーションした。標的抗原を増幅するために、ＶＥＣＴＡＳＴＡＩＮ　ＡＢＣキット（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ）を使用し、その後、３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）により発色させ、マイヤーのヘマトキシリンブルーにより対比染色した。サンプルを微温の流水で１０分間洗浄し、水性封入剤での封入標本にし、その後、画像化を組織学スライドスキャナー（Ｚｅｉｓｓ　Ｍｉｒａｘ　ＭＩＤＩ）により行った。結果が図１０および図１１に示される。

【０３２５】

実施例１０：マウス結腸直腸ガン組織に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合の決定

ＮＩ－２０６．８２Ｃ２をシアニン５抗体標識化キット（Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、３４２－００１０）により事前に標識化し、抗体の標識化が十分であることを分光光度計により確認した。同系のＣＴ－２６肝臓転移物を含有するマウス肝臓の凍結切片を室温で３０分間乾燥させ、ＰＢＳにおける４％ホルマリンにおいて１０分間にわたって固定処理した。その後、スライド片を、ＰＢＳで５分間、３回洗浄し、ＰＢＳにおける５％ウシ血清アルブミンにより室温で１時間ブロッキング処理した。その後、スライド片を、０．５μｇ／ｍＬでのＤＡＰＩと、製造者の説明書に従うＡｌｅｘａ５４７ファロイジン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と、１０μｇ／ｍＬの濃度でのＣｙ５標識されたＮＩ－２０６．８２Ｃ２またはＣｙ５標識されたアイソタイプ一致コントロール抗体３Ａ１のど

ちらかとを、０．５％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ１００を含むブロッキング緩衝液において含有する染色溶液と４℃で一晩インキュベーションした。その後、スライド片をＰＢＳで３回洗浄し、Ｌｉｓｂｅｔｈ封入剤での封入標本にし、ＳＰ８共焦点顕微鏡（Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ）により画像化した。結果が図１２に示される。

【０３２６】

実施例１１：マウス多発性骨髄腫組織に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合の決定

ＢＡＬＢ／ｃマウスに、２×１０^{6}個のマウス多発性骨髄腫細胞株ＭＯＰＣ３１５．４を静脈内注入した。いくつかのＢＡＬＢ／ｃマウスには、ビヒクルのみのコントロールが注入された。骨組織を採取し、４％ＰＦＡにおいて固定処理し、１０％ＥＤＴＡ（ｐＨ７．４）において脱灰し、パラフィンに包埋し、その後、切片化し（４μｍ）、再水和した。その後、ＣＤ１３８　ｍＡｂ（クローン２８１－２、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）およびＣｙ５標識されたＮＩ－２０６．８２Ｃ２を使用して、ＭＯＰＣ３１５．ＢＭ．Ｌｕｃ細胞の浸潤、ならびに、組織切片におけるこれらの細胞および周囲の間質細胞に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合を特定した。その後、染色された組織切片を、蛍光顕微鏡を使用して画像化した（図１３）。

【０３２７】

実施例１２：ヒトアテローム斑および閉塞性冠状動脈血栓に対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合の共焦点免疫蛍光による決定

ＮＩ－２０６．８２Ｃ２を蛍光画像化のためにシアニン３により標識し（Ｃｙ３コンジュゲート化キット：Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、３４０－００３０）、抗体の標識化を、分光光度計を使用して確認した。閉塞性のヒト冠状動脈血栓を引き起こす心筋梗塞からの凍結切片（図１４Ａ）、および、ヒト大動脈アテローム斑からの凍結切片（図１４Ｂ）を、氷冷アセトンにおいて５分間にわたって固定処理し、１０分間乾燥させ、その後、ＰＢＳで洗浄した。その後、切片をＰＢＳにおける５％ＢＳＡにおいて室温で１時間インキュベーションし、その後、シアニン３標識化抗体と４℃で一晩インキュベーションし、その後、ＰＢＳで３回洗浄し、その後、０．５μｇ／ｍＬでのＤＡＰＩとインキュベーションした。その後、切片をＰＢＳでさらに３回洗浄し、Ｌｉｓｂｅｔｈ封入剤での封入標本にし、その後、ＳＰ８共焦点顕微鏡（Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ）で画像化した。

【０３２８】

実施例１３：回転式トロンボエラストメトリー（ＲＯＴＥＭ（商標））を使用する、血液凝固におけるＮＩ－２０６．８２Ｃ２の役割の決定

２回分の末梢血を一人の健康な対象からクエン酸ナトリウムチューブに採取し、血小板非含有血漿を遠心分離によって調製した。それぞれのチューブからの血漿をプールし、－８０℃での貯蔵のために直ちに小分けした。この血漿はＦＡＰレベルがＥＬＩＳＡによって１３０ｎｇ／ｍｌである。血漿サンプルを、滅菌された生理的食塩水で希釈されるＦＡＰに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２（ｎ＝３）または４３Ａ１１コントロール（ｎ＝３）により処理し、新鮮な迅速解凍血漿に加え、その結果、サンプルにおける抗体の最終濃度が、０．０００６６７ｎＭ、０．００６６７ｎＭ、０．０６６７ｎＭ、０．６６７ｎＭ、６．６６７ｎＭの血漿であるようにした。３７℃における抗体との１時間のインキュベーションの後、ＮＡＴＥＭ分析を、抗体との３７℃での１時間のインキュベーション時間の後での生来的な血液凝固プロセスを観察するためにＳＴＡＲ－ＴＥＭ試薬を測定開始前の抗体とともに使用することによって、製造者の説明書に従って行った。統計学的分析を、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して行った（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００５、＊＊＊＊ｐ＜０．００１）。結果が図１５に示される。

【０３２９】

実施例１４：ＮＩ－２０６．８２Ｃ２に基づく免疫沈殿を使用する、ヒト血漿からのＦＡＰクリアランスの決定

１００μＬのＰｕｒｅＰｒｏｔｅｏｍｅ　Ｇ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｂｅａｄｓ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＬＳＫＭＡＧＧ０２）を、２５ｍＭのＴＲＩＳ、０．１５ＭのＮａＣｌお

よび０．１％のＴｗｅｅｎ２０の５００μＬに懸濁した。ヒト血漿を１２５μＬの最終体積にＰＢＳにおいて１：５で希釈し、４つのチューブに分け、回転とともにＲＴで３０分間インキュベーションした。その後、ビーズを磁石スタンドにより集め、プレ除去処理された上清を、８２Ｃ２、４３Ａ１１または３Ａ１により被覆された磁石ビーズを含有する新しいチューブに移した。抗体コンジュゲート化ビーズを、回転を行いながら４℃で一晩、血漿希釈物とインキュベーションした。その後、ビーズを磁石スタンドにより集め、上清をα２ＡＰ－ＡＭＣ切断活性の分析のために取り出した。上清におけるα２ＡＰ－ＡＭＣ活性を明らかにするために、半分の領域が黒色である９６ウエルプレートを、無菌ろ過された５％ＢＳＡにより３７℃で１時間にわたってブロッキング処理した。その後、４０μＬのＰＢＳをすべてのウエルに加え、５μＬの上清溶液を適切なウエルに加え、５μＬのα２ＡＰ－ＡＭＣのメタノール溶液を１０μＭの最終アッセイ濃度のために加えた。蛍光強度（切断ＡＭＣ）を３０分の総時間にわたって３分毎に３６０ｎＭの励起および４６０ｎＭの放射で測定し、反応速度を、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ６ソフトウエアを使用して計算した。結果が図１６に示される。

【０３３０】

実施例１５：ＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗原のレベルを測定するためのサンドイッチＥＬＩＳＡの特徴づけ

ヒトサンプルにおけるＮＩ－２０６．８２Ｃ２抗原のレベルを定量するために、透明な９６ウエルプレートを、炭酸塩の被覆緩衝液における８μｇ／ｍＬでの３０μＬのＦ１９（ＣＲＬ－２７３３）により室温で２時間～４時間被覆した。被覆溶液を除き、プレートを、ＰＢＳブロッキング緩衝液における４０μＬの２％ＢＳＡにより室温で１時間にわたってブロッキング処理し、その後、捨てた。その後、３０ｕＬのサンプル溶液を加えた。サンプル溶液には、組換えヒトＦＡＰ標準物（図１７Ａ）、様々な希釈度でのヒト血清（図１７Ｂ）、ＦＡＰホモログ（図１７Ｃ）、健康な患者に由来する血清サンプル（図１８および図１９）、転移性結腸直腸ガンの患者に由来する血清サンプル（図１８）、心臓血管疾患の患者に由来する血清サンプル（図１９）、健康な患者に由来するクエン酸ナトリウム血漿サンプル（図２０）、および、症候性頸動脈アテローム斑を有する患者に由来するクエン酸ナトリウムサンプル（図２０）が含まれた。サンプル溶液を３０μＬの総体積で加えた。プレートを４０μＬのＰＢＳにより３回洗浄し、ドライブロッティングした。３０μＬのＨＲＰ標識された８２Ｃ２をすべてのウエルに加え、ＲＴで１時間インキュベーションした。その後、プレートを３×ＰＢＳにより３回、再び洗浄し、ドライブロッティングした。その後、３０μＬのＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）溶液をそれぞれのウエルに加え、室温で５分間～１０分間発色させた。その後、反応を、３０μＬの１Ｍ　Ｈ２ＳＯ４を加えることによって停止させ、４５０ｎＭでの吸光度をプレートリーダーにより読み取った。

【０３３１】

実施例１６：抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は動脈閉塞時間をマウス血栓症モデルにおいて延長することができる

頸動脈光化学的傷害誘発血栓症モデルが、ナトリウムペントバルビタール（８７ｍｇ／ｋｇ体重）の腹腔内注射による麻酔により開始される。尾の軽い加温（温水を使用する）の後、ローズベンガル（ＰＢＳにおける１０ｍｇ／ｍＬ）が０．１２ｍＬの体積で、５０ｍｇ／ｋｇの濃度で尾静脈に注入される。その後、マウスは、（頭部が術者の方を向いて）背臥位で固定され、解剖顕微鏡下において加熱パッドに置かれる（直腸温度がモニターされる）。（２．５ｃｍ～３ｃｍの）正中頸部切開と、気管瘻をもたらすための、鈍的調製による咽頭の小さい切開との後、右総頸動脈を露出させ、結合組織が除かれる。手術用縫合糸を用いて、胸鎖乳突筋を右側に寄せて固定し、右頸動脈へのアクセス領域を増大させる。手順中の過度な血管操作を避けるように注意しなければならない。先の曲がったピンセットを用いて、血管の下を（左側から）滑らせ、血管を優しく持ち上げ、その結果、プローブを血管の下および周囲に配置する。プローブは、アクセス領域により、プローブが近位にあることが可能となるほどに近位に設置され、また、その接続ワイヤがその後、

その位置を微調整するためにマイクロマニピュレーターで設置されなければならない（プローブは好ましくは、流れに対する抵抗を何ら生じさせないように血管にそろえなければならない）。少量の手術用超音波ゲルが、シグナル品質を増大させるためにプローブの上部に塗布されなければならない。ローズベンガル注入の６分以内に、レーザービームが頸動脈に向けられ、６ｃｍの固定された距離で６０分間保たれる。流れが、これらの６０分の期間中およびさらなる６０分間（１２０分の最大時間経過）、または閉塞が生じるまで測定される。閉塞が、０．１ｍｌ／分未満の一定（１分以上の）流れとして見なされる。マウスは、閉塞分析が完了した後直ちに、過量のペントバルビタール（２５ｍｇ）によって安楽死させられる。

【０３３２】

マウスは、体温の低下を避けるために加熱パッドに置かれる。心拍数（血流を測定するプローブはまた、心拍数を測定する）が手術期間中にモニターされる。麻酔の深さが、足の引込め反射によって手術開始前および実験中に調べられる（無外傷性鉗子の使用によって、動物の後肢が延ばされ、また、足の趾間水かきがしっかりと挟まれる；つま先を挟んだことに対する引込み反応が全くないならば、動物は、十分に深いと判断される）。

【０３３３】

麻酔のナトリウムペントバルビタールの選ばれた用量（８７ｍｇ／ｋｇ体重）は、動物を実験の全継続期間にわたって深い麻酔で保つために十分である。２回目の投薬は必要ない。リン酸塩緩衝化生理的食塩水（ｐＨ７）ビヒクルにおける２０ｍｇ／ｋｇのＮＩ－２０６．８２Ｃ２が、マウスを飽和させ、薬物動態学のどのような影響も打ち消すために予想される（Ｔａｂｒｉｚｉ他、Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｏｆ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｂａｓｅｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、第８章、２１８～２１９）。リン酸塩緩衝化生理的食塩水（ｐＨ７）単独が、ビヒクルのみのコントロールとして投与される。結果が図２１に示される。実際、本発明に従って行われた実験により、抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、光化学的傷害誘発動脈閉塞時間を生体マウスにおいてコントロール抗体４３Ａ１１（生物学的に不活性なアイソタイプ一致のコントロール抗体）と比較して延長させることによって立証されるように、血栓症を用量依存的様式でマウスにおいて軽減させることが明らかにされる。抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は、閉塞までのメジアン時間における用量依存的な増大をマウスにおいて示し、２ｍｇ／ｋｇの用量から始まる有意な増大、ならびに、７ｍｇ／ｋｇ超および２０ｍｇ／ｋｇでのさらなる増大が、コントロールとしてのＰＢＳおよび２０ｍｇ／ｋｇの一定用量での抗体４３Ａ１１と比較して認められる；図２３を参照のこと。

【０３３４】

実施例１７：抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２は同所性腫瘍成長を同系の結腸直腸ガンマウスモデルにおいて抑止することができる

ＣＪ５７／ＢＬ６マウスをイソフルオラン（ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）吸入によって麻酔し、肝門脈へのアクセスを（剣状突起から４ｃｍ尾方向への）正中開腹によって得た。マウスには１００万個のマウスＭＣ３８結腸直腸ガン細胞を注入した。これらの細胞の起源がＳｃｉｅｎｃｅ（１９８６年９月１９日）に記載される。ＭＣ－３８腫瘍を処置前の７日間にわたって形成させた。マウスを５回の処置サイクルについて７２時間毎にＰＢＳまたはＮＩ－２０６．８２Ｃ２（２０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内注射）のどちらかにより処置し、その後、イソフルオラン吸入によって麻酔した。小動物ＭＲＩ画像化を、Ｂｒｕｋｅｒ　４．７　Ｔｅｓｌａ　ＭＲＩを使用して行い、肝臓転移物の画像を取得した。腫瘍画像を、Ｍｙｒｉａｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｉｎｔｒａｓｅｎｓｅ）で分析して、腫瘍転移物および累積腫瘍直径総腫瘍負荷量を定量した。結果が図２２に示される。

【０３３５】

実施例１８：膜貫通ＦＡＰに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２結合はｐＨ依存的である

膜貫通型のヒトＦＡＰに対するＮＩ－２０６．８２Ｃ２の結合を評価するために、ＦＡＰを発現するＨＥＫ２９３細胞株を国立衛生研究所（Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）から受け取った。このＦＡＰ発現ＨＥＫ２９３細胞の作製が、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０１３（第

２１０巻、第６号）、１１２５～１１３５に記載される。
【０３３６】
ＨＥＫ２９３細胞を、全長のヒトＦＡＰのｃＤＮＡをコードするレトロウイルスにより形質導入した。クローニングを、Ｆａｓｔ Ｃｌｏｎｉｎｇ ＰａｃｋおよびＦａｓｔＤｉｇｅｓｔ制限酵素（ともにＦｅｒｍｅｎｔａｓから得られる）を使用して行った。一過性のレトロウイルス上清を、２９３ＧＰ細胞を、リポフェクタミン２０００（Ｉｎｖｉｔｏｇｅｎ）を使用してＦＡＰプラスミドによりトランスフェクションすることによって作製した。レトロウイルス上清をトランスフェクション後４８時間で集め、Ｒｅｔｒｏｎｅｃｔｉｎ被覆（１０μｇ／ｍｌ；Ｔａｋａｒａ）された組織培養非処理の６ウエルプレートに対して３２℃で２時間、２，０００Ｇで遠心分離した。その後、これらのレトロウイルス上清を使用して、ＨＥＫ２９３細胞の一晩の形質導入に供した。形質導入されたＦＡＰ－ＨＥＫ２９３細胞を１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８（ＣｅｌｌＧｒｏ）により選抜した。
【０３３７】
蛍光活性フローサイトメトリーのための蛍光標識化抗体を作製するために、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２と、アイソタイプ一致の生物学的に不活性なコントロール抗体４３Ａ１１とを、Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ－Ｌｉｎｋ Ｃｙ５ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）を製造者の説明書に従って使用して、Ｃｙａｎｉｎｅ Ｄｙｅ ５色素（Ｃｙ５）により標識化した。
【０３３８】
５００，０００個のＦＡＰ－ＨＥＫ２９３細胞を、３つの異なるｐＨ調節されたＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４、６．８および６．４）において４つの異なる抗体濃度（０．１ｎＭ、１ｎＭ、１０ｎＭおよび１００ｎＭ）でのＣｙ５標識ＮＩ－２０６．８２Ｃ２またはＣｙ５標識４３Ａ１１と４℃で１時間インキュベーションした。ＰＢＳ緩衝液を、ＭＥＳ一水和物（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して調節した。インキュベーション後、細胞を２００ｕＬの一致させたｐＨ調節ＰＢＳにより３回洗浄し、４００Ｇで４分間にわたって遠心分離し、２００μＬのｐＨ調節された緩衝液に再懸濁した。
【０３３９】
抗体結合を分析するために、蛍光活性化フローサイトメトリーを、Ｃｙ５チャネルの前方散乱、側方散乱および平均蛍光強度（ＭＦＩ）について、ＢＤ Ｆｏｒｔｅｓａ装置を使用して行い、６３３ｎＭのレーザー励起および６００／２０フィルターを使用して記録した。生細胞を前方散乱および側方散乱ならびに一重項／二重項排除によってゲート処理し、Ｃｙ５についてのＭＦＩを、ＦｌｏｗＪｏソフトウエア（バージョン１０．１）を使用して定量した。Ｃｙ５標識４３Ａ１１についてのＭＦＩシグナルをＣｙ５標識８２Ｃ２から差し引いて、ｐＨ７．４、６．８および６．４でのΔＭＦＩを計算し、これにより、ｐＨ７．４での条件と比較して、酸性条件のもとでの増大したパラトープ特異的な８２Ｃ２アビディティーが明らかにされた（図２４Ａ）。
【０３４０】
実施例１９：インビボでのＮＩ－２０６．８２Ｃ２の腫瘍関与
抗ＦＡＰ抗体ＮＩ－２０６．８２Ｃ２と、生物学的に不活性なアイソタイプ一致のコントロール抗体４３Ａ１１とを、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６８０ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｃｈｅｒ Ａ２０１８８）を製造者の説明書に従って使用してＡｌｅｘａ６８０色素により蛍光標識した。これらの抗体は、Ａ６８０－８２Ｃ２（Ａｌｅｘａ６８０標識された８２Ｃ２）およびＡ６８０－４３Ａ１１（Ａｌｅｘａ６８０標識された４３Ａ１１）と称される。
【０３４１】
マウスのガンモデルを、１００，０００個の培養された４Ｔ１乳腫瘍細胞をＢａｌｂ／ｃ免疫適格マウスの第２左乳房に同所性に注入することによって作製し、７日間成長させた。インビボ画像化の前に、動物を、入射光の最小限の吸光度および散乱のために剃毛し、脱毛して、柔毛を除いた。インビボ画像化を、Ｍａｅｓｔｒｏ５００画像化システム（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｃ、Ｗｏｂｕｒｎ、米国）を用いて行った

。Ａ６８０－８２Ｃ２の検出のために、６１５ｎｍから６６５ｎｍまでの帯域フィルターと、７００ｎｍ超の高域フィルターとを、励起光および放射光のためにそれぞれ使用し、蛍光を（１１℃に冷却された）ＣＣＤカメラによって検出した。一連の画像を異なる波長で取得し、その後、スペクトル分離（ｓｐｅｃｔｒａｌ　ｕｎｍｉｘｉｎｇ）（収集された光学スペクトルのデコンボリューション）に供した（これにより、組織の自己蛍光および他のスペクトル寄与からのＡｌｅｘａ６８０蛍光パターンの分離が可能となった）。

【０３４２】

４Ｔ１乳腫瘍を有するＢａｌｂ／ｃマウス（それぞれの群において３匹～４匹）に、その後、２ｍｇ／ｋｇのＡ６８０－８２Ｃ２またはＡ６８０－４３Ａ１１を接種後の７日目に注入した。全身マウス画像を下記の時点で取得した：抗体注入前、抗体注入直後、抗体注入後６時間、２４時間、４８時間および６日。その後、強度データを自己蛍光に対して正規化し、これら２つの群の間で比較した。抗体濃度が抗体注入後６時間から４８時間まで動物においてピークに達すること、そして、Ａ６８０－８２Ｃ２抗体は、コントロール抗体Ａ６８０－４３Ａ１１よりも有意に大きい腫瘍取り込みを有することが見出された。結果が図２５に示される。

【図１－１】

Fig. 1

【図１－２】

Fig. 1（続き）

【図２－１】

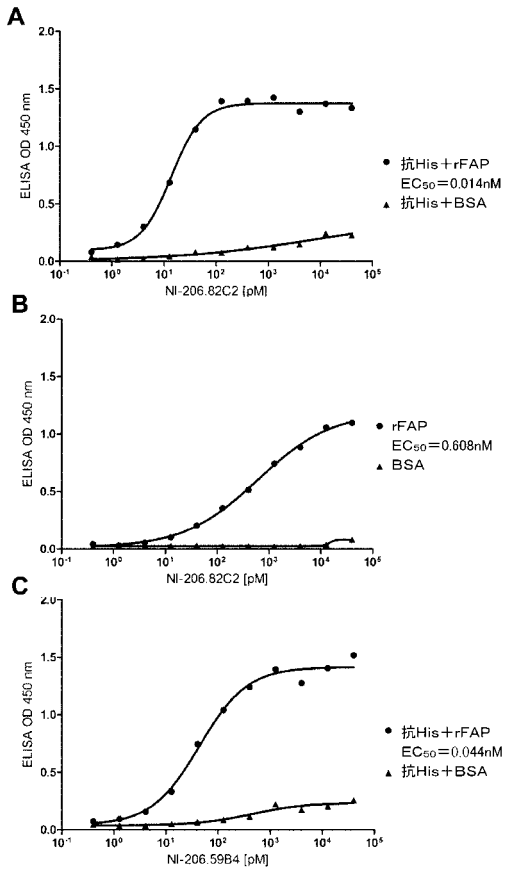
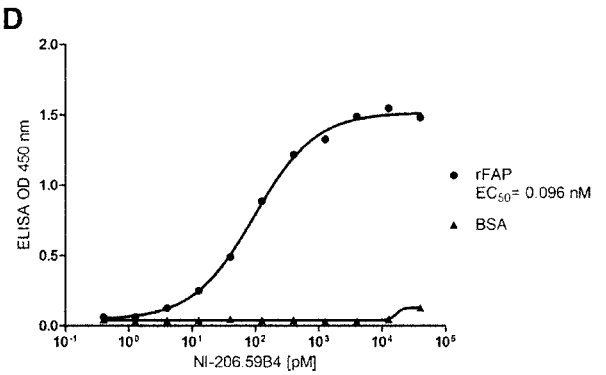


Fig. 2

【図２－２】



E

抗体	sFAP EC_{50} (nM)	FAP EC_{50} (nM)	cFAP EC_{50} (nM)
NI-206.82C2	0.014	0.61	N/A
NI-206.59B4	0.044	0.096	N/A
NI-206.22F7	N/A	N/A	0.12
NI-206.27E8	3.36	0.33	N/A
NI-206.12G4		1.4	N/A
NI-206.17A6	50.2	10.5	N/A

Fig. 2（続き）

【図３】

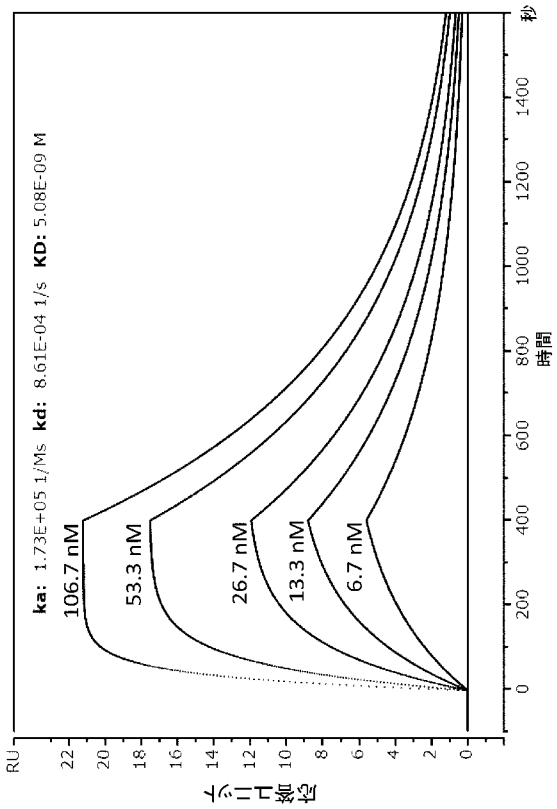
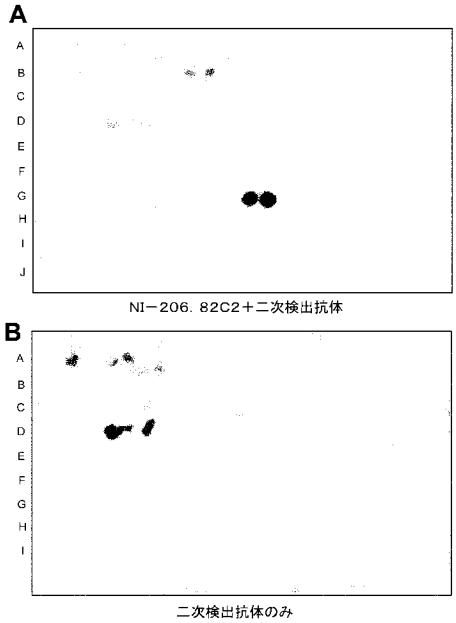


Fig. 3

【図４】

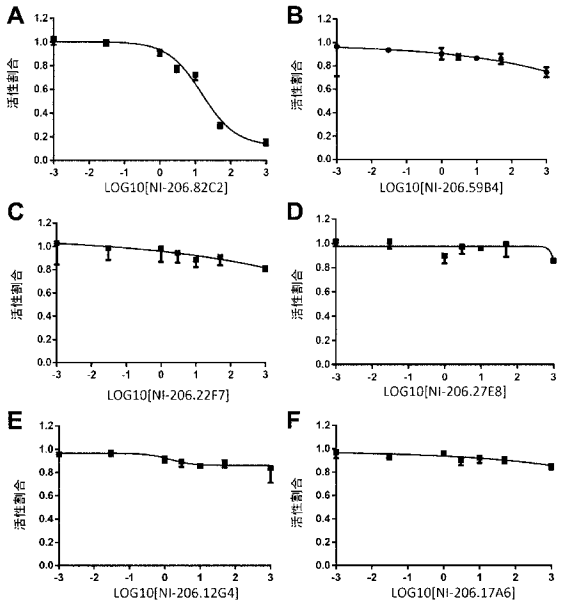


C

抗体	阻害（IC_{50}） nM
NI-206.82C2	525-PPQFDRSKKYP-535
NI-206.59B4	53-SYKTFFP-59
NI-206.22F7	381-KDTVENAIQJT-391
NI-206.27E8	169-NIYLKQR-175
NI-206.12G4	481-TDQEIKILEENKELE-495
NI-206.17A6	77-VLYNIETGQSY-87

Fig. 4

【図５】



G

抗体	阻害（IC_{50}） nM
NI-206.82C2	7,7 nM
NI-206.59B4	阻害性でない
NI-206.22F7	阻害性でない
NI-206.27E8	阻害性でない
NI-206.12G4	阻害性でない
NI-206.17A6	阻害性でない

Fig. 5

【図６】

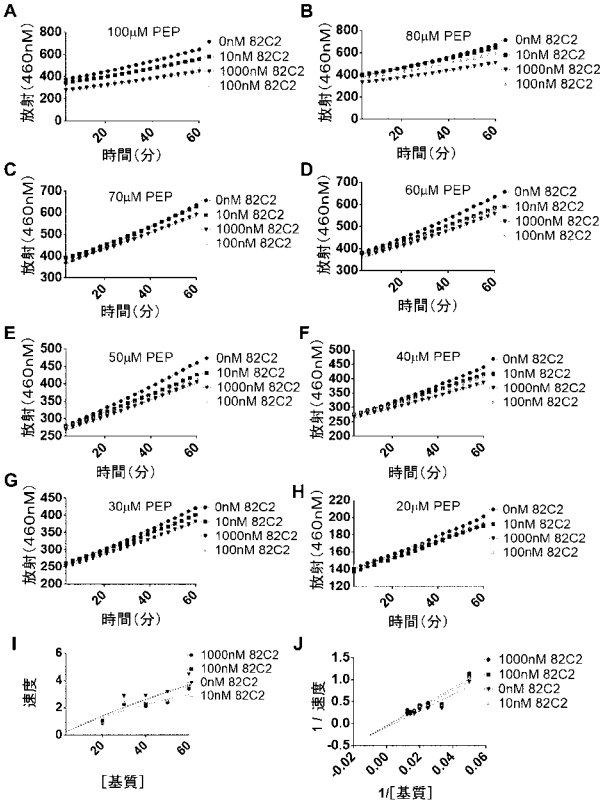


Fig. 6

【図７－１】

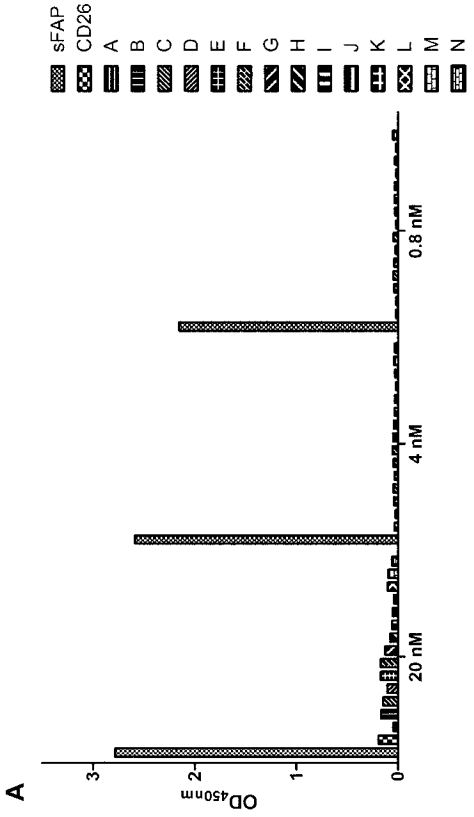


Fig. 7

【図７－２】

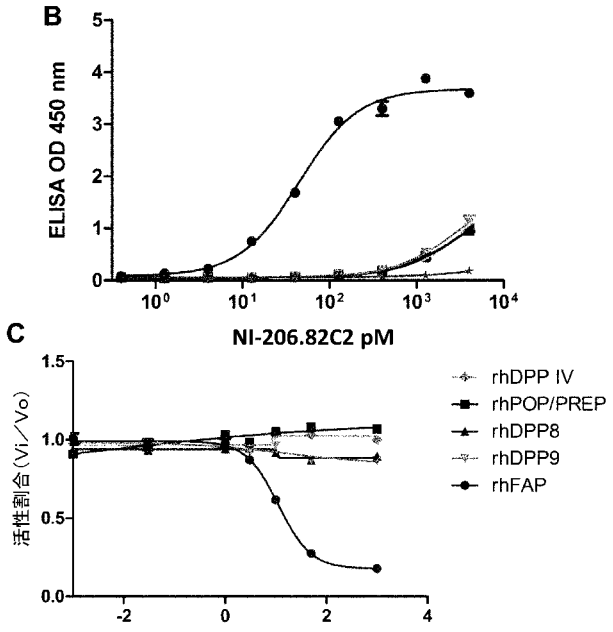


Fig. 7（続き）

【図８－１】

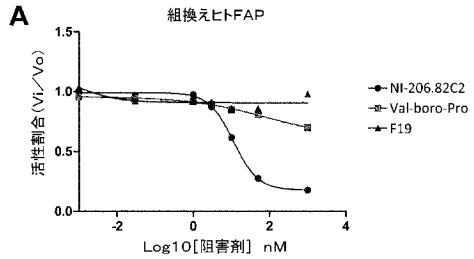


Fig. 8

【図８－２】

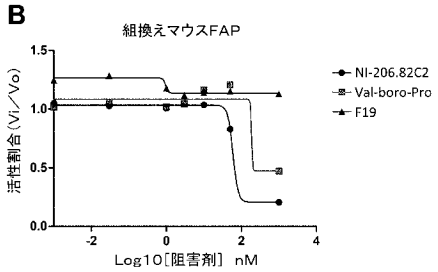


Fig. 8（続き）

【図９】

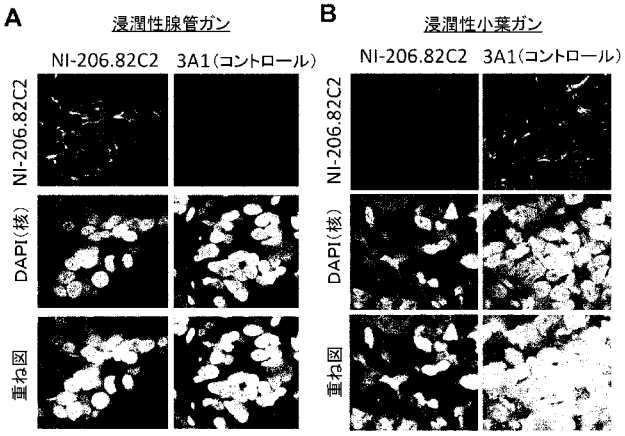


Fig. 9

【図１０】

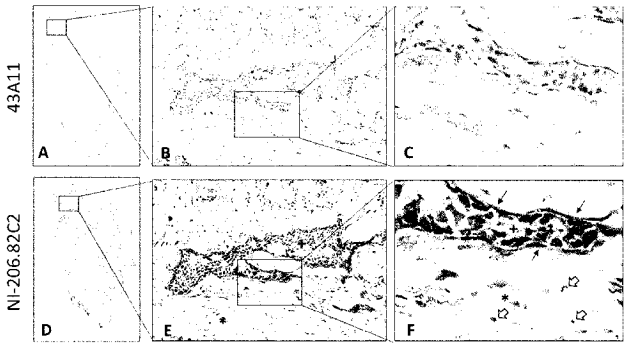


Fig. 10

【図１１】

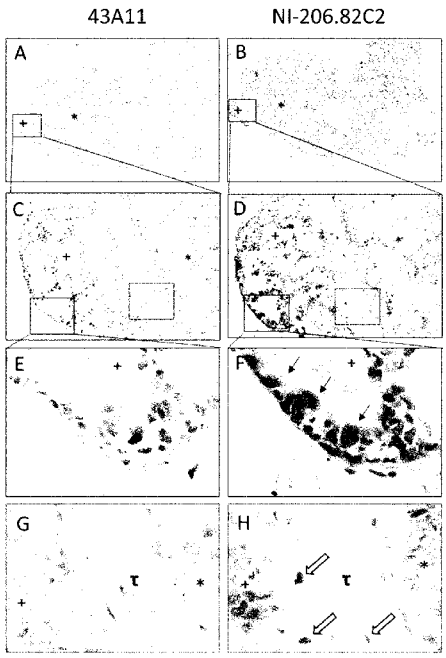


Fig. 11

【図１２】

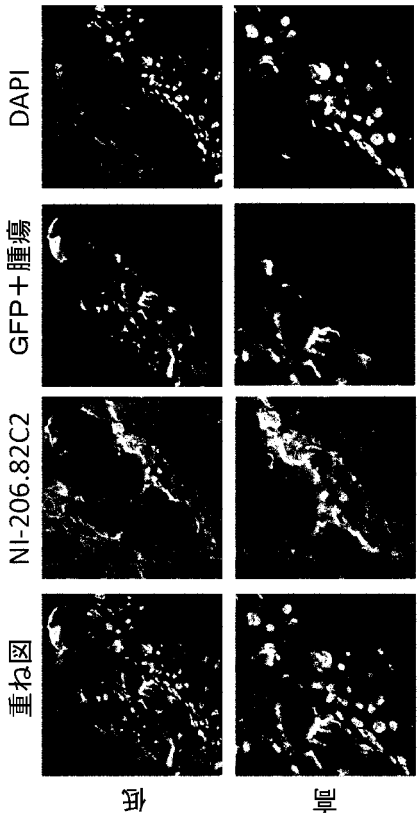


Fig. 12

【図１３】

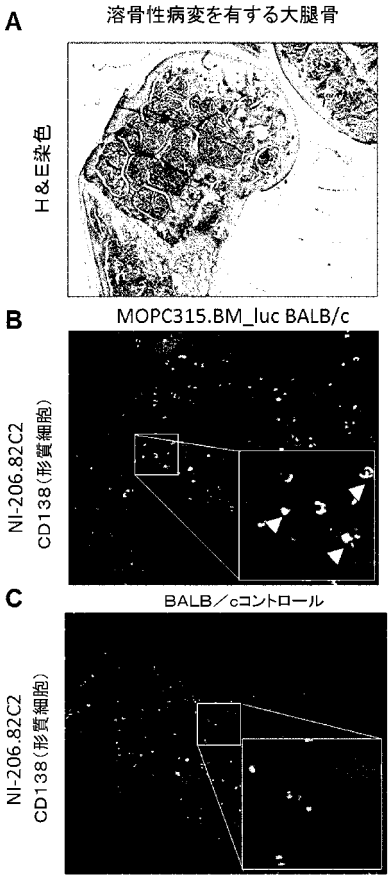


Fig. 13

【図１４】

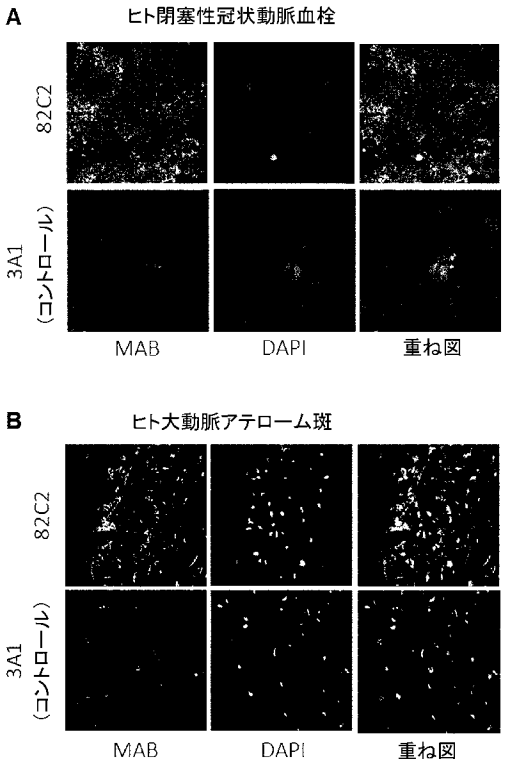


Fig. 14

【図１５－１】

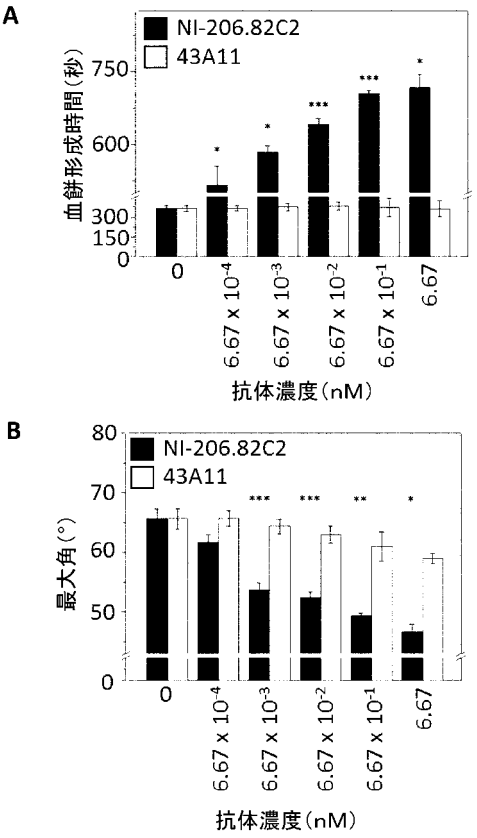


Fig. 15

【図１５－２】

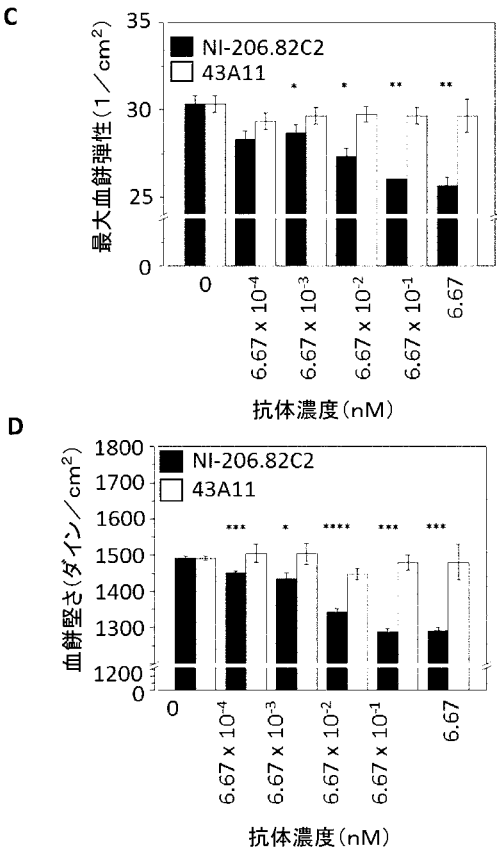


Fig. 15（続き）

【図１６】

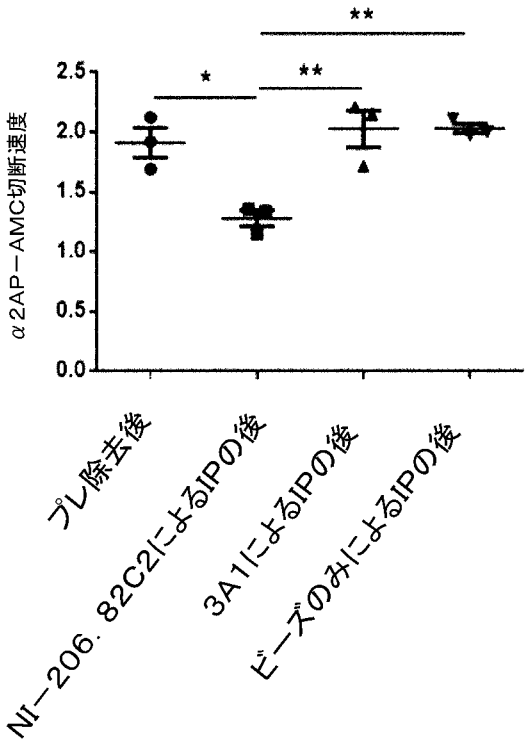
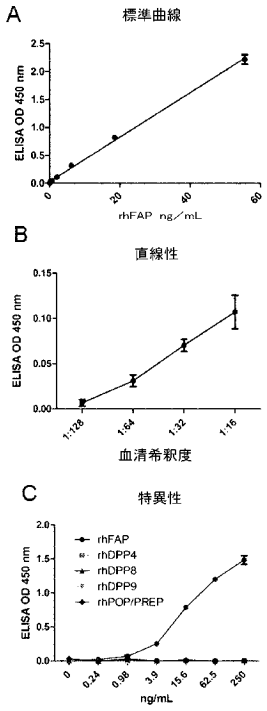


Fig. 16

【図１７】



- アッセイ間変動係数＝8．56%
- アッセイ内変動係数＝8．63%

Fig. 17

【図１８】

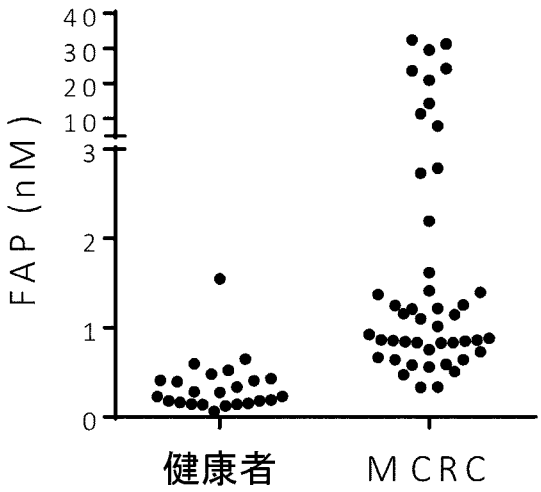


Fig. 18

【図１９】

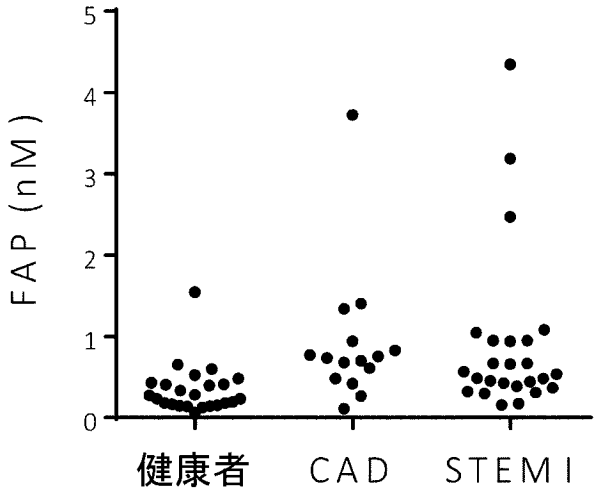


Fig. 19

【図２０】

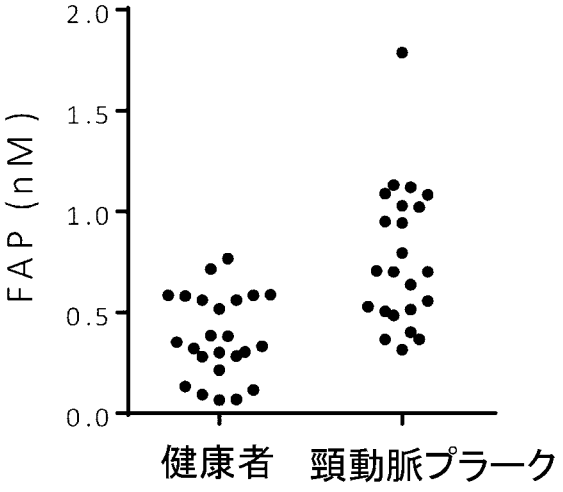


Fig. 20

【図２１】

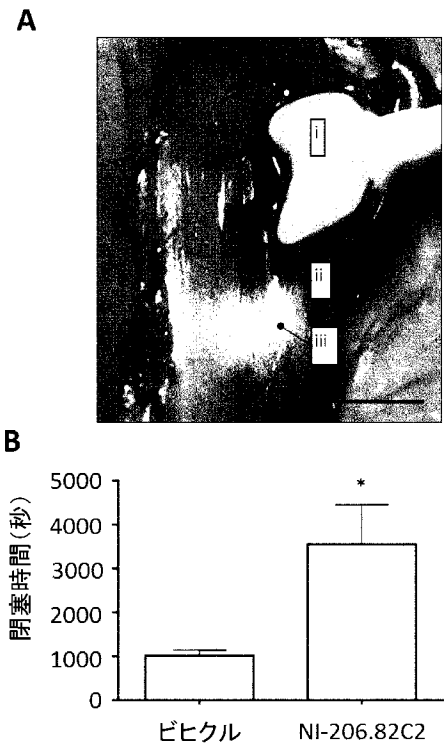


Fig. 21

【図２２】

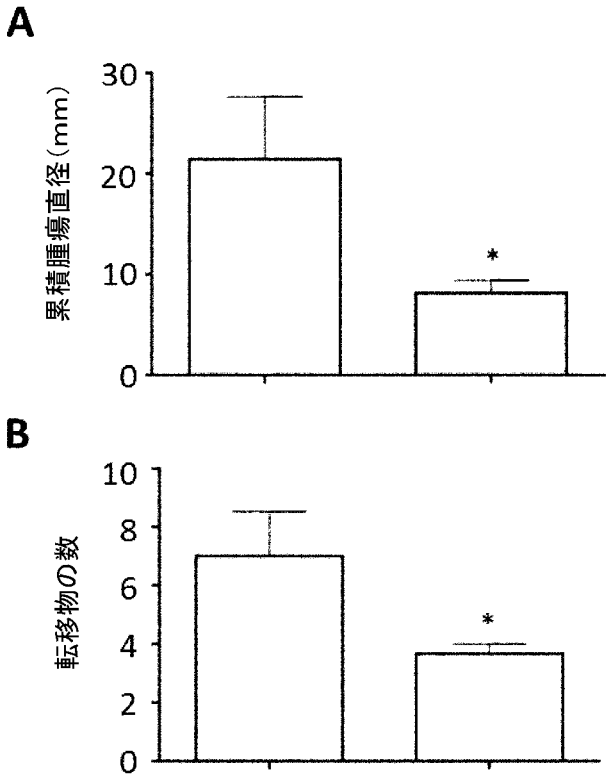


Fig. 22

【図２３－１】

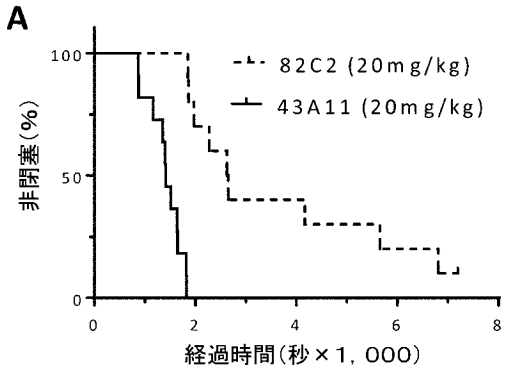


Fig. 23

【図２３－２】

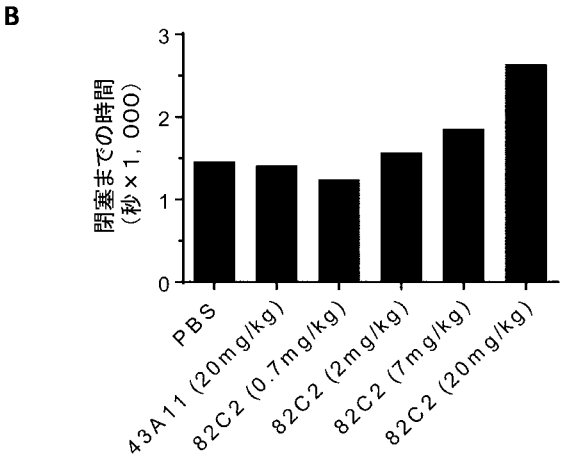


Fig. 23（続き）

【図２４】

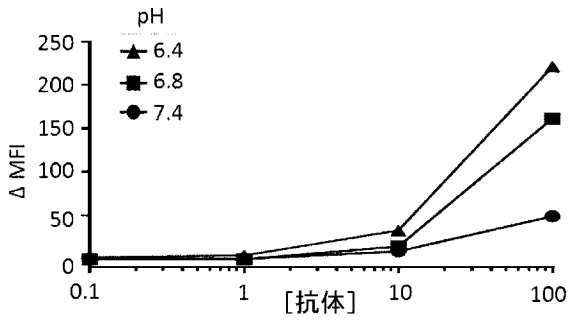


Fig. 24

【図２５】

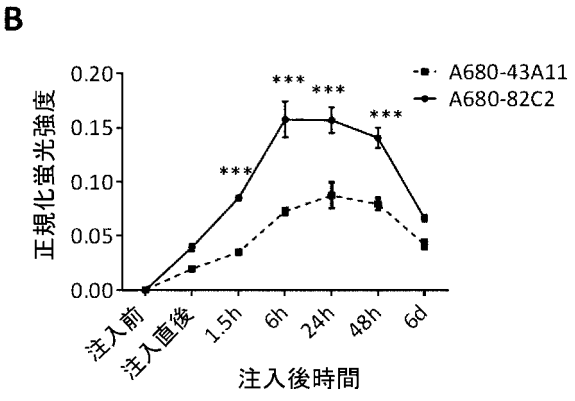


Fig. 25

【図２６】

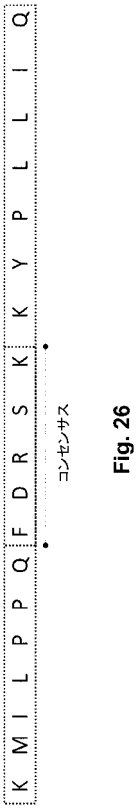


Fig. 26

【図２７】

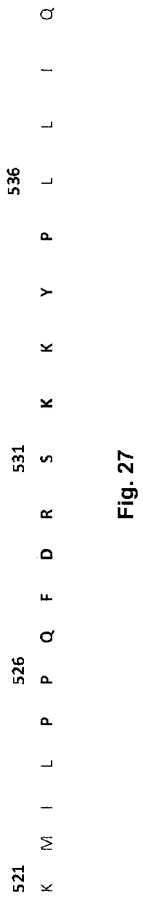


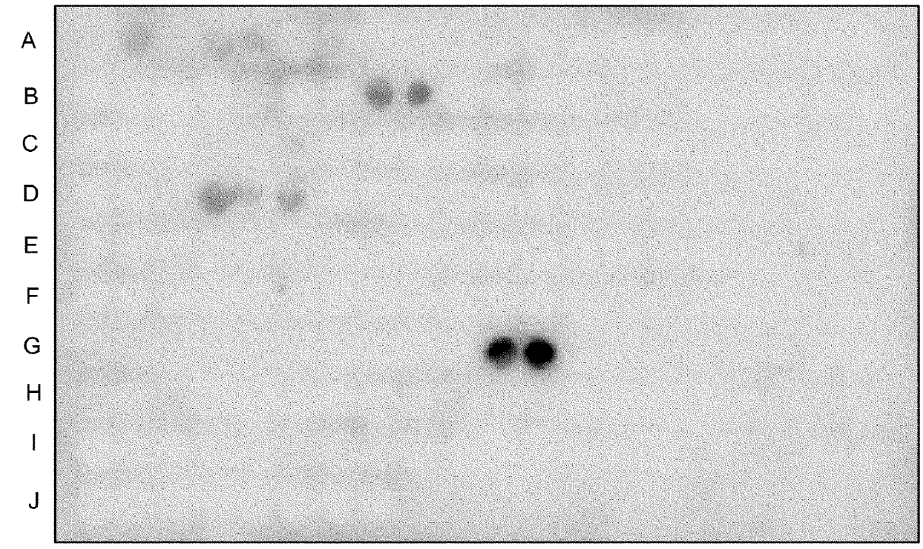
Fig. 27

【配列表】
2018510613000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成29年11月27日(2017.11.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９８】
ＶＩＩ．特異的なＦＡＰエピトープを有するペプチド
さらなる局面において、本発明は、本発明のいずれかの抗体（ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４およびＮＩ－２０６．１７Ａ６）によって特異的に認識されるＦＡＰのエピトープを有するペプチドに関連する。好ましくは、そのようなペプチドは、上記抗体によって認識される独特の線状エピトープとして配列番号３０～配列番号３７に示されるようなアミノ酸配列、または、１つもしくは複数のアミノ酸が置換され、欠失され、かつ／もしくは付加される改変配列を含み、あるいは、そのようなアミノ酸配列またはそのような改変配列からなり、このペプチドは本発明のいずれかの抗体によって認識され、好ましくは、ＮＩ－２０６．８２Ｃ２、ＮＩ－２０６．５９Ｂ４、ＮＩ－２０６．２２Ｆ７、ＮＩ－２０６．２７Ｅ８、ＮＩ－２０６．１２Ｇ４またはＮＩ－２０６．１７Ａ６の抗体によって認識される。
【手続補正２】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図４

【補正方法】変更
【補正の内容】

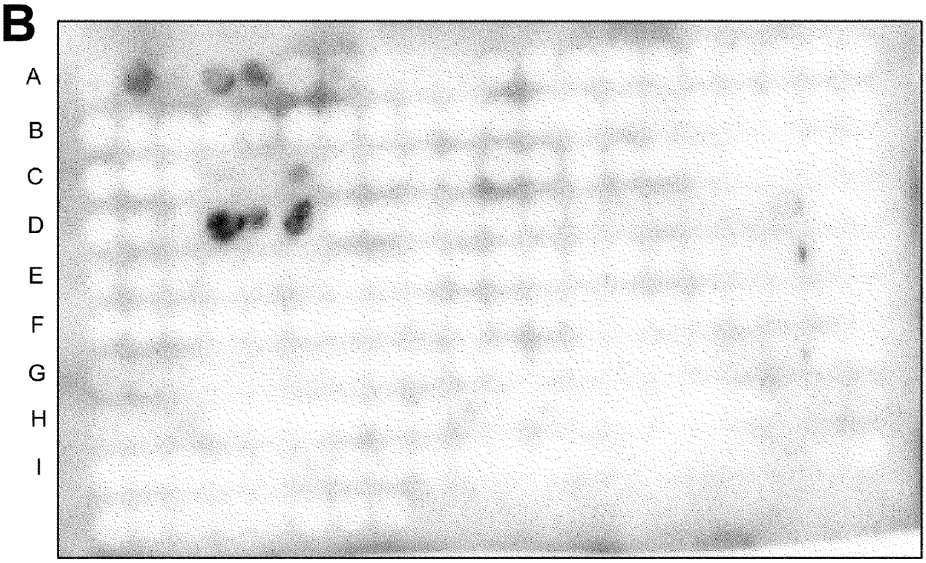
【図４】

A



NI－206．82C2＋二次検出抗体

B



二次検出抗体のみ

C

抗体	エピトープ
NI-206.82C2	525-PPQFDRSKKYP-535
NI-206.59B4	53-SYKTFFP-59
NI-206.22F7	381-KDTVENAIQIT-391
NI-206.27E8	169-NIYLKQR-175
NI-206.12G4	481-TDQEIKILEENKELE-495
NI-206.17A6	77-VLYNIETGQSY-87

Fig. 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/050380

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/050380

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-23, 25-30, 32-34(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/050380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61P35/00 C07K16/40
ADD.

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)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/020006 A2 (ROCHE GLYCART AG [CH]; BACAC MARINA [CH]; FREIMOSER-GRUNDSCHOBER ANNE) 16 February 2012 (2012-02-16) cited in the application	1-16, 18-23, 25-30, 32-34
Y	examples 1-14	17

X	J. ZHANG ET AL: "Identification of inhibitory scFv antibodies targeting fibroblast activation protein utilizing phage display functional screens", THE FASEB JOURNAL, vol. 27, no. 2, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 581-589, XP055195683, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.12-210377	1-16, 18-23, 25-30, 32-34
Y	figures 1-8	17

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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
18 March 2016	24/06/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Cilensek, Zoran

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/050380

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/040972 A1 (LUDWIG INST FOR CANCER RES LTD [US]; FISCHER ELIANE [CH]; BAUER STEFAN) 7 April 2011 (2011-04-07) cited in the application	1-16, 18-23, 25-30, 32-34
Y	paragraph [000182] - paragraph [000191]	17
X	CHENG ET AL: "Promotion of Tumor Growth by Murine Fibroblast Activation Protein, a Serine Protease, in an Animal Model", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 62, 15 August 2002 (2002-08-15), pages 4767-4772, XP008100989, ISSN: 0008-5472	1-16, 18-23, 25-30, 32-34
Y	figures 4, 5	17
X	Chad Eric Brokopp: "Fibroblast Activation Protein in Atherosclerosis and Atherothrombosis", , 1 January 2011 (2011-01-01), XP055195929, Retrieved from the Internet: URL:http://www.zora.uzh.ch/60160/1/Brokopp_C_Diss_11.pdf [retrieved on 2015-06-15]	1-16, 18-23, 25-30, 32-34
Y	figures 34, 41, 50-54	17
Y	WO 2014/161845 A1 (ROCHE GLYCART AG [CH]) 9 October 2014 (2014-10-09) cited in the application claims 1-42	17
A	VICTORIA J CHRISTIANSEN ET AL: "Targeting inhibition of fibroblast activation protein-[alpha] and prolyl oligopeptidase activities on cells common to metastatic tumor microenvironments", NEOPLASIA, vol. 15, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 348-358, XP055158792, US ISSN: 1476-5586, DOI: 10.1593/neo.121850 the whole document	1-23, 25-30, 32-34

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/050380

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012020006 A2	16-02-2012	AR 082629 A1	19-12-2012
		AU 2011288487 A1	31-01-2013
		CA 2806021 A1	16-02-2012
		CL 2013000369 A1	08-08-2014
		CN 103154038 A	12-06-2013
		CO 6670523 A2	15-05-2013
		CR 20130038 A	29-04-2013
		EA 201300239 A1	30-08-2013
		EC SP13012440 A	31-05-2013
		EP 2603530 A2	19-06-2013
		JP 5793568 B2	14-10-2015
		JP 2013542714 A	28-11-2013
		JP 2015180632 A	15-10-2015
		KR 20130066669 A	20-06-2013
		KR 20150039890 A	13-04-2015
		MA 34519 B1	02-09-2013
		NZ 605980 A	30-01-2015
		PE 12092013 A1	25-10-2013
		SG 187746 A1	28-03-2013
		TW 201206477 A	16-02-2012
		US 2012128591 A1	24-05-2012
		US 2016060356 A1	03-03-2016
		US 2016060357 A1	03-03-2016
		WO 2012020006 A2	16-02-2012
WO 2011040972 A1	07-04-2011	AU 2010301105 A1	19-04-2012
		CA 2776037 A1	07-04-2011
		EP 2483316 A1	08-08-2012
		JP 2013506664 A	28-02-2013
		US 2012258119 A1	11-10-2012
		WO 2011040972 A1	07-04-2011
WO 2014161845 A1	09-10-2014	AU 2014247175 A1	24-09-2015
		CA 2903595 A1	09-10-2014
		CN 105308069 A	03-02-2016
		CR 20150502 A	19-11-2015
		EA 201500995 A1	29-04-2016
		EP 2981552 A1	10-02-2016
		JP 2016515389 A	30-05-2016
		KR 20150139909 A	14-12-2015
		PH 12015502293 A1	15-02-2016
		SG 11201508220U A	27-11-2015
		TW 201500372 A	01-01-2015
		US 2014370019 A1	18-12-2014
		WO 2014161845 A1	09-10-2014

International Application No. PCT/ EP2016/ 050380

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-23, 25-30, 32-34(all partially)

An anti FAP antibody or a biotechnological or synthetic derivative thereof comprising in its variable region or binding domain an amino acid sequence of the VH and/or VL chain amino acid sequence as depicted in Fig. 1A. Subject-matter related thereto.

2-6. claims: 1-23, 25-30, 32-34(all partially)

Idem as invention 1, wherein the figure is 1B to 1F, respectively.

---

7. claim: 24

A peptide, preferably 11 to 20 amino acids in length having an epitope of FAP specifically recognized by an antibody of any one of claims 4 to 8, wherein the peptide comprises or consist of an amino acid sequence as defined in claim 4, preferably the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 30 to 32 or a modified sequence thereof in which one or more amino acids are substituted, deleted and/or added.

---

8. claim: 31

An anti-FAP antibody for use in the treatment of blood clotting disorders or use of an anti-FAP antibody for slowing coagulation of blood in vitro.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	*14/81*	*(2006.01)*	C07K	14/81		
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08		
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K	*38/16*	*(2006.01)*	A61K	39/395	L	
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	38/16		
A61P	*1/04*	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61P	*3/08*	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61P	*7/04*	*(2006.01)*	A61P	3/08		
A61P	*7/02*	*(2006.01)*	A61P	7/04		
A61P	*9/10*	*(2006.01)*	A61P	7/02		
A61P	*17/02*	*(2006.01)*	A61P	9/10		
A61P	*19/02*	*(2006.01)*	A61P	9/10	103	
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	17/02		
A61K	*49/16*	*(2006.01)*	A61P	19/02		
A61K	*51/10*	*(2006.01)*	A61P	29/00	101	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	49/16		
G01N	*33/543*	*(2006.01)*	A61K	51/10	200	
C07K	*16/30*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
C07K	*16/40*	*(2006.01)*	G01N	33/543	585	
			C07K	16/30		
			C07K	16/40		

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

(71)出願人 507324681
ユニバーシティ・オブ・チューリッヒ
ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ　ＯＦ　ＺＵＲＩＣＨ
スイス国、ツェーハー－８００６　チューリッヒ、レーミシュトラーセ　７１、プロレクトラート・フォルシュンク
(74)代理人 100114362
弁理士　萩野　幹治
(72)発明者 ブロコップ，チャド
スイス連邦、ＣＨ－８００８　チューリッヒ、マイナウストラッセ　４２
(72)発明者 グリム，ヤン
スイス連邦、ＣＨ－８６００　デューベンドルフ、ベルグリストラッセ　１６
(72)発明者 コンバルジアー，ベノイト
スイス連邦、ＣＨ－８９０２　ウルドルフ、バウムガルテンストラッセ　６

(72)発明者　ゴエランソン，マレイケ
スイス連邦、ＣＨ－９５００　ウイル、グルンドガッセ　９
(72)発明者　ローマン，クリスティーヌ
スイス連邦、ＣＨ－８０４４　チューリッヒ、ボルタストラッセ　１
(72)発明者　ホエルストラップ，シモン
スイス連邦、ＣＨ－８０３２　チューリッヒ、クルスウエグ　１９
(72)発明者　ニッチ，ロジャー
スイス連邦、ＣＨ－８１２６　ツミコン、ラングビスストラッセ　２７

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA02 CA06 CA10 CA11 CA19 CC24 DA01
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 CA53 NA14 ZA362 ZA452
ZA532 ZA542 ZA682 ZA892 ZA962 ZB152 ZB262 ZB272 ZC352
4C085 AA14 AA19 AA25 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43 CC23 DD62
EE01 GG01 HH03 HH07 KA04 LL07 LL18
4H045 AA11 AA20 AA30 BA70 BA71 BA72 CA40 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	新型抗成纤维细胞活化蛋白（FAP）抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2018510613A	公开(公告)日	2018-04-19
申请号	JP2017536340	申请日	2016-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	生物控股有限公司 苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	新Rimyu下保持颖儿 苏黎世大学		
[标]发明人	ブロコップチャド グリムヤン コンバルジアーベノイト ゴエランソンマレイケ ローマンクリスティーヌ ホエルストラップシモン ニッチロジャー		
发明人	ブロコップ,チャド グリム,ヤン コンバルジアー,ベノイト ゴエランソン,マレイケ ローマン,クリスティーヌ ホエルストラップ,シモン ニッチ,ロジャー		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C12N5/0781 C12N9/99 C07K14/47 C07K14/81 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K38/16 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/08 A61P7/04 A61P7/02 A61P9/10 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00 A61K49/16 A61K51/10 G01N33/53 G01N33/543 C07K16/30 C07K16/40		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P3/08 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/10 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 C07K16/40 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 C12N9/485 C12Y304/14005 A61K47/6871 C07K16/2878 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/52 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 G01N33/573 G01N33/57492 G01N2333/948 G01N2800/224 G01N2800/226 G01N2800/323 G01N2800/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C12N5/0781 C12N9/99 C07K14/47 C07K14/81 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395.N A61K39/395.L A61K38/16 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/08 A61P7/04 A61P7/02 A61P9/10 A61P9/10.103 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61K49/16 A61K51/10.200 G01N33/53.D G01N33/543.585 C07K16/30 C07K16/40		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA682 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZC352 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA25 4C085/BB11 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/KA04 4C085/LL07 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	萩野 干治		
优先权	2015150691 2015-01-09 EP		

外部链接 Espacenet

摘要(译)

提供了对成纤维细胞活化蛋白（FAP）特异的新型人源抗体，其优选能够选择性地抑制FAP的酶活性，以及与所述抗体相关的方法。另外，提供了用于诊断和/或监测与FAP相关的疾病及其治疗的方法。还公开了与对FAP特异的抗体相关的测定和试剂盒。新型抗FAP抗体可用于FAP靶向的免疫治疗和诊断用药物和诊断组合物。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-510613
(P2018-510613A)
(43)公表日　平成30年4月19日(2018.4.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	4B065
C12N 5/0781	(2010.01)	C12N	5/0781		4C084
C12N 9/99	(2006.01)	C12N	9/99		4C085
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 118 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-536340 (P2017-536340)
(86)(22)出願日　平成28年1月11日 (2016.1.11)
(85)翻訳文提出日　平成29年8月29日 (2017.8.29)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/050380
(87)国際公開番号　WO2016/110598
(87)国際公開日　平成28年7月14日 (2016.7.14)
(31)優先権主張番号　15150691.2
(32)優先日　平成27年1月9日 (2015.1.9)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　517237654
マブイミューン　ダイアグノスティックス　エイジー
ＭＡＢＩＭＭＵＮＥ　ＤＩＡＧＮＯＳＴＩＣＳ　ＡＧ
スイス連邦、ＣＨ－８９５２　シュリーレン、ワジストラッセ　１３
Ｗａｇｉｓｔｒａｓｓｅ　１３，８９５２　Ｓｃｈｌｉｅｒｅｎ　（ＣＨ）
(71)出願人　511029420
ニューリミューン　ホールディング　エイジー
スイス連邦、ＣＨ－８９５２　シュリーレン、ヴァジストラッセ　１３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規な抗線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）抗体およびその派生使用