

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成27年1月22日 (2015.1.22)

【公表番号】特表2013-542714(P2013-542714A)

【公表日】平成25年11月28日 (2013.11.28)

【年通号数】公開・登録公報2013-064

【出願番号】特願2013-523589(P2013-523589)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 0 7 K 16/40 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 0 7 K 16/40

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 35/00

【誤訳訂正書】

【提出日】平成26年11月26日 (2014.11.26)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

線維芽細胞活性化タンパク質 ( F A P ) に特異的に結合する抗体であって、  
前記抗体が、

( i ) 配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 4 7、配列番号 8 1、及び配列番号 1 1 3 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 5 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 1 4 3 の軽鎖 C D R 1；配列番号 1 5 1 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 1 6 3 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可

変領域、又は

( i i ) 配列番号 9、配列番号 19、及び配列番号 31 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 61、配列番号 95、及び配列番号 127 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 137 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 147 の軽鎖 C D R 1；配列番号 155 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 167 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域、を含む、抗体。

【請求項 2】

前記抗体が、配列番号 267 の重鎖可変領域及び配列番号 265 の軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体が、配列番号 299 の重鎖可変領域及び配列番号 297 の軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体が、免疫グロブリンの F c 領域又は F c 領域に等価な領域を含む、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

線維芽細胞活性化タンパク質 ( F A P ) に特異的に結合する抗体であって、

前記抗体が、

( i ) 配列番号 3、配列番号 13、及び配列番号 23 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 35、配列番号 69、及び配列番号 101 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 137 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 147 の軽鎖 C D R 1；配列番号 155 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 167 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域、又は

( i i ) 配列番号 3、配列番号 13、及び配列番号 23 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 35、配列番号 69、及び配列番号 101 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 135 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 143 の軽鎖 C D R 1；配列番号 151 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 163 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

並びに、免疫グロブリンの F c 領域、を含む、抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、配列番号 207 の重鎖可変領域及び配列番号 205 の軽鎖可変領域を含む、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体が、配列番号 197 の重鎖可変領域及び配列番号 195 の軽鎖可変領域を含む、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記 F c 領域が I g G の F c 領域である、請求項 4 から 7 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体が完全長 I g G クラスの抗体である、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体がヒト定常領域を含む、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

前記抗体がヒト抗体である、請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体が糖鎖操作 F c 領域を含む、請求項 1 から 11 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

前記抗体が、糖鎖を操作されていない抗体と比較して、前記 F c 領域における非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

前記 F c 領域中の N - 結合型オリゴ糖の少なくとも 2 0 % から 1 0 0 % が非フコシル化型である、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記抗体が、糖鎖非操作型抗体と比較して、前記 F c 領域における二分岐型のオリゴ糖の割合が増加している、請求項 1 2 から 1 4 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 1 6】

前記 F c 領域中の N - 結合型オリゴ糖の少なくとも 2 0 % から 1 0 0 % が二分岐型である、請求項 1 2 から 1 5 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 1 7】

前記 F c 領域中の N - 結合型オリゴ糖の少なくとも 2 0 % から 5 0 % が二分岐型で、非フコシル化型である、請求項 1 2 から 1 6 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 1 8】

前記抗体が、増加したエフェクター機能及び / 又は増加した F c 受容体結合親和性を有する、請求項 1 から 1 7 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 1 9】

前記増加したエフェクター機能は増加した A D C C である、請求項 1 8 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体の一部を形成する抗体重鎖及び / 又は抗体軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 のポリヌクレオチドによりコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 2 2】

( i ) 配列番号 2 6 7 の配列を含むポリペプチドをコードする第一の単離されたポリヌクレオチド、及び配列番号 2 6 5 の配列を含むポリペプチドをコードする第二の単離されたポリヌクレオチド、( i i ) 配列番号 2 9 9 の配列を含むポリペプチドをコードする第一の単離されたポリヌクレオチド、及び配列番号 2 9 7 の配列を含むポリペプチドをコードする第二の単離されたポリヌクレオチド、( i i i ) 配列番号 1 9 7 の配列を含むポリペプチドをコードする第一の単離されたポリヌクレオチド、及び配列番号 1 9 5 の配列を含むポリペプチドをコードする第二の単離されたポリヌクレオチド、又は( i v ) 配列番号 2 0 7 の配列を含むポリペプチドをコードする第一の単離されたポリヌクレオチド、及び配列番号 2 0 5 の配列を含むポリペプチドをコードする第二の単離されたポリヌクレオチド、

を含む組成物。

【請求項 2 3】

請求項 2 0 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 0 に記載のポリヌクレオチド、請求項 2 2 に記載の組成物、又は請求項 2 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 5】

前記宿主細胞が、G n T I I I 活性を有する一以上のポリペプチドの増加したレベルを発現するように操作されている、請求項 2 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 6】

G n T I I I 活性を有する前記ポリペプチドが、G n T I I I の触媒ドメイン及び M a n I I のゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドである、請求項 2 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 7】

前記宿主細胞が、M a n I I 活性を有する一以上のポリペプチドの増加したレベルを発現するように更に操作されている、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 8】

線維芽細胞活性化タンパク質 ( F A P ) に特異的に結合する抗体を産生する方法であって、

a ) 抗体の発現を許容する条件下で培地中で請求項 2 4 に記載の宿主細胞を培養し、及び

b ) 抗体を回収すること  
を含む方法。

【請求項 2 9】

線維芽細胞活性化タンパク質 ( F A P ) に特異的に結合する抗体を産生する方法であって、

a ) 抗体の発現及び G n T I I I 活性を有する前記ポリペプチドによる前記抗体の F c 領域に存在するオリゴ糖の修飾を許容する条件下で培地中で請求項 2 5 から 2 7 の何れか一項に記載の宿主細胞を培養し、

b ) 抗体を回収すること  
を含む方法。

【請求項 3 0】

F A P に特異的に結合する抗体であって、請求項 2 8 又は 2 9 に記載の方法により産生される抗体。

【請求項 3 1】

請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体と細胞傷害性薬物を含む抗体コンジュゲート。

【請求項 3 2】

請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体と薬学的に許容される担体を含有する薬学的製剤。

【請求項 3 3】

追加の治療薬を更に含む請求項 3 2 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 4】

医薬としての使用のための、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 3 5】

F A P の発現により特徴付けられる疾患の治療のための、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 3 6】

前記疾患が癌である、請求項 3 5 に記載の抗体。

【請求項 3 7】

腫瘍細胞又は腫瘍の間質細胞の細胞溶解の誘導における使用のための、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 3 8】

前記細胞溶解が前記抗体の抗体依存性細胞傷害によって誘導される、請求項 3 7 に記載の抗体。

【請求項 3 9】

医薬の製造における、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 4 0】

F A P の発現により特徴付けられる疾患の治療のための医薬の製造のための、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 4 1】

前記医薬がさらに追加の治療薬を含む、請求項 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 2】

前記疾患が癌である、請求項 4 0 又は 4 1 に記載の使用。

## 【請求項 4 3】

腫瘍細胞又は腫瘍の間質細胞の溶解を誘導するための医薬の製造のための、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体の使用。

## 【請求項 4 4】

前記細胞溶解が前記抗体の抗体依存性細胞傷害によって誘導される、請求項 4 3 に記載の使用。

## 【請求項 4 5】

請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の抗体、又は請求項 3 2 又は 3 3 に記載の薬学的製剤を含む、F A P 発現により特徴付けられる疾患を有する個体を治療するための医薬であって、前記治療が前記医薬の有効量を個体に投与することを含む、医薬。

## 【請求項 4 6】

前記治療が個体へ追加の治療薬を投与することを更に含む、請求項 4 5 に記載の医薬。

## 【請求項 4 7】

前記疾患が癌である、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の医薬。

## 【請求項 4 8】

請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体と、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体を含む診断薬と F A P の複合体の検出を可能にする標識を含む診断薬。

## 【請求項 4 9】

請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体と、F A P を含む複合体の検出を可能にする標識を含む、個体の疾患の診断方法のためのキット。

## 【請求項 5 0】

診断または検出方法の使用のための請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】抗 F A P 抗体及び使用の方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) に特異的な抗体に関する。加えて、本発明は、そのような抗体をコードするポリヌクレオチド、及びそのようなポリヌクレオチドを含むベクター及び宿主細胞に関する。本発明は、抗体を製造するための方法及び疾患の治療においてそれらを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) 及び抗 - F A P 抗体

ヒト線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P ; G e n B a n k アクセッション番号 A A C 5 1 6 6 8 ) は、セプラーゼとしても知られ、1 7 0 k D a の膜内在性セリンペプチダーゼ (E C 3 . 4 . 2 1 . B 2 8 ) である。密接に関連する細胞表面酵素であるペプチジルペプチダーゼ I V (C D 2 6 としても知られる ; G e n B a n k アクセッション番号 P 2 7 4 8 7 ) 、及び他のペプチダーゼと一緒に、F A P は、ジペプチジルペプチダーゼ I V ファミリーに属する (Y u e t a l . , F E B S J 2 7 7 , 1 1 2 6 - 1 1 4 4 ( 2 0 1 0 ) ) 。それは大規模な C 末端細胞外ドメインを持つ 2 つの N - グリコシル化サブユニットを含むホモ二量体であり、その中に酵素の触媒ドメインが配置されている (S c a n l a n e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 1 , 5 6 5 7 - 5 6 6 1 ( 1 9 9 4 ) ) 。F A P は、そのグリコシル化形態では、ポストプロリルジペプチジルペプチダーゼ活性とゼラチナーゼ活動の両方を持っている (S u n e t a l . , P r o t e i n

Expr Purif 24, 274-281 (2002))。

【 0 0 0 3 】

ヒト F A P はもともとモノクローナル抗体 ( m A b ) F 1 9 を使用して培養線維芽細胞で同定された ( 国際公開第 9 3 / 0 5 8 0 4 号に記載 , A T C C 番号 H B 8 2 6 9 ) 。タンパク質のホモログはマウスを含め、幾つかの種において見いだされた (Niedermeyer et al., Int J Cancer 71, 383-389 (1997), Niedermeyer et al., Eur J Biochem 254, 650-654 (1998); G e n B a n k アクセッション番号 A A H 1 9 1 9 0 ) 。 F A P はユニークな組織分布を有する : その発現は、肺癌、結腸・直腸癌、膀胱癌、卵巣癌及び乳癌を含み、一般的に正常な成体組織に存在しない、全ての原発性及び転移性上皮性腫瘍の 9 0 % 以上の反応性間質性線維芽細胞上において高度に上方制御されることが見いだされた (Rettig et al., Proc Natl Acad Sci USA 85, 3110-3114 (1988); Garin-Chesa et al., Proc Natl Acad Sci USA 87, 7235-7239 (1990))。続く報告では、F A P は、間質性線維芽細胞だけでなく、上皮起源の悪性細胞の幾つかの型の中においても発現されていないこと、及び F A P の発現は悪性の表現型と直接関連することが示された (Jin et al., Anticancer Res 23, 3195-3198 (2003))。

【 0 0 0 4 】

多くの一般的な癌におけるその発現及び正常組織におけるその制限された発現のため、F A P は、癌の様々なイメージング、診断及び治療のための有望な抗原性標的と考えられてきた。従って、複数のモノクローナル抗体が、研究、診断、及び治療目的のために、F A P に対して提起されている。

【 0 0 0 5 】

シブロットズマブ ( S i b r o t u z u m a b ) / B I B H 1、ヒト F A P に特異的に結合する F 1 9 抗体のヒト化バージョン ( 国際公開第 9 9 / 5 7 1 5 1 号に記載 )、及び F 1 9 エピトープ特異性を有する F A P 抗原に対する更なるヒト化又は完全ヒト抗体 (Mersmann et al., Int J Cancer 92, 240-248 (2001); Schmidt et al., Eur J Biochem 268, 1730-1738 (2001); 国際公開第 0 1 / 6 8 7 0 8 号に記載 ) が開発された。O S 4 抗体は F 1 9 抗体の他のヒト化 ( C D R 移植 ) バージョンであるが (Wueest et al., J Biotech 92, 159-168 (2001)、一方で s c F v 3 3 及び s c F v 3 6 は、F 1 9 とは異なる結合特異性を有し、ヒト及びマウスの F A P タンパク質に対して交差反応性である (Brocks et al., Mol Med 7, 461-469 (2001))。より最近、他のマウス抗 F A P 抗体、並びにそれらのキメラ及びヒト化バージョンが開発された ( 国際公開第 2 0 0 7 / 0 7 7 1 7 3 号, Ostermann et al., Clin Cancer Res 14, 4584-4592 (2008))。

【 0 0 0 6 】

腫瘍間質内のプロテアーゼは、細胞外マトリックス ( E C M ) 成分のタンパク質分解を介して、血管新生及び / 又は腫瘍細胞遊走等のプロセスを容易にする。さらに、腫瘍間質は、腫瘍への栄養素と酸素の供給において、並びに腫瘍の浸潤や転移において重要な役割を果たしている。これらの本質的な機能は、それを診断だけでなく潜在的な治療の標的としている。

【 0 0 0 7 】

抗 F A P 抗体を用いるインビボにおける腫瘍間質標的指向化の概念の実現可能性についての証拠は、<sup>1 3 1</sup>ヨード標識化 F 1 9 抗体を用いた第 I 相臨床研究で得られ、それは腫瘍における抗体の特異的な濃縮及び転移の検出を実証した (Welt et al., J Clin Oncol 12, 1193-1203 (1994)。同様に、シブロットズマブ ( sibrotuzumab ) の第 I 相研究は、<sup>1 3 1</sup>I - 標識化抗体の特異的腫瘍蓄積を実証した (Scott et al., Clin Cancer Res 9, 1639-1647 (2003))。しかしながら、転移性結腸直腸癌の患者における非抱合型シブロットズマブの初期第 II 相試験では、腫瘍進行を抑制するの抗体の有効性の欠如のため中止された (Hofheinz et al., Onkologie 26, 44-48 (2003))。また、最近開発された抗 F A P 抗体は、インビボでの非抱合形態において抗腫瘍作用を示さなかった ( 国際公開第 2 0 0 7 / 0 7 7 1 7 3 号 )。

【 0 0 0 8 】

従って、癌の治療のために F A P を標的とし、改善された効力を有する抗体を含む、強化された治療的アプローチの必要性が依然として存在する。

#### 【 0 0 0 9 】

##### 抗体のグリコシル化

オリゴ糖成分が、物理的安定性、プロテアーゼの攻撃に対する耐性、免疫系との相互作用、薬物動態、及び特定の生物学的活性を含む、治療的糖タンパク質の有効性に関連する特性に有意に影響を与えることができる。そうした特性は、オリゴ糖の有無だけでなく、その特定の構造に依存し得る。オリゴ糖構造と糖タンパク質の機能との間において幾つかの一般化を行うことができる。例えば、特定のオリゴ糖構造は、特定の糖鎖結合タンパク質との相互作用を介して血流からの糖タンパク質の迅速なクリアランスを媒介し、一方他は、抗体に結合されて、望ましくない免疫反応を引き起こす(Jenkins et al., Nature Biotechnol 14, 975-81 (1996))。

#### 【 0 0 1 0 】

I g G 1 型抗体は、癌の免疫療法の中で最も一般的に使用される抗体であり、各 C H 2 ドメインの A s n 2 9 7 で保存された N - 結合型糖鎖付加部位を持つ糖タンパク質である。A s n 2 9 7 に付着した 2 つの複雑な二分岐型のオリゴ糖は、C H 2 ドメインの間に埋葬され、ポリペプチド骨格との広範な接触を形成し、そしてそれらの存在は、例えば抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 ( A D C C ) などのエフェクター機能を媒介するために抗体にとって必須である(Lifely et al., Glycobiology 5, 813-822 (1995); Jefferis et al., Immunol Rev 163, 59-76 (1998); Wright and Morrison, Trends Biotechnol 15, 26-32 (1997))。タンパク質工学研究では、F c R は I g G の C H 2 ドメインの下側のヒンジ領域と相互作用することが示されている。Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996)。しかしながら、F c R 結合はまた、C H 2 領域におけるオリゴ糖の存在が必要とする。Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996); Wright and Morrison, Trends Biotechnol. 15:26-31 (1997) は、オリゴ糖とポリペプチドの両方が相互作用部位に直接寄与するか、又はオリゴ糖が活性な C H 2 ポリペプチドのコンフォメーションを維持するために必要であるかの何れかを示唆している。従って、オリゴ糖構造の修飾は、I g G 1 と F c R との間の相互作用の親和性を高めるため、及び I g G 1 の A D C C 活性を増加させるための手段として調査することができる。

#### 【 0 0 1 1 】

モノクローナル抗体の効力の大きな増加を得るための方法は、Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999) 及び米国特許第 6 6 0 2 6 8 4 号 ( 国際公開第 9 9 / 5 4 3 4 2 号 ) に記載されるように、それらのオリゴ糖成分を操作することによって、その天然の細胞媒介性エフェクター機能を強化することであり、その内容は、その全体が本明細書中で参考として援用される。Umana らは、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) において、二分岐型のオリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである、( 1 , 4 ) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I ( G n T I I I ) の過剰発現は、それらの細胞中に産生される抗体のインビトロでの A D C C 活性を有意に増大させることを示した。生産細胞株における G n T I I I の過剰発現は、一般的に非フコシル化型でハイブリッド型である二分岐型のオリゴ糖に富んだ抗体をもたらす。G n T I I I に加えて、マンノシダーゼ I I ( M a n I I ) が産生細胞株において過剰発現されている場合は、複合型の二分岐型の非フコシル化オリゴ糖に富んだ抗体が得られる(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006))。抗体の両方の型が、未修飾のグリカンを持つ抗体に比べて、亢進した A D C C を強く示したが、N グリカンの大半が複合型である抗体のみが、有意な補体依存性細胞傷害を誘導することができる(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006))。A s n 2 9 7 の糖の組成における変化又はその消失はまた、抗体の F c ドメインの、F c 受容体 ( F c R ) 及び補体 C 1 q タンパク質への結合にも影響を及ぼし、このことは A D C C 及び C D C のそれぞれにとって重要である(Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Davies et al., Biotechnol Bioeng 74, 288-294 (2001); Mimura et al., J Biol Chem 276, 45539-45547 (2001); Radaev et

al., J Biol Chem 276, 16478-16483 (2001); Shields et al., J Biol Chem 276, 6591-6604 (2001); Shields et al., J Biol Chem 277, 26733-26740 (2002); Simmons et al., J Immunol Methods 263, 133-147 (2002))。

# 【発明の概要】

## 【0012】

本発明は、高親和性及び／又は亢進したエフェクター機能を有する線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）に特異的に結合する抗体を提供する。

## 【0013】

一態様において、本発明は、配列番号3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175及び177に記載される相補性決定領域（CDR）の少なくとも一（すなわち、1、2、3、4、5又は6）を含む、FAPを特異的に結合する抗体を対象とする。一実施態様において、抗体は、配列番号3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175及び177に記載される3つの重鎖CDR（すなわちHC DR 1、HC DR 2、及びHC DR 3）及び／又は3つの軽鎖CDR（すなわちLC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3）を含む。より具体的な実施態様において、抗体は、配列番号193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309及び311に記載される重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列から選択される、抗体の重鎖可変領域及び／又は抗体の軽鎖可変領域、特に、重鎖及び軽鎖の可変領域の両方を含む。一実施態様において、抗体は、Fc領域、特にIgGのFc領域を含む。更なる実施態様において、抗体は、全長抗体、特にIgGクラスの抗体である。その他の実施態様において、抗体はヒト抗体定常領域を含む。一実施態様では、抗体はヒトである。一実施態様において、抗体は、Fc領域に修飾されたオリゴ糖を有するように糖鎖を操作されている。一実施態様において、抗体は、糖鎖を操作されていない抗体と比較して、Fc領域に非フコシル化オリゴ糖及び／又は二分岐型のオリゴ糖の割合が増加している。更なる実施態様において、抗体は、エフェクター機能が増加しているか及び／又はFc受容体結合親和性が増加している。特定の実施態様において、エフェクター機能の増加とは抗体依存性細胞傷害（ADCC）の増加である。その他の実施態様において、抗体は、約1  $\mu$ M未満、好ましくは100 nM未満、最も好ましくは約1 nM未満又は実に0.1 nM未満の $K_D$ 値でFAPに結合する。一実施態様において、抗体は親和性成熟である。一実施態様において、抗体は、ヒト組織においてFAPに結合する。一実施態様において、抗体は、FAPの内部移行を誘導しない。

## 【0014】



その他の態様において、本発明はまた、抗体に関連するポリペプチド、ポリヌクレオチド、宿主細胞、及び発現ベクターを対象とする。更なる態様において、本発明は、抗体を作製する方法に関する。更なる態様において、本発明は、抗体を用いる方法、特にFAPの発現によって特徴付けられる癌などの疾患の治療を対象とする。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、親和性成熟抗FAP Fab断片の表面プラズモン共鳴（SPR）に基づく動力学解析を示す。処理された動力学データセットは、クローン19G1のヒト（hu）FAPへの結合（A）及びマウス（mu）FABへの結合（B）、クローン20G8のhu FAPへの結合（C）、mu FAPへの結合（D）、ならびにクローン4B9のhu FAPへの結合（E）及びmu FAPへの結合（F）を示す。滑らかな線は、1：1相互作用モデルに対するデータのグローバルフィットを表す。

【図2】図2は、親和性成熟抗FAP Fab断片のSPRに基づく動力学解析を示す。処理された動力学データセットは、クローン5B8のhu FAPへの結合（A）及びmu FABへの結合（B）、クローン5F1のhu FAPへの結合（C）、mu FAPへの結合（D）、ならびにクローン14B3のhu FAPへの結合（E）及びmu FAPへの結合（F）を示す。滑らかな線は、1：1相互作用モデルに対するデータのグローバルフィットを表す。

【図3】図3は、親和性成熟抗FAP Fab断片のSPRに基づく動力学解析を示す。処理された動力学データセットは、クローン16F1のhu FAPへの結合（A）及びmu FABへの結合（B）、クローン16F8のhu FAPへの結合（C）、mu FAPへの結合（D）、ならびにクローンO3C9のhu FAPへの結合（E）及びmu FAPへの結合（F）を示す。滑らかな線は、1：1相互作用モデルに対するデータのグローバルフィットを表す。

【図4】図4は、親和性成熟抗FAP Fab断片のSPRに基づく動力学解析を示す。処理された動力学データセットは、クローンO2D7のhu FAPへの結合（A）とmu FABへの結合（B）、クローン28H1のhu FAPへの結合（C）、mu FAPへの結合（D）、cyno FAPへの結合（E）、ならびにクローン22A3のhu FAPへの結合（F）、mu FAPへの結合（G）及びカニクリザル（cyno）FAPへの結合（H）。滑らかな線は、1：1相互作用モデルに対するデータのグローバルフィットを表す。

【図5】図5は、親和性成熟抗FAP Fab断片のSPRに基づく動力学解析を示す。処理された動力学データセットは、クローン29B11のhu FAPへの結合（A）、mu FABへの結合（B）、cyno FAPへの結合（C）、ならびにクローン23C10のhu FAPへの結合（D）、mu FAPへの結合（E）及びcyno FAPへの結合（F）を示す。滑らかな線は、1：1相互作用モデルに対するデータのグローバルフィットを表す。

【図6】図6は、3F2（A）、4G8（B）及び3D9（C）抗FAP抗体の、Fab断片としての、ヒト、マウス及びカニクリザルFAPに対する結合のSPRに基づく動力学解析を示す。処理された動力学データセットが示され、滑らかな線は、1：1相互作用モデルに対するデータのグローバルフィットを表す。

【図7】図7は、3F2（A）、4G8（B）及び3D9（C）抗FAP抗体の、ヒトIgGとしての、ヒト、マウス及びカニクリザルFAPに対する結合のSPRに基づく動力学解析を示す。処理された動力学データセットが示され、滑らかな線は、1：1相互作用モデルに対するデータのグローバルフィットを表す。

【図8】図8は、（A）2F3マウスIgG2a抗体を用い、FAPについて免疫組織化学的に染色された非小細胞肺癌（NSCLC）、（B）2F3マウスIgG2a抗体を用い、FAPについて免疫組織化学的に染色された結腸腺癌、（C）3D9マウスIgG2a抗体を用い、FAPについて免疫組織化学的に染色された結腸腺癌、及び（D）4G8マウスIgG2a抗体を用い、FAPについて免疫組織化学的に染色された結腸腺癌のヒ

トサンプルの代表写真を示す。F A Pは全サンプル中の腫瘍間質において全抗体により検出されるが（左パネル）、一方アイソタイプコントロール抗体について染色は観察されない（右パネル）。

【図 9】図 9 は、F A C S により決定された、ヒト（A）又はマウス（B）の F A P で安定的にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞に発現された F A P に対するヒト I g G 1 抗 F A P 抗体の結合を示す。

【図 10】図 10 は、F A C S により決定される、ヒト I g G 1 抗 F A P 抗体の、安定的にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞上に発現された H E R 2 又は D P P I V（C D 2 6）に対する結合を示す。抗 H E R 2 抗体トラスツズマブと抗 C D 2 6 抗体を陽性コントロールとして使用した。二次抗体、コントロール I g G 又は全く抗体無し（細胞のみ）を陰性コントロールとして用いた。

【図 11】図 11 は、F A C S により決定される、ヒト I g G 1 抗 F A P 抗体の、ヒト線維芽細胞上の（細胞株 G M 0 5 3 8 9）F A P に対する結合を示す。二次抗体、又は全く抗体無しを陰性コントロールとして用いた。

【図 12】図 12 は、F A C S により決定される、ヒト I g G 1 抗 F A P 抗体の、ヒト線維芽細胞上の（細胞株 G M 0 5 3 8 9）異なるヒト腫瘍細胞株、又はヒト F A P により安定的にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞に対する結合を示す。

【図 13】図 13（A）及び（B）は、F A C S により決定される、抗 - F A P ヒト I g G 1 抗体 3 F 2 又は 4 G 8 とともにインキュベーション後の異なる時点での G M 0 5 3 8 9 肺線維芽細胞の表面上の F A P の発現レベルを示す。F A P の内部移行を示す F A P の発現レベルの有意な減少は観察されなかった。二次抗体のみを陰性コントロールとして示す。

【図 14】図 14 は、（A）4 で 45 分間の抗 F A P 4 G 8 I g G の結合後、（B）37 で 20 分間の抗 F A P 4 G 8 I g G の結合後、（C）37 で 1 時間の抗 F A P 4 G 8 I g G の結合後、又は（D）37 で 6 時間の抗 F A P 4 G 8 I g G の結合後に得られた G M 0 5 3 8 9 肺線維芽細胞上の細胞膜染色を示す代表的な免疫蛍光を示す。抗 C D 2 0 抗体 G A 1 0 1 は、アイソタイプコントロールとして使用され、バックグラウンド染色を示す。E E A 1 は初期エンドソームをラベルする。抗 F A P 4 G 8 抗体結合後最長 6 時間までの、F A P 表面細胞膜染色の持続性を注意のこと。

【図 15】図 15 は、野生型 2 8 H 1 ヒト I g G の精製及び分析を示す。A）プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B）サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C）分析的 S D S P A G E。D）分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 16】図 16 は、糖鎖操作 2 8 H 1 ヒト I g G の精製及び分析を示す。A）プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B）サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C）分析的 S D S P A G E。D）分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 17】図 17 は、野生型 2 9 B 1 1 ヒト I g G の精製及び分析を示す。A）プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B）サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C）分析的 S D S P A G E。D）分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 18】図 18 は、糖鎖操作 2 9 B 1 1 ヒト I g G の精製及び分析を示す。A）プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B）サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C）分析的 S D S P A G E。D）分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 19】図 19 は、野生型 3 F 2 ヒト I g G の精製及び分析を示す。A）プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B）サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C）分析的 S D S P A G E。D）分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 20】図 20 は、糖鎖操作 3 F 2 ヒト I g G の精製及び分析を示す。A）プロテイン

ン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B) サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C) 分析的 SDS PAGE。D) 分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 2 1】図 2 1 は、野生型 4 F 8 ヒト Ig G の精製及び分析を示す。A) プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B) サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C) 分析的 SDS PAGE。D) 分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 2 2】図 2 2 は、糖鎖操作 4 F 8 ヒト Ig G の精製及び分析を示す。A) プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー精製工程。B) サイズ排除クロマトグラフィー精製工程。C) 分析的 SDS PAGE。D) 分析的サイズ排除クロマトグラフィー。実験手順は実施例 1 に記載される。

【図 2 3】図 2 3 は、親 4 G 8 抗 F A P 抗体の結合に比較して、親和性成熟抗 F A P 抗体 2 8 H 1 の H E 2 9 3 細胞上のヒト F A P に対する結合を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、標的細胞として H E K 2 9 3 - h F A P 及びエフェクター細胞として P B M N C ( F / F F c R I I I a 遺伝子型) を用いた、抗 F A P I g G 抗体 2 8 H 1 ( 親和性成熟) 及び 4 G 8 , 3 F 8 ( 親) の野生型 ( w t ) および糖鎖操作 ( g e ) バージョンにより媒介される A D C C を試験するための L D H 放出アッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の実施態様の詳細な記述

I. 定義

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン ( V L ) フレームワーク又は重鎖可変ドメイン ( V H ) フレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク” に由来する”アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでもよく、又はそれはアミノ酸配列の変化を含み得る。幾つかの実施態様において、アミノ酸変化の数は、10 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、又は 2 以下である。幾つかの実施態様において、V L アクセプターヒトフレームワークは、V はヒト免疫グロブリンのフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に、配列が同一である。

【0017】

「親和性」とは、分子 ( 例えば、抗体 ) の単一結合部位とその結合パートナー ( 例えば、抗原 ) との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対 ( 例えば、抗体と抗原 ) のメンバー間の 1 : 1 の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般的に、解離の比率である解離定数 (  $K_D$  ) および会合速度定数 ( それぞれ  $k_{off}$  と  $k_{on}$  ) で表すことができる。従って、同等の親和性は、速度定数の比が同じままである限り、別の速度定数を含み得る。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で知られている一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示であって典型的な実施態様は、以下で説明される。

【0018】

「親和性成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数の超可変領域 ( H V R ) ( 例えば C D R ) において一又は複数の改変 ( 例えばアミノ酸変異 ) を持つものである。典型的には、親和性成熟抗体は、親抗体と同じエпитープに結合する。

【0019】

用語「抗 F A P 抗体」及び「線維芽細胞活性化タンパク質 ( F A P ) に結合する抗体」は、抗体が、F A P を標的とし、診断薬剤及び / 又は治療的薬剤として有用であるように

、十分な親和性でFAPに結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗FAP抗体の無関係な、非FAPタンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)又はフローサイトメトリー(FACS)によって測定される場合、抗体のFAPへの結合の約10%未満である。一実施態様において、本発明の抗FAP抗体のDPPiV、FAPに密接に関連するタンパク質(CD26としても知られ; GenBankアクセッション番号P27487)に対する結合の程度は、FACSにより測定される場合、FAPに対する抗体の結合の約15%未満、約10%又は約5%未満である。ある実施態様において、FAPへ結合する抗体は、解離定数( $K_D$ )が、 $1\mu\text{M}$ 、 $100\text{nM}$ 、 $10\text{nM}$ 、 $1\text{nM}$ 、 $0.1\text{nM}$ 、 $0.01\text{nM}$ 、又は $0.001\text{nM}$ (例えば、 $10^{-8}\text{M}$ 未満、例えば、 $10^{-8}\text{M}$ から $10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M}$ から $10^{-13}\text{M}$ )。ある実施態様において、抗FAP抗体は、異なる種由来のFAP間で保存されているFAPのエピトープに結合する。

#### 【0020】

用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。また、Fc領域を有する抗体断片、および免疫グロブリンのFc領域に等価な領域を含む融合タンパク質も含まれる。

#### 【0021】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原を結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SHは、F(ab')<sub>2</sub>、単鎖抗体分子(例えばscFv)、ダイアボディ及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

#### 【0022】

参照抗体として「同一のエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて50%以上、参照抗体のその抗原への結合をブロックする抗体、逆に競合アッセイにおいて50%以上、その抗体のその抗原への結合をブロックするその参照抗体を指す。典型的な競合アッセイが、本明細書において提供される。

#### 【0023】

「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部又は全体に相補的であり特異的に結合する領域を含む抗原結合分子の一部を指す。抗原が大きい場合、抗原結合分子は、エピトープと呼ばれる抗原の特定の部分にのみ結合することができる。抗原結合ドメインは、例えば、一以上の抗体可変ドメイン(抗体可変領域とも呼ばれる)により与えられうる。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域(VL)と抗体重鎖可変領域(VH)を含む。

#### 【0024】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の起源又は種から由来し、一方重鎖及び/又は軽鎖の残りが異なる起源又は種から由来する抗体を指す。キメラ抗体については、例えば、非抗原結合成分は、チンパンジー及びヒトなどの霊長類を含む種のような種に由来し得る。ヒト化抗体は、キメラ抗体の特に好ましい形態である。

#### 【0025】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラスがあり: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、及びこれらのいくつかは、さらにサブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>に、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IGA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、及び $\mu$ と呼ばれる。

#### 【0026】

本明細書で用いられる「細胞傷害性薬物」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞死又は破壊を生ずる物質を指す。細胞傷害性薬物は、限定されないが、放射性同位体(例えば、At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>及びLuの放射性同位体): 化学療法

剤又は薬物（例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤）、増殖阻害剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素など、抗生物質、小分子毒素などの毒素、又は細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素（それらの断片及び/又はその変異体を含む）、及び以下に開示される様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤を包含する。

【0027】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）；貪食；サイトカイン分泌；抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込み；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション；及びB細胞の活性化を含む。

【0028】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。

【0029】

用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。その用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む。一実施態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、Fc領域のC末端リジン（Lys447）は存在しているか、又は存在していない場合がある。本明細書に明記されていない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

【0030】

「免疫グロブリンのFc領域に等価である領域」は、免疫グロブリンのFc領域の天然に存在する対立遺伝子改変体、ならびに置換、付加、または欠失を生じるが、免疫グロブリンがエフェクター機能を媒介する能力（抗体依存的な細胞傷害性）を実質的に減少しない変化を有する改変体を含むことが意図される。例えば、一以上のアミノ酸が、免疫グロブリンのFc領域のN末端またはC末端から、生物学的機能の実質的な損失を伴うことなく、欠失され得る。このような改変体は、活性に対して最小限の効果を有するように、当分野において公知である一般的規則に従って選択され得る（例えば、Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)を参照のこと）。

【0031】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域（HVR）（又はCDR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に4つのFRのドメイン、FR1、FR2、FR3、及びFR4で構成される。従って、HVR及びFR配列は一般にVH（又はVL）の以下の配列に現れる：FR1 - H1（L1） - FR2 - H2（L2） - FR3 - H3（L3） - FR4。

【0032】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、又は本明細書で定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0033】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する一次形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は親細胞と核酸含量が完全に同一ではないかもしれ

ないが、突然変異が含まれる場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異型子孫が本明細書において含まれる。一実施態様において、宿主細胞は、修飾されたオリゴ糖による抗体の産生を可能にするように操作されている。ある実施態様において、宿主細胞は、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼⅠⅠⅠ(GnTⅠⅠⅠ)活性を有する一以上のポリペプチドの増加したレベルを発現するように操作されている。宿主細胞は、培養細胞、例えば、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YOの骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞又はハイブリドーマ細胞などの哺乳類培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、わずかな例を挙げると、しかしまた、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織の中に含まれる細胞も含む。

#### 【0034】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のそれに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

#### 【0035】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般的には、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるサブグループである。一実施態様において、VLについて、サブグループは上掲のKabataらにあるサブグループCUPPIである。一実施態様において、VHについて、サブグループは上掲のKabataらにあるサブグループIIIである。

#### 【0036】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基、及びヒトFR由来アミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。所定の実施態様において、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、HVR(例えば、CDR)の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、全てまたは実質的にFRの全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体の「ヒト化型」、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を遂げた抗体を指す。

#### 【0037】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変であるか、及び/又は構造的に定義されたループ(「超可変ループ」)を形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、天然型4鎖抗体は、VH(H1、H2、H3)に3つ、及びVL(L1、L2、L3)に3つの6つのHVRを含む。HVRは、一般的に超可変ループ由来及び/又は「相補性決定領域」(CDR)由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性であり、及び/又は抗原認識に関与している。VHのCDR1の例外を除いて、CDRは一般的に超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。超可変領域(HVR)は、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれ、これらの用語は、抗原結合領域を形成する可変領域の部分への参照において本明細書で互換的に使用される。この特定の領域は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) and by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)に記述されており、そこで本定義は、相互に対して比較するときアミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。にも関わらず、抗体又はその変異体のCDRを参照するために、何れかの定義の適用は、本明細書において定義され使用される用語の範囲内であることを意図されている。上記の引用文献の各々によって定義されるように、CDRを包含

する適切なアミノ酸残基が、比較として以下の表 1 に記載されている。特定の C D R を包含する正確な残基番号は、C D R の配列や大きさによって異なる。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮して、どの残基が特定の C D R を含むかを日常的に決定することができる。

表 1. CDR 定義<sup>1</sup>

CDR	Kabat	Chothia	AbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-34
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup>表 1 の全ての CDR 定義の番号付けは、Kabat らが定めた番号付けの慣習に従う（下記を参照）。

<sup>2</sup>表 1 に使用されるように小文字の "b" を含む "ABM は" オックスフォード分子の "ABM" 抗体モデリングソフトウェアによって定義される CDR を指す"。

#### 【 0 0 3 8 】

K a b a t らはまた、任意の抗体に適用可能である可変領域配列の番号付けシステムを定義した。当業者は、配列それ自体を超えた任意の実験データに頼ることなく、任意の可変領域配列に対してこの K a b a t の番号付けシステムを一義的に割り当てることができる。本明細書で用いる場合、「K a b a t 番号付け」とは、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983) で明記されている番号付けシステムを指す。特記されない限り、抗体可変領域内の特定のアミノ酸残基の位置の番号付けへの参照は、K a b a t 番号付けシステムに従う。

#### 【 0 0 3 9 】

C D R は、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「S D R」を含む。S D R は、略称 (abbreviated-) C D R、又は a - C D R と呼ばれる、C D R の領域内に含まれている。一般的には、所与の C D R 中の残基のほんの 5 分の 1 から 3 分の 1 が抗原結合に関与している。特定の C D R における特異性決定残基は、例えば、三次元モデリングからの原子間接触の計算及び Padlan et al., FASEB J. 9(1):133-139 (1995) に記載される方法に従って、所定の残基位置における配列変動性の決定によって同定することができる。典型的な a - C D R ( a - C D R - L 1、a - C D R - L 2、a - C D R - L 3、a - C D R - H 1、a - C D R - H 2、及び a - C D R - H 3 ) は、アミノ酸残基 L 1 の 3 1 - 3 4、L 2 の 5 0 - 5 5、L 3 の 8 9 - 9 6、H 1 の 3 1 - 3 5 B、H 2 の 5 0 - 5 8、及び H 3 の 9 5 - 1 0 2 に生じる (Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) を参照)。

#### 【 0 0 4 0 】

「抗体コンジュゲート」は、細胞傷害剤に結合する抗体である。

#### 【 0 0 4 1 】

「個体」又は「被検体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、サルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。所定の実施態様において、個体又は被検体はヒトである。

#### 【 0 0 4 2 】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離されたものである。幾つかの実施態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、S D S - P A G E、等電点電気泳動

( I E F )、キャピラリー電気泳動)又はクロマトグラフィー(例えば、イオン交換又は逆相 H P L C )法により決定されるように、95%以上または99%の純度に精製される。抗体純度の評価法の総説としては、例えばFlatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

【0043】

「単離された」ポリヌクレオチドは、その自然環境の成分から分離されたポリヌクレオチド分子を指す。単離されたポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞に含まれるポリヌクレオチド分子を含むが、しかし、そのポリヌクレオチド分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

【0044】

「抗FAP抗体をコードする単離されたポリヌクレオチド」は、抗体の重鎖及び軽鎖(又はその断片)をコードする一以上のポリヌクレオチド分子を指し、単一のベクター又は別個のベクター内のそのようなポリヌクレオチド分子、及び宿主細胞の一以上の位置に存在するそのようなポリヌクレオチド分子を含む。

【0045】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含み、又はモノクローナル抗体製剤の製造時に発生し、一般的に少量で存在している変異体などの、可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を一般的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。従って、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作成され、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

【0046】

「ネイキッド抗体」とは、異種の部分(例えば、細胞傷害性部分)又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は薬学的製剤中に存在してもよい。

【0047】

「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造をとる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から成る約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)を有し、続いて重鎖定常領域とも呼ばれる3つの定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3)がある。同様に、N末端からC末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)を有し、続いて軽鎖定常領域とも呼ばれる定常軽鎖(CL)ドメインがある。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )とラムダ( )と呼ばれる、2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。

【0048】

「交差反応性が実質的に無い」とは、分子(例えば抗体)が、分子の実際の標的抗原とは異なる抗原(例えば、標的抗原に密接に関連した抗原)を、特にその標的抗原と比較した場合に、認識しないか又は特異的に結合しないことを意味する。例えば、抗体が実際の標的抗原とは異なる抗原に対して約10%未満から約5%未満が結合する場合があります、又は約10%、9%、8%7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、又は0.1%未満、好ましくは約2%、1%又は0.5%未満、最も好ましくは約0.2%又は0.1%未満の、実際の標的抗原とは異なる抗原からなる群から選択される量



において、実際の標的抗原とは異なる前記抗原に結合しうる。

【0049】

用語「パッケージ挿入物」は、効能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情報、及び／又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

【0050】

用語「親」抗体は、変異体の調製のための出発点又は基礎として使用される抗体を指す。

【0051】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入した後、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2もまた、ジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIXのV4.0Dを含む、UNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(或いは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して所定の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムのアラインメントにおいて同一と一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限り、本明細書で使用されるすべての%アミノ酸配列同一性値が、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用し、直前の段落で説明したように、得られる。

【0052】

同様に、本発明の参照ヌクレオチド配列と少なくとも例えば95%「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸又はポリヌクレオチドにより、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列のそれぞれ100ヌクレオチドにつき最大で5つの点変異を含みうることを除けば、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることを意図している。言い換えれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列中のヌクレオチドの5%までが欠失されたり、又は別のヌクレオチド置換され得、または参照配列中の全ヌクレオチドの最大5%までの多数のヌクレオチドが参照配列に挿入され得る。参照配列のこれらの変化は参照ヌクレオチド配列の5'又は3'末

端位置又はそれらの位置の間のどこでも起こり得、参照配列中の残基中に個別に散在するか又は参照配列内における一以上の隣接グループ中に散在している。実際問題として、任意の特定のポリヌクレオチド又はポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるかどうかは、従来法により、上記のもののような既知のコンピュータプログラムを用いて決定することができる。

【0053】

用語「薬学的製剤」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被検体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。

【0054】

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非毒性であり、有効成分以外の製剤処方中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

【0055】

特に断らない限り、本明細書で使用する用語「線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)」は、霊長類 (例えばヒト; GenBankアクセッション番号AAC51668を参照) 及びげっ歯類 (例えば、マウス; GenBankアクセッション番号AAH19190を参照) などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型FAPを指す。その用語は、「完全長」、未処理のFAP並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のFAPを含む。その用語はまた、天然に存在するFAPの変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を包含する。好ましくは、本発明の抗FAP抗体は、FAPの細胞外ドメインに結合する。典型的なヒトFAP外部ドメイン、マウスFAP外部ドメイン及びカニクイザルFAP外部ドメインのアミノ酸配列は (C末端にポリリジン及び6×Hisタグを伴い)、配列番号317、配列番号319及び配列番号321にそれぞれ示される。

【0056】

本明細書で用いられるように、「治療」 (及び「治療する (treat)」または「治療している (treating)」など文法上の変形) は、治療されている個体の疾患の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程においてのいずれかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

【0057】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン (それぞれVHおよびVL) は、4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) と3つの超可変領域 (HVR) を含む各ドメインを持ち、一般的に似たような構造を有する。(例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 91頁 (2007)を参照)。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、相補的なVL又はVHドメインのそれぞれのライブラリーをスクリーニングするために、抗原に特異的に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを用いて単離することができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)を参照。

【0058】

本明細書で使用する、用語「ベクター」は、それがリンクされている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクタ

ーは、それらが動作可能なようにリンクされている核酸の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と言う。

【0059】

本明細書において使用される場合、「GnTII活性を有するポリペプチド」とは、N結合型オリゴ糖のトリマンノシルコアの結合型マンノシドへの1-4結合でのN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の付加を触媒できるポリペプチドを指す。これは、用量依存性を伴うか又は伴わない特定の生物学的アッセイで測定した場合に、生化学と分子生物学の国際連合命名委員会(NC-IUBMB)に従って、-1,4-マンノシル-糖タンパク質の4--N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(EC2.4.1.144)としても知られている(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIIの活性に、必ずしも同一ではないが、類似した酵素活性を示す融合ポリペプチドを含む。用量依存性が存在する場合、それは、GnTIIのものと同様である必要はなく、むしろGnTIIに比べた場合、特定の活性における用量依存性に対して実質的に類似している(すなわち、候補のポリペプチドは、GnTIIに比べて、より大きい活性を示すか又は最高で約25倍以下の活性、好ましくは最高で約10倍以下の活性、及びより最も好ましくは最高で約3倍以下の活性を示し得る)。

【0060】

本明細書において用いられる場合、用語「ゴルジ局在化ドメイン」は、ゴルジ複合体内の位置にポリペプチドを固定するために関与するゴルジ常在性ポリペプチドのアミノ酸配列を指す。一般的に、局在化ドメインは酵素のアミノ末端「尾部」を含む。

【0061】

本明細書で使用される場合、用語、「操作する」、「操作された」、「操作すること」、とりわけ、接頭辞の「glyco-」が付いた用語、ならびに「グリコシル化操作」は、天然に存在するポリペプチド又は組換えポリペプチド又はその断片のグリコシル化パターンの任意の操作を含むと見なされる。グリコシル化操作には、細胞中で発現される糖タンパク質のグリコシル化の変化を達成するためのオリゴ糖合成経路の遺伝子操作を含む、細胞のグリコシル化機構の代謝的操作を含む。さらに、グリコシル化操作は、グリコシル化における変異及び細胞環境の影響を含む。一実施態様において、グリコシル化操作は、糖転移酵素活性の変化である。特定の実施態様では、操作が変更されたグルコサミニル転移酵素活性及び/又はフコース転移酵素活性をもたらす。

【0062】

本明細書で使用される場合、用語、「Fc媒介性細胞傷害性」は、抗体依存性細胞毒性(ADCC)、及びヒトFc領域を含む可溶性Fc融合タンパク質により媒介される細胞障害を含む。それは「ヒト免疫エフェクター細胞」による「標的化細胞」の溶解につながる免疫機構である。

【0063】

本明細書で使用される場合、用語、「ヒト免疫エフェクター細胞」は、それらの表面上にFcレセプターを表示し、それらが抗体又はFc融合タンパク質のFc領域にそれを通して結合し、及びエフェクター機能を実行する白血球の集団である。このような集団には、末梢血単球細胞(PBMC)及び/又はナチュラルキラー(NK)細胞が含まれ得るがこれらに限定されない。

【0064】

本明細書で使用される場合、用語、「標的化細胞」は、Fc領域を含む抗原結合分子(例えば、Fc領域を含む抗体又はその断片)又はFc融合タンパク質によって特異的に結合される細胞である。抗原結合分子又はFc融合タンパク質は、Fc領域に対してN末端であるタンパク質部分を通して標的細胞に結合する。

【0065】

本明細書で使用される場合、用語、「Fc媒介性細胞傷害性の増加」は、標的細胞を取り囲む培地中で、上に定義されたFc媒介性細胞傷害性のメカニズムによって、所定の時間内に、所定の抗体もしくはFc融合タンパク質の濃度で溶解される「標的化細胞」の数の

増加、及び／又はFc媒介性細胞傷害性のメカニズムによって、所定の時間内に、所定の数の「標的化細胞」の溶解を達成するために必要とされる、標的細胞を取り囲む培地中の抗体もしくはFc融合タンパク質の濃度の減少のいずれかとして定義される。Fc媒介性細胞傷害性の増加は、同じ標準的な産生、精製、製剤、及び保存の方法（当業者に公知である）を使用して、同じ抗原結合分子、又は同じ型の宿主細胞によって生産されるFc融合タンパク質により媒介される細胞障害性に比例するが、これは、本明細書に記載される方法によって、改変されたグリコシル化型を有するように（例えば、グリコシルトランスフェラーゼGnTⅠⅠⅠ又は他のグリコシルトランスフェラーゼを発現するように）操作された宿主細胞によって産生されなかった。

#### 【0066】

「抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有する抗体」によって、その用語が本明細書で定義される通り、当業者に公知である任意の適切な方法によって決定される、ADCCの増加を有する抗体が意味される。1つの受容されるインビトロADCCアッセイは以下の通りである。

1) このアッセイは、抗体の抗原結合領域によって認識される標的抗原を発現することが知られている標的細胞を使用する；

2) このアッセイは、エフェクター細胞として、ランダムに選択された健常ドナーの血液から単離されたヒト末梢血単球細胞（PBMC）を使用する；

3) このアッセイは以下のプロトコールに従って使用される。

i) PBMCを、標準的な密度遠心分離手順を使用して単離し、RPMI細胞培養培地中、 $5 \times 10^6$ 細胞/mlで懸濁する；

ii) 標的細胞を、標準的な培養方法によって増殖させ、90%よりも高い生存度を有する指数増殖期から収集し、RPMI細胞培養培地中で洗浄し、100マイクロキュリーの $^{51}\text{Cr}$ で標識し、細胞培養培地で2回洗浄し、そして $10^5$ 細胞/mlの密度で細胞培養培地中に再懸濁する；

iii) 100マイクロリットルの上記の最終的な標的細胞懸濁物を、96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移す；

iv) 抗体を、細胞培養培地中で4000ng/mlから0.04ng/mlまで段階希釈し、得られる抗体溶液の50マイクロリットルを96ウェルマイクロタイタープレート中の標的細胞に加えて、上記の全体の濃度範囲を網羅する種々な抗体濃度を3通りで試験する；

v) 最大放出（MR）コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルは、抗体溶液（上記の要点iv）の代わりに、50マイクロリットルの2%（V/V）非イオン性界面活性剤（Nonidet, Sigma, St. Louis）の水溶液を受容する；

vi) 自発性放出（SR）コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルに、抗体溶液（上記の要点iv）の代わりに、50マイクロリットルのRPMI細胞培養培地を受容する；

vii) 次に、96ウェルマイクロタイタープレートを、 $50 \times g$ で1分間遠心分離し、そして1時間4℃でインキュベートする；

viii) 50マイクロリットルのPBMC懸濁液（上記の要点i）を各ウェルに加えて25:1のエフェクター：標的細胞比を生じ、そしてプレートをインキュベーター中、5%  $\text{CO}_2$  大気、37℃下に4時間配置する；

ix) 各ウェルからの無細胞上清を収集し、実験的に放出された放射能（ER）をガンマカウンターを使用して定量する；

x) 特異的溶解のパーセンテージを、計算式 $(ER - MR) / (MR - SR) \times 100$ に従って各抗体について計算し、ここで、ERは抗体濃度について定量された平均放射能（上記の要点ixを参照のこと）であり、MRはMRコントロール（上記の要点vを参照のこと）についての定量された平均放射能（上記の要点ixを参照のこと）であり、そしてSRはSRコントロール（上記の要点viを参照のこと）についての定量された平

均放射能（上記の要点 i x を参照のこと）である；

４）「ＡＤＣＣの増加」は、上記の試験された抗体濃度範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの増加、及び／又は上記の試験された抗体濃度範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの半分を達成するために必要とされる抗体の濃度の減少のいずれかとして定義される。ＡＤＣＣの増加は、上記のアッセイを用いて測定される、当業者に公知である同じ標準的な産生、精製、製剤、及び保存の方法を使用して、同じ型の宿主細胞によって産生される、同じ型の抗体によって媒介されるＡＤＣＣに比例するが、これは、ＧｎＴＩＩを過剰発現するように操作された宿主細胞によって産生されなかった。

【００６７】

#### ＩＩ．組成物及び方法

線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）は腫瘍の大部分に発現するが、健康な成人の組織には本質的に存在せず、従って、この抗原を標的とする抗体は大きな治療的可能性を有する。本発明は、ＦＡＰに結合する抗体、特に高い親和性と強いエフェクター機能を持つ抗体を提供する。本発明の抗体は、例えば、癌など、ＦＡＰの発現によって特徴付けられる疾患の診断又は治療のために有用である。

【００６８】

#### Ａ．典型的な抗ＦＡＰ抗体

本発明は、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的に結合する抗体を提供する。特に、本発明は、ＦＡＰに特異的に結合する抗体を提供し、ここで前記抗体はエフェクター機能を増加させるように糖鎖を操作されている。

【００６９】

一実施態様において、本発明の抗ＦＡＰ抗体は、配列番号３，配列番号５，配列番号７，配列番号９，配列番号１１，配列番号１３，配列番号１５，配列番号１７，配列番号１９，配列番号２１，配列番号２３，配列番号２５，配列番号２７，配列番号２９，配列番号３１，配列番号３３，配列番号３５，配列番号３７，配列番号３９，配列番号４１，配列番号４３，配列番号４５，配列番号４７，配列番号４９，配列番号５１，配列番号５３，配列番号５５，配列番号５７，配列番号５９，配列番号６１，配列番号６３，配列番号６５，配列番号６７，配列番号６９，配列番号７１，配列番号７３，配列番号７５，配列番号７７，配列番号７９，配列番号８１，配列番号８３，配列番号８５，配列番号８７，配列番号８９，配列番号９１，配列番号９３，配列番号９５，配列番号９７，配列番号９９，配列番号１０１，配列番号１０３，配列番号１０５，配列番号１０７，配列番号１０９，配列番号１１１，配列番号１１３，配列番号１１５，配列番号１１７，配列番号１１９，配列番号１２１，配列番号１２３，配列番号１２５，配列番号１２７，配列番号１２９，配列番号１３１，配列番号１３３，配列番号１３５，配列番号１３７，配列番号１３９，配列番号１４１，配列番号１４３，配列番号１４５，配列番号１４７，配列番号１４９，配列番号１５１，配列番号１５３，配列番号１５５，配列番号１５７，配列番号１５９，配列番号１６１，配列番号１６３，配列番号１６５，配列番号１６７，配列番号１６９，配列番号１７１，配列番号１７３，配列番号１７５，及び配列番号１７７の群から選択される少なくとも一の（例えば、１、２、３、４、５、又は６の）重鎖又は軽鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）、又は前記ＣＤＲに対する少なくとも一の特異性決定残基（ＳＤＲ）を含むそれらの変異体又は切断型を含む。

【００７０】

一実施態様において、前記少なくとも一のＣＤＲは重鎖ＣＤＲであり、特に、配列番号１３５、配列番号１３７、配列番号１３９、配列番号１４１の群から選択される重鎖ＣＤＲ３である。別の実施態様において、抗体は少なくとも一の重鎖ＣＤＲ及び少なくとも一の軽鎖ＣＤＲを含み、特に配列番号１３５、配列番号１３７、配列番号１３９、配列番号１４１の群から選ばれる重鎖ＣＤＲ３、及び配列番号１６３、配列番号１６５、配列番号１６７、配列番号１６９、配列番号１７１、配列番号１７３、配列番号１７５及び配列番号１７７の群から選ばれる軽鎖ＣＤＲ３を含む。

## 【 0 0 7 1 】

一実施態様において、本発明の抗体は、(a)配列番号3, 配列番号5, 配列番号7, 配列番号9, 配列番号11, 配列番号13, 配列番号15, 配列番号17, 配列番号19, 配列番号21, 配列番号23, 配列番号25, 配列番号27, 配列番号29, 配列番号31, 及び配列番号33の群から選択されるアミノ酸配列を含むHCDR1; (b)配列番号35, 配列番号37, 配列番号39, 配列番号41, 配列番号43, 配列番号45, 配列番号47, 配列番号49, 配列番号51, 配列番号53, 配列番号55, 配列番号57, 配列番号59, 配列番号61, 配列番号63, 配列番号65, 配列番号67, 配列番号69, 配列番号71, 配列番号73, 配列番号75, 配列番号77, 配列番号79, 配列番号81, 配列番号83, 配列番号85, 配列番号87, 配列番号89, 配列番号91, 配列番号93, 配列番号95, 配列番号97, 配列番号99, 配列番号101, 配列番号103, 配列番号105, 配列番号107, 配列番号109, 配列番号111, 配列番号113, 配列番号115, 配列番号117, 配列番号119, 配列番号121, 配列番号123, 配列番号125, 配列番号127, 配列番号129, 配列番号131, 及び配列番号133の群から選択されるアミノ酸配列を含むHCDR2; 及び(c)配列番号135, 配列番号137, 配列番号139, 及び配列番号141の群から選択されるアミノ酸配列を含むHCDR3から選択される少なくとも一、少なくとも二、又は三つ全ての重鎖CDR(HCDR)を含む。更なる実施態様において、本抗体は、(a)配列番号3, 配列番号5, 配列番号7, 配列番号9, 配列番号11, 配列番号13, 配列番号15, 配列番号17, 配列番号19, 配列番号21, 配列番号23, 配列番号25, 配列番号27, 配列番号29, 配列番号31, 及び配列番号33の群から選択される重鎖CDR1; (b)配列番号35, 配列番号37, 配列番号39, 配列番号41, 配列番号43, 配列番号45, 配列番号47, 配列番号49, 配列番号51, 配列番号53, 配列番号55, 配列番号57, 配列番号59, 配列番号61, 配列番号63, 配列番号65, 配列番号67, 配列番号69, 配列番号71, 配列番号73, 配列番号75, 配列番号77, 配列番号79, 配列番号81, 配列番号83, 配列番号85, 配列番号87, 配列番号89, 配列番号91, 配列番号93, 配列番号95, 配列番号97, 配列番号99, 配列番号101, 配列番号103, 配列番号105, 配列番号107, 配列番号109, 配列番号111, 配列番号113, 配列番号115, 配列番号117, 配列番号119, 配列番号121, 配列番号123, 配列番号125, 配列番号127, 配列番号129, 配列番号131, 及び配列番号133の群から選択される重鎖CDR2; 及び配列番号135, 配列番号137, 配列番号139, 及び配列番号141の群から選択される重鎖CDR3、又は前記CDRに対する少なくともSDRを含むそれらの変異体又は切断型を含む。

## 【 0 0 7 2 】

一実施態様において、本発明の抗体は、(a)配列番号143, 配列番号145, 配列番号147, 及び配列番号149の群から選択されるアミノ酸配列を含むLCDR1; (b)配列番号151, 配列番号153, 配列番号155, 配列番号157, 配列番号159, 及び配列番号161の群から選択されるアミノ酸配列を含むLCDR2; 及び(c)配列番号163, 配列番号165, 配列番号167, 配列番号169, 配列番号171, 配列番号173, 配列番号175, 及び配列番号177の群から選択されるアミノ酸配列を含むLCDR3から選択される少なくとも一、少なくとも二、又は三つ全ての軽鎖CDR(LCDR)を含む。更なる実施態様において、本抗体は、(a)配列番号143, 配列番号145, 配列番号147, 及び配列番号149の群から選択される軽鎖CDR1; (b)配列番号151, 配列番号153, 配列番号155, 配列番号157, 配列番号159, 及び配列番号161の群から選択される軽鎖CDR2; 及び(c)配列番号163, 配列番号165, 配列番号167, 配列番号169, 配列番号171, 配列番号173, 配列番号175, 及び配列番号177の群から選択される軽鎖CDR3、又は前記CDRに対する少なくともSDRを含むそれらの変異体又は切断型を含む軽鎖可変領域を含む。

## 【 0 0 7 3 】

より特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3，配列番号 5，配列番号 7，配列番号 9，配列番号 11，配列番号 13，配列番号 15，配列番号 17，配列番号 19，配列番号 21，配列番号 23，配列番号 25，配列番号 27，配列番号 29，配列番号 31，及び配列番号 33 の群から選択される重鎖 CDR1；配列番号 35，配列番号 37，配列番号 39，配列番号 41，配列番号 43，配列番号 45，配列番号 47，配列番号 49，配列番号 51，配列番号 53，配列番号 55，配列番号 57，配列番号 59，配列番号 61，配列番号 63，配列番号 65，配列番号 67，配列番号 69，配列番号 71，配列番号 73，配列番号 75，配列番号 77，配列番号 79，配列番号 81，配列番号 83，配列番号 85，配列番号 87，配列番号 89，配列番号 91，配列番号 93，配列番号 95，配列番号 97，配列番号 99，配列番号 101，配列番号 103，配列番号 105，配列番号 107，配列番号 109，配列番号 111，配列番号 113，配列番号 115，配列番号 117，配列番号 119，配列番号 121，配列番号 123，配列番号 125，配列番号 127，配列番号 129，配列番号 131，及び配列番号 133 の群から選択される重鎖 2；及び配列番号 135，配列番号 137，配列番号 139，及び配列番号 141 の群から選択される重鎖 CDR3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 143，配列番号 145，配列番号 147，及び配列番号 149 の群から選択される軽鎖 CDR1；配列番号 151，配列番号 153，配列番号 155，配列番号 157，配列番号 159，及び配列番号 161 の群から選択される軽鎖 CDR2、及び配列番号 163，配列番号 165，配列番号 167，配列番号 169，配列番号 171，配列番号 173，配列番号 175，及び配列番号 177 の群から選択される軽鎖 CDR3 を含む軽鎖可変領域、又は前記 CDR に対する少なくとも SDR を含むそれらの変異体又は切断型を含む。

【0074】

他の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3，配列番号 5，配列番号 7，配列番号 9，配列番号 11，配列番号 13，配列番号 15，配列番号 17，配列番号 19，配列番号 21，配列番号 23，配列番号 25，配列番号 27，配列番号 29，配列番号 31，及び配列番号 33 の群から選択される重鎖 CDR1；配列番号 35，配列番号 37，配列番号 39，配列番号 41，配列番号 43，配列番号 45，配列番号 47，配列番号 49，配列番号 51，配列番号 53，配列番号 55，配列番号 57，配列番号 59，配列番号 61，配列番号 63，配列番号 65，配列番号 67，配列番号 69，配列番号 71，配列番号 73，配列番号 75，配列番号 77，配列番号 79，配列番号 81，配列番号 83，配列番号 85，配列番号 87，配列番号 89，配列番号 91，配列番号 93，配列番号 95，配列番号 97，配列番号 99，配列番号 101，配列番号 103，配列番号 105，配列番号 107，配列番号 109，配列番号 111，配列番号 113，配列番号 115，配列番号 117，配列番号 119，配列番号 121，配列番号 123，配列番号 125，配列番号 127，配列番号 129，配列番号 131，及び配列番号 133 の群から選択される重鎖 2；及び配列番号 135，配列番号 137，配列番号 139，及び配列番号 141 の群から選択される重鎖 CDR3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 143，配列番号 145，配列番号 147，及び配列番号 149 の群から選択される軽鎖 CDR1；配列番号 151，配列番号 153，配列番号 155，配列番号 157，配列番号 159，及び配列番号 161 の群から選択される軽鎖 CDR2、及び配列番号 163，配列番号 165，配列番号 167，配列番号 169，配列番号 171，配列番号 173，配列番号 175，及び配列番号 177 の群から選択される軽鎖 CDR3 を含む軽鎖可変領域を含み、ここで、前記 CDR の少なくとも一は、配列番号 7，配列番号 9，配列番号 11，配列番号 17，配列番号 19，配列番号 21，配列番号 29，配列番号 31，配列番号 33，配列番号 43，配列番号 45，配列番号 47，配列番号 49，配列番号 51，配列番号 53，配列番号 55，配列番号 57，配列番号 59，配列番号 61，配列番号 63，配列番号 65，配列番号 67，配列番号 77，配列番号 79，配列番号 81，配列番号 83，配列番号 85，配列番号 87，配列番号 89，配列番号 91，配列番号 93，配列番号 95，配列番号 97，配列番号 99，配列番号 109，配列番号 111，配列番号 113，配列番号 115，配列番号 117，配列番号 119，配列番号 121，配列番号 123，配列番号 1

2 5 , 配列番号 1 2 7 , 配列番号 1 2 9 , 配列番号 1 3 1 , 配列番号 1 3 3 及び配列番号 1 7 7 の群から選択される。

【 0 0 7 5 】

他の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3 , 配列番号 5 , 配列番号 7 , 配列番号 9 , 配列番号 1 1 , 配列番号 1 3 , 配列番号 1 5 , 配列番号 1 7 , 配列番号 1 9 , 配列番号 2 1 , 配列番号 2 3 , 配列番号 2 5 , 配列番号 2 7 , 配列番号 2 9 , 配列番号 3 1 , 及び配列番号 3 3 の群から選択される重鎖 C D R 1 ; 配列番号 3 5 , 配列番号 3 7 , 配列番号 3 9 , 配列番号 4 1 , 配列番号 4 3 , 配列番号 4 5 , 配列番号 4 7 , 配列番号 4 9 , 配列番号 5 1 , 配列番号 5 3 , 配列番号 5 5 , 配列番号 5 7 , 配列番号 5 9 , 配列番号 6 1 , 配列番号 6 3 , 配列番号 6 5 , 配列番号 6 7 , 配列番号 6 9 , 配列番号 7 1 , 配列番号 7 3 , 配列番号 7 5 , 配列番号 7 7 , 配列番号 7 9 , 配列番号 8 1 , 配列番号 8 3 , 配列番号 8 5 , 配列番号 8 7 , 配列番号 8 9 , 配列番号 9 1 , 配列番号 9 3 , 配列番号 9 5 , 配列番号 9 7 , 配列番号 9 9 , 配列番号 1 0 1 , 配列番号 1 0 3 , 配列番号 1 0 5 , 配列番号 1 0 7 , 配列番号 1 0 9 , 配列番号 1 1 1 , 配列番号 1 1 3 , 配列番号 1 1 5 , 配列番号 1 1 7 , 配列番号 1 1 9 , 配列番号 1 2 1 , 配列番号 1 2 3 , 配列番号 1 2 5 , 配列番号 1 2 7 , 配列番号 1 2 9 , 配列番号 1 3 1 , 及び配列番号 1 3 3 の群から選択される重鎖 2 ; 及び配列番号 1 3 5 , 配列番号 1 3 7 , 配列番号 1 3 9 , 及び配列番号 1 4 1 の群から選択される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 3 , 配列番号 1 4 5 , 配列番号 1 4 7 , 及び配列番号 1 4 9 の群から選択される軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 1 5 1 , 配列番号 1 5 3 , 配列番号 1 5 5 , 配列番号 1 5 7 , 配列番号 1 5 9 , 及び配列番号 1 6 1 の群から選択される軽鎖 C D R 2 、及び配列番号 1 6 3 , 配列番号 1 6 5 , 配列番号 1 6 7 , 配列番号 1 6 9 , 配列番号 1 7 1 , 配列番号 1 7 3 , 配列番号 1 7 5 , 及び配列番号 1 7 7 の群から選択される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含み、ここで、前記 C D R の少なくとも一は、配列番号 3 , 配列番号 5 , 配列番号 1 3 , 配列番号 1 5 , 配列番号 2 3 , 配列番号 2 5 , 配列番号 2 7 , 配列番号 3 5 , 配列番号 3 7 , 配列番号 3 9 , 配列番号 4 1 , 配列番号 6 9 , 配列番号 7 1 , 配列番号 7 3 , 配列番号 7 5 , 配列番号 1 0 1 , 配列番号 1 0 3 , 配列番号 1 0 5 , 配列番号 1 0 7 , 配列番号 1 3 5 , 配列番号 1 3 7 , 配列番号 1 3 9 , 配列番号 1 4 1 , 配列番号 1 4 3 , 配列番号 1 4 5 , 配列番号 1 4 7 , 配列番号 1 4 9 , 配列番号 1 5 1 , 配列番号 1 5 3 , 配列番号 1 5 5 , 配列番号 1 5 7 , 配列番号 1 5 9 , 配列番号 1 6 1 , 配列番号 1 6 3 , 配列番号 1 6 5 , 配列番号 1 6 7 , 配列番号 1 6 9 , 配列番号 1 7 1 , 配列番号 1 7 3 , 及び配列番号 1 7 5 の群から選択される C D R では無い。

【 0 0 7 6 】

他の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3 , 配列番号 5 , 配列番号 1 3 , 配列番号 1 5 , 配列番号 2 3 , 配列番号 2 5 , 及び配列番号 2 7 の群から選択される重鎖 C D R 1 ; 配列番号 3 5 , 配列番号 3 7 , 配列番号 3 9 , 配列番号 4 1 , 配列番号 6 9 , 配列番号 7 1 , 配列番号 7 3 , 配列番号 7 5 , 配列番号 1 0 1 , 配列番号 1 0 3 , 配列番号 1 0 5 , 及び配列番号 1 0 7 の群から選択される重鎖 C D R 2 ; 配列番号 1 3 5 , 配列番号 1 3 7 , 配列番号 1 3 9 , 及び配列番号 1 4 1 の群から選択される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 3 , 配列番号 1 4 5 , 配列番号 1 4 7 , 及び配列番号 1 4 9 の群から選択される軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 1 5 1 , 配列番号 1 5 3 , 配列番号 1 5 5 , 配列番号 1 5 7 , 配列番号 1 5 9 , 及び配列番号 1 6 1 の群から選択される軽鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 1 6 3 , 配列番号 1 6 5 , 配列番号 1 6 7 , 配列番号 1 6 9 , 配列番号 1 7 1 , 配列番号 1 7 3 , 及び配列番号 1 7 5 の群から選択される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変又は前記 C D R に対する少なくとも S D R を含むそれらの変異体又は切断型を含む。

【 0 0 7 7 】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3 、配列番号 1 3 、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1 ; 配列番号 3 5 , 配列番号 6 9 , 及び配列番号 1 0 1 の群から選択される重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 1 3 5 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変



領域、及び配列番号 1 4 3 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 1 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 3 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 3 7，配列番号 7 1，及び配列番号 1 0 3 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 7 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 5 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 3 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 5 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。さらに別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 3 5，配列番号 6 9，及び配列番号 1 0 1 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 7 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 7 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 5 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 3 9，配列番号 7 3，及び配列番号 1 0 5 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 5 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 5 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 3 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 9 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 3 5，配列番号 6 9，及び配列番号 1 0 1 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 7 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 9 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 7 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。他の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3，配列番号 7，配列番号 1 3，配列番号 1 7，配列番号 2 3，及び配列番号 2 9 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 4 3，配列番号 4 5，配列番号 4 7，配列番号 4 9，配列番号 5 1，配列番号 5 3，配列番号 5 5，配列番号 5 7，配列番号 5 9，配列番号 6 3，配列番号 6 5，配列番号 7 7，配列番号 7 9，配列番号 8 1，配列番号 8 3，配列番号 8 5，配列番号 8 7，配列番号 8 9，配列番号 9 1，配列番号 9 3，配列番号 9 7，配列番号 1 0 9，配列番号 1 1 1，配列番号 1 1 3，配列番号 1 1 5，配列番号 1 1 7，配列番号 1 1 9，配列番号 1 2 1，配列番号 1 2 3，配列番号 1 2 5，配列番号 1 2 9，及び配列番号 1 3 1 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 5 の重鎖 C D R 3、ならびに配列番号 1 4 3 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 1 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。更に特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 9，配列番号 1 1，配列番号 1 9，配列番号 2 1，配列番号 3 1，及び配列番号 3 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 6 1，配列番号 6 7，配列番号 9 5，配列番号 9 9，配列番号 1 2 7，及び配列番号 1 3 3 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 7 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 7 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 5 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。更に特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 3 5，配列番号 6 9，及び配列番号 1 0 1 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 5 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 3 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 1 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 7 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。更に特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 4 3，配列番号 7 7，及び配列番号 1 0 9 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 5 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 3 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 1 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 3 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。更に特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 1 3、及び配列番号 2 3 の群から選択される重鎖 C D R 1；配列番号 4 5，配列番号 7 9，及び配列番号 1 1 1 の群から選択される重鎖 C D R 2；及び配列番号 1 3 5 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 4 3 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 1 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 3 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。更に特定の実施態

様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 13、及び配列番号 23 の群から選択される重鎖 CDR1；配列番号 65，配列番号 89，及び配列番号 131 の群から選択される重鎖 CDR2；及び配列番号 135 の重鎖 CDR3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 143 の軽鎖 CDR1、配列番号 151 の軽鎖 CDR2、及び配列番号 163 の軽鎖 CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む。更に特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3、配列番号 13、及び配列番号 23 の群から選択される重鎖 CDR1；配列番号 47，配列番号 81，及び配列番号 113 の群から選択される重鎖 CDR2；及び配列番号 135 の重鎖 CDR3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 143 の軽鎖 CDR1、配列番号 151 の軽鎖 CDR2、及び配列番号 163 の軽鎖 CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む。更に特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 9、配列番号 19、及び配列番号 31 の群から選択される重鎖 CDR1；配列番号 61，配列番号 95，及び配列番号 127 の群から選択される重鎖 CDR2；及び配列番号 137 の重鎖 CDR3 を含む重鎖可変領域、及び配列番号 147 の軽鎖 CDR1、配列番号 155 の軽鎖 CDR2、及び配列番号 167 の軽鎖 CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む。

#### 【0078】

一実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 197，配列番号 201，配列番号 203，配列番号 207，配列番号 211，配列番号 215，配列番号 219，配列番号 223，配列番号 227，配列番号 231，配列番号 235，配列番号 239，配列番号 243，配列番号 247，配列番号 251，配列番号 255，配列番号 259，配列番号 263，配列番号 267，配列番号 271，配列番号 275，配列番号 279，配列番号 283，配列番号 287，配列番号 291，配列番号 295，配列番号 299，配列番号 303，配列番号 307，及び配列番号 311 の群から選択される配列に対して、少なくともおよそ 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%、又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。一実施態様において、抗体は、配列番号 197，配列番号 201，配列番号 203，配列番号 207，配列番号 211，配列番号 215，配列番号 219，配列番号 223，配列番号 227，配列番号 231，配列番号 235，配列番号 239，配列番号 243，配列番号 247，配列番号 251，配列番号 255，配列番号 259，配列番号 263，配列番号 267，配列番号 271，配列番号 275，配列番号 279，配列番号 283，配列番号 287，配列番号 291，配列番号 295，配列番号 299，配列番号 303，配列番号 307，及び配列番号 311 の群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

#### 【0079】

ある実施態様において、少なくとも 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%、又は 99% の同一性を有する VH 配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗 FAP 抗体は、FAP へ結合する能力を保持する。ある実施態様において、計 1 から 10 のアミノ酸が、配列番号 197，201，203，207，211，215，219，223，227，231，235，239，243，247，251，255，259，263，267，271，275，279，283，287，291，295，299，303，307 又は 311 において置換、挿入、及び / 又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR 又は CDR 外の（すなわち FR 内の）領域で生じる。任意で、本発明による抗 FAP 抗体は、配列番号 197，201，203，207，211，215，219，223，227，231，235，239，243，247，251，255，259，263，267，271，275，279，283，287，291，295，299，303，307 又は 311 の VH 配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。特定の実施態様において、VH は、HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 について、配列番号 3，5，7，9，11，13，15，17，19，21，23，25，27，29，31，33，35，37，39，41，43，45，47，49，51，53，55，57，59，61，63，65，67，69，71，73，75，77，79，81，83，85，87，89，91，93，95，97，99，101，103，105

、 1 0 7、1 0 9、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9 及び 1 4 1 に明記される配列から選択される 1 つ、2 つ、又は 3 つの重鎖 C D R を含む。

【 0 0 8 0 】

別の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 1 9 3、配列番号 1 9 5、配列番号 1 9 9、配列番号 2 0 5、配列番号 2 0 9、配列番号 2 1 3、配列番号 2 1 7、配列番号 2 2 1、配列番号 2 2 5、配列番号 2 2 9、配列番号 2 3 3、配列番号 2 3 7、配列番号 2 4 1、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 3、配列番号 2 5 7、配列番号 2 6 1、配列番号 2 6 5、配列番号 2 6 9、配列番号 2 7 3、配列番号 2 7 7、配列番号 2 8 1、配列番号 2 8 5、配列番号 2 8 9、配列番号 2 9 3、配列番号 2 9 7、配列番号 3 0 1、配列番号 3 0 5、及び配列番号 3 0 9 の群から選択される配列に対して、少なくともおよそ 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。さらに別の実施態様において、抗体は、配列番号 1 9 3、配列番号 1 9 5、配列番号 1 9 9、配列番号 2 0 5、配列番号 2 0 9、配列番号 2 1 3、配列番号 2 1 7、配列番号 2 2 1、配列番号 2 2 5、配列番号 2 2 9、配列番号 2 3 3、配列番号 2 3 7、配列番号 2 4 1、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 3、配列番号 2 5 7、配列番号 2 6 1、配列番号 2 6 5、配列番号 2 6 9、配列番号 2 7 3、配列番号 2 7 7、配列番号 2 8 1、配列番号 2 8 5、配列番号 2 8 9、配列番号 2 9 3、配列番号 2 9 7、配列番号 3 0 1、配列番号 3 0 5、及び配列番号 3 0 9 の群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 8 1 】

ある実施態様において、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有する V L 配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗 F A P 抗体は、F A P へ結合する能力を保持する。ある実施態様において、計 1 から 1 0 のアミノ酸が、配列番号 1 9 3、1 9 5、1 9 9、2 0 5、2 0 9、2 1 3、2 1 7、2 2 1、2 2 5、2 2 9、2 3 3、2 3 7、2 4 1、2 4 5、2 4 9、2 5 3、2 5 7、2 6 1、2 6 5、2 6 9、2 7 3、2 7 7、2 8 1、2 8 5、2 8 9、2 9 3、2 9 7、3 0 1、3 0 5 又は 3 0 9 において置換、挿入、及び / 又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、H V R 又は C D R 外の（すなわち F R 内の）領域で生じる。任意で、本発明の抗 F A P 抗体は、配列番号 1 9 3、1 9 5、1 9 9、2 0 5、2 0 9、2 1 3、2 1 7、2 2 1、2 2 5、2 2 9、2 3 3、2 3 7、2 4 1、2 4 5、2 4 9、2 5 3、2 5 7、2 6 1、2 6 5、2 6 9、2 7 3、2 7 7、2 8 1、2 8 5、2 8 9、2 9 3、2 9 7、3 0 1、3 0 5 又は 3 0 9 の V L 配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。特定の実施態様において、V L は、L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 について、配列番号 1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 5 7、1 5 9、1 6 1、1 6 3、1 6 5、1 6 7、1 6 9、1 7 1、1 7 3、1 7 5 及び 1 7 7 に記載の配列から選択される、1 つ、2 つ、又は 3 つの軽鎖 C D R を含む。

【 0 0 8 2 】

その他の態様において、抗 F A P 抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにある V H、及び上記に与えられた実施態様の何れかにある V L を含む。一実施態様において、本抗体は、配列番号 1 9 7、配列番号 2 0 1、配列番号 2 0 3、配列番号 2 0 7、配列番号 2 1 1、配列番号 2 1 5、配列番号 2 1 9、配列番号 2 2 3、配列番号 2 2 7、配列番号 2 3 1、配列番号 2 3 5、配列番号 2 3 9、配列番号 2 4 3、配列番号 2 4 7、配列番号 2 5 1、配列番号 2 5 5、配列番号 2 5 9、配列番号 2 6 3、配列番号 2 6 7、配列番号 2 7 1、配列番号 2 7 5、配列番号 2 7 9、配列番号 2 8 3、配列番号 2 8 7、配列番号 2 9 1、配列番号 2 9 5、配列番号 2 9 9、配列番号 3 0 3、配列番号 3 0 7、及び配列番号 3 1 1 の群から選択される配列に対して、少なくともおよそ 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 3、配列番号 1

9 5 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 4 1 , 配列番号 2 4 5 , 配列番号 2 4 9 , 配列番号 2 5 3 , 配列番号 2 5 7 , 配列番号 2 6 1 , 配列番号 2 6 5 , 配列番号 2 6 9 , 配列番号 2 7 3 , 配列番号 2 7 7 , 配列番号 2 8 1 , 配列番号 2 8 5 , 配列番号 2 8 9 , 配列番号 2 9 3 , 配列番号 2 9 7 , 配列番号 3 0 1 , 配列番号 3 0 5 , 及び配列番号 3 0 9 の群から選択される配列に対して、少なくともおよそ 9 0 % , 9 1 % , 9 2 % , 9 3 % , 9 4 % , 9 5 % , 9 6 % , 9 7 % , 9 8 % , 9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一実施態様において、本抗体は、配列番号 1 9 7 , 2 0 1 , 2 0 3 , 2 0 7 , 2 1 1 , 2 1 5 , 2 1 9 , 2 2 3 , 2 2 7 , 2 3 1 , 2 3 5 , 2 3 9 , 2 4 3 , 2 4 7 , 2 5 1 , 2 5 5 , 2 5 9 , 2 6 3 , 2 6 7 , 2 7 1 , 2 7 5 , 2 7 9 , 2 8 3 , 2 8 7 , 2 9 1 , 2 9 5 , 2 9 9 , 3 0 3 , 3 0 7 又は 3 1 1 及び配列番号 1 9 3 , 1 9 5 , 1 9 9 , 2 0 5 , 2 0 9 , 2 1 3 , 2 1 7 , 2 2 1 , 2 2 5 , 2 2 9 , 2 3 3 , 2 3 7 , 2 4 1 , 2 4 5 , 2 4 9 , 2 5 3 , 2 5 7 , 2 6 1 , 2 6 5 , 2 6 9 , 2 7 3 , 2 7 7 , 2 8 1 , 2 8 5 , 2 8 9 , 2 9 3 , 2 9 7 , 3 0 1 , 3 0 5 又は 3 0 9 においてそれぞれ V H 配列及び V L 配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

#### 【 0 0 8 3 】

一実施態様において、本抗体は、配列番号 1 9 7 , 配列番号 2 0 1 , 配列番号 2 0 3 , 配列番号 2 0 7 , 配列番号 2 1 1 , 配列番号 2 1 5 , 配列番号 2 1 9 , 配列番号 2 2 3 , 配列番号 2 2 7 , 配列番号 2 3 1 , 配列番号 2 3 5 , 配列番号 2 3 9 , 配列番号 2 4 3 , 配列番号 2 4 7 , 配列番号 2 5 1 , 配列番号 2 5 5 , 配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 2 9 5 , 配列番号 2 9 9 , 配列番号 3 0 3 , 配列番号 3 0 7 , 及び配列番号 3 1 1 の群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 3 , 配列番号 1 9 5 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 4 1 , 配列番号 2 4 5 , 配列番号 2 4 9 , 配列番号 2 5 3 , 配列番号 2 5 7 , 配列番号 2 6 1 , 配列番号 2 6 5 , 配列番号 2 6 9 , 配列番号 2 7 3 , 配列番号 2 7 7 , 配列番号 2 8 1 , 配列番号 2 8 5 , 配列番号 2 8 9 , 配列番号 2 9 3 , 配列番号 2 9 7 , 配列番号 3 0 1 , 配列番号 3 0 5 , 及び配列番号 3 0 9 の群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここで前記可変領域の少なくとも一は、配列番号 1 9 3 , 配列番号 1 9 5 , 配列番号 1 9 7 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 1 , 配列番号 2 0 3 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 7 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 1 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 5 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 1 9 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 3 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 7 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 1 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 5 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 3 9 , 配列番号 2 4 1 , 配列番号 2 4 3 , 配列番号 2 4 5 , 配列番号 2 4 7 , 配列番号 2 4 9 , 配列番号 2 5 1 , 配列番号 2 5 3 , 及び配列番号 2 5 5 の群から選択されるアミノ酸配列を含まない。

#### 【 0 0 8 4 】

一実施態様において、本抗体は、配列番号 1 9 7 , 配列番号 2 0 1 , 配列番号 2 0 3 , 配列番号 2 0 7 , 配列番号 2 1 1 , 配列番号 2 1 5 , 配列番号 2 1 9 , 配列番号 2 2 3 , 配列番号 2 2 7 , 配列番号 2 3 1 , 配列番号 2 3 5 , 配列番号 2 3 9 , 配列番号 2 4 3 , 配列番号 2 4 7 , 配列番号 2 5 1 , 配列番号 2 5 5 , 配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 2 9 5 , 配列番号 2 9 9 , 配列番号 3 0 3 , 配列番号 3 0 7 , 及び配列番号 3 1 1 の群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 3 , 配列番号 1 9 5 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 4 1 , 配列番号 2 4 5 , 配列番号

2 4 9 , 配列番号 2 5 3 , 配列番号 2 5 7 , 配列番号 2 6 1 , 配列番号 2 6 5 , 配列番号 2 6 9 , 配列番号 2 7 3 , 配列番号 2 7 7 , 配列番号 2 8 1 , 配列番号 2 8 5 , 配列番号 2 8 9 , 配列番号 2 9 3 , 配列番号 2 9 7 , 配列番号 3 0 1 , 配列番号 3 0 5 , 及び配列番号 3 0 9 の群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここで、前記可変領域の少なくとも一は配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 2 9 3 , 配列番号 2 9 9 , 配列番号 3 0 3 , 配列番号 3 0 7 , 及び配列番号 3 1 1 の群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 5 】

一実施態様において、本抗体は、配列番号 1 9 7 , 配列番号 2 0 1 , 配列番号 2 0 3 , 配列番号 2 0 7 , 配列番号 2 1 1 , 配列番号 2 1 5 , 配列番号 2 1 9 , 配列番号 2 2 3 , 配列番号 2 2 7 , 配列番号 2 3 1 , 配列番号 2 3 5 , 配列番号 2 3 9 , 配列番号 2 4 3 , 配列番号 2 4 7 , 配列番号 2 5 1 , 及び配列番号 2 5 5 の群から選択される配列に対して、少なくともおよそ 9 0 % , 9 1 % , 9 2 % , 9 3 % , 9 4 % , 9 5 % , 9 6 % , 9 7 % , 9 8 % , 9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 3 , 配列番号 1 9 5 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 4 1 , 配列番号 2 4 5 , 配列番号 2 4 9 , 及び配列番号 2 5 3 の群から選択される配列に対して、少なくともおよそ 9 0 % , 9 1 % , 9 2 % , 9 3 % , 9 4 % , 9 5 % , 9 6 % , 9 7 % , 9 8 % , 9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 8 6 】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 3 又は配列番号 1 9 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。その他の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 0 1 又は配列番号 2 0 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。更に別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 0 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 0 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。更に別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 2 9 9 , 配列番号 3 0 3 , 配列番号 3 0 7 , 及び配列番号 3 1 1 の群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は配列番号 2 9 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施態様において、本発明の抗体は、a ) 配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 3 0 3 , 及び配列番号 3 0 7 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は b ) 配列番号 2 9 9 又は配列番号 3 1 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 0 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は c ) 配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 2 9 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 5 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 6 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 9 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 3 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 3 0 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 2 6 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変

領域、及び配列番号 265 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。更に別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 299 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 205 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施態様では、上記実施態様のいずれかに記載の抗体はさらに、免疫グロブリンの Fc 領域又は免疫グロブリンの Fc 領域に相当する領域を含む。

【0087】

一実施態様において、本発明の抗体は、Fc 領域、特に IgG の Fc 領域、最も具体的には IgG1 の Fc 領域を含む。

【0088】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、全長抗体、特に IgG クラスの抗体、最も具体的には IgG1 アイソタイプ抗体である。その他の実施態様において、本発明の抗体は、scFv 断片、Fv 断片、Fab 断片、及び F(ab')<sub>2</sub> 断片の群から選択される抗体断片である。更なる実施態様において、本発明の抗体は、Fc 領域を有する抗体断片、又は免疫グロブリンの Fc 領域に等価な領域を含む融合タンパク質である。一実施態様において、本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。

【0089】

一実施態様において、本発明の抗体は、キメラ、より具体的にはヒト化である。特定の実施態様において、本発明の抗体は、ヒトである。その他の実施態様において、本発明の抗体は、ヒト定常領域を含む。一実施態様において、本発明の抗体は、ヒト Fc 領域、特にヒト IgG の Fc 領域、最も具体的にはヒト IgG1 の Fc 領域を含む。

【0090】

一実施態様において、本発明の抗体は、重鎖定常領域を含み、ここで前記重鎖定常領域は、Fc 領域を含むヒト IgG 定常領域、特にヒト IgG1 定常領域を含む。特定の実施態様において、抗体は、配列番号 313 のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む。別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 315 のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。更に別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号 313 のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、及び配列番号 315 のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【0091】

特定の実施態様において、本発明は、FAP に特異的に結合する抗体を提供し、ここで前記抗体は、a) 配列番号 197, 配列番号 201, 配列番号 203, 配列番号 207, 配列番号 211, 配列番号 215, 配列番号 219, 配列番号 223, 配列番号 227, 配列番号 231, 配列番号 235, 配列番号 239, 配列番号 243, 配列番号 247, 配列番号 251, 配列番号 255, 配列番号 259, 配列番号 263, 配列番号 267, 配列番号 271, 配列番号 275, 配列番号 279, 配列番号 283, 配列番号 287, 配列番号 291, 配列番号 295, 配列番号 299, 配列番号 303, 配列番号 307, 及び配列番号 311 の群から選択される配列に対して、少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、配列番号 193, 配列番号 195, 配列番号 199, 配列番号 205, 配列番号 209, 配列番号 213, 配列番号 217, 配列番号 221, 配列番号 225, 配列番号 229, 配列番号 233, 配列番号 237, 配列番号 241, 配列番号 245, 配列番号 249, 配列番号 253, 配列番号 257, 配列番号 261, 配列番号 265, 配列番号 269, 配列番号 273, 配列番号 277, 配列番号 281, 配列番号 285, 配列番号 289, 配列番号 293, 配列番号 297, 配列番号 301, 配列番号 305, 及び配列番号 309 の群から選択される配列に対して、少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又はそれらの組み合わせ、及び b) 免疫グロブリンの Fc 領域又は Fc 領域に等価な領域を含む。

【0092】

一実施態様において、本発明の抗体は、Fc 領域を含み、ここで前記 Fc 領域は糖鎖を

操作されたFc領域である。更なる実施態様において、本発明の抗体は、Fc領域に修飾されたオリゴ糖を有するように糖鎖を操作されている。特定の実施態様において、抗体は、糖鎖を操作されていない抗体と比較して、Fc領域に二分岐型のオリゴ糖の割合が増加している。より特定の実施態様において、抗体のFc領域のN-結合型オリゴ糖の少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、又は約100%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約70%が二分岐型になっている。二分岐型のオリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体型のものであり得る。

【0093】

別の特定の実施態様において、本発明の抗体は、糖鎖を操作されていない抗体と比較して、Fc領域に非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。より特定の実施態様において、抗体のFc領域のN-結合型オリゴ糖の少なくとも約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、又は約100%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約70%が非フコシル化型である。非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体型のものであり得る。

【0094】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、糖鎖を操作されていない抗体と比較して、Fc領域に二分岐型の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。具体的には、抗体は、N-結合型オリゴ糖の少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、又は約100%、好ましくは少なくとも約15%、より好ましくは少なくとも約25%、少なくとも約35%、又は少なくとも約50%が二分岐型であり、非フコシル化型である。二分岐型の非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体型のものであり得る。

【0095】

一実施態様において、本発明の抗体は、エフェクター機能が增加しているか及び/又はFc受容体結合親和性が増加している。エフェクター機能の増加及び/又はFc受容体結合の増加は、例えば、抗体の糖鎖操作及び/又は親和性成熟を生じることができる。一実施態様において、エフェクター機能の増加及び/又はFc受容体結合の増加は、抗体のFc領域の糖鎖操作の結果である。その他の実施態様において、エフェクター機能の増加及び/又はFc受容体結合の増加は、親和性の増加及び糖鎖操作の組み合わせによる結果である。エフェクター機能の増加は、限定されないが、以下の一つ又は複数を含み得る：Fc媒介性細胞傷害性の増加（抗体依存性細胞傷害（ADCC）の増加を含む）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込みの増加、NK細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、単球への結合の増加、多形核細胞への結合の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、標的結合抗体の架橋の増加、樹状細胞成熟の増加、又はT細胞プライミングの増加。特定の実施態様において、エフェクター機能の増加とはADCCの増加である。Fc受容体結合の増加は、好ましくは、活性化Fc受容体、最も好ましくはFcγRIIIaへの結合の増加である。

【0096】

一実施態様において、本発明の抗体は、治療的有効量で個体に投与した場合、臨床的に有意なレベルの毒性を生じることはない。

【0097】

一実施態様において、本発明の抗体は親和性が成熟されている。更なる実施態様において、本発明の抗体は、線維芽細胞活性化タンパク質に、解離定数（ $K_D$ ）値が約1  $\mu$ Mから約0.001 nM未満で、具体的には $K_D$ 値が約100 nM未満、約10 nM未満、約1 nM未満、又は約0.1 nM未満で結合する。一実施態様において、本発明の抗体は、

ヒト、マウス、及びカニクイザルの F A P に結合する。一実施態様において、本発明の抗体は、ヒト及びカニクイザルの F A P に結合する。より特定の実施態様において、本発明の抗体は、ヒト及びカニクイザルの F A P に対して、 $K_D$  値が約 200 nM 未満、約 100 nM 未満、より具体的には約 10 nM 未満、又は約 1 nM 未満、最も具体的には 0.1 nM 未満で結合する。 $K_D$  値は、F a b 又は I g G、特に I g G などの抗体を使用して、表面プラズモン共鳴により決定される。

【0098】

一実施態様において、本発明の抗 F A P 抗体は、ヒト組織の F A P に結合する。一実施態様において、本発明の抗 F A P 抗体は、ヒト及びマウスの F A P に対して交差反応性である。別の実施態様において、本発明の抗体は、ジペプチジルペプチダーゼ I V ファミリーの他のメンバーに対して、特に D P P I V / C D 26 に対して、実質的な交差反応性を持たない。一実施態様において、本発明の抗 F A P 抗体は、細胞の表面上に発現された F A P に対する前記抗体の結合の際に、F A P の内部移行を誘導しない。

【0099】

特定の実施態様において、本発明は、F A P に特異的に結合する抗体を提供し、ここで前記抗体は、配列番号 197, 配列番号 201, 配列番号 203, 配列番号 207, 配列番号 211, 配列番号 215, 配列番号 219, 配列番号 223, 配列番号 227, 配列番号 231, 配列番号 235, 配列番号 239, 配列番号 243, 配列番号 247, 配列番号 251, 配列番号 255, 配列番号 259, 配列番号 263, 配列番号 267, 配列番号 271, 配列番号 275, 配列番号 279, 配列番号 283, 配列番号 287, 配列番号 291, 配列番号 295, 配列番号 299, 配列番号 303, 配列番号 307, 及び配列番号 311 の群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、配列番号 193, 配列番号 195, 配列番号 199, 配列番号 205, 配列番号 209, 配列番号 213, 配列番号 217, 配列番号 221, 配列番号 225, 配列番号 229, 配列番号 233, 配列番号 237, 配列番号 241, 配列番号 245, 配列番号 249, 配列番号 253, 配列番号 257, 配列番号 261, 配列番号 265, 配列番号 269, 配列番号 273, 配列番号 277, 配列番号 281, 配列番号 285, 配列番号 289, 配列番号 293, 配列番号 297, 配列番号 301, 配列番号 305, 及び配列番号 309 の群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及びヒト I g G F c 領域を含み、ここで、任意で前記抗体は増加したエフェクター機能及び / 又は F c 受容体結合親和性を有するように糖鎖操作されている。別の特の実施態様において、本発明は、F A P に特異的に結合する抗体を提供し、ここで前記抗体は、配列番号 197, 配列番号 201, 配列番号 203, 配列番号 207, 配列番号 211, 配列番号 215, 配列番号 219, 配列番号 223, 配列番号 227, 配列番号 231, 配列番号 235, 配列番号 239, 配列番号 243, 配列番号 247, 配列番号 251, 配列番号 255, 配列番号 259, 配列番号 263, 配列番号 267, 配列番号 271, 配列番号 275, 配列番号 279, 配列番号 283, 配列番号 287, 配列番号 291, 配列番号 295, 配列番号 299, 配列番号 303, 配列番号 307, 及び配列番号 311 の群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、配列番号 193, 配列番号 195, 配列番号 199, 配列番号 205, 配列番号 209, 配列番号 213, 配列番号 217, 配列番号 221, 配列番号 225, 配列番号 229, 配列番号 233, 配列番号 237, 配列番号 241, 配列番号 245, 配列番号 249, 配列番号 253, 配列番号 257, 配列番号 261, 配列番号 265, 配列番号 269, 配列番号 273, 配列番号 277, 配列番号 281, 配列番号 285, 配列番号 289, 配列番号 293, 配列番号 297, 配列番号 301, 配列番号 305, 及び配列番号 309 の群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及びヒト I g G F c 領域を含み、ここで、前記抗体は、前記 F c 領域において、非フコシル化オリゴ糖の増加した割合を有し、及び / 又は二分岐型のオリゴ糖の増加した割合を有する。

【0100】

一態様において、本発明は、F A P に特異的に結合する抗体を提供し、ここで前記抗体は、配列番号 3 の重鎖 C D R 1、配列番号 35 の重鎖 C D R 2、配列番号 135, 配列番



号 1 3 7 , 配列番号 1 3 9 及び配列番号 1 4 1 の群から選択される重鎖 C D R 3、配列番号 1 4 5 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 5 3 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 1 6 5 , 配列番号 1 6 7 , 配列番号 1 6 9 , 配列番号 1 7 1 , 配列番号 1 7 3 及び配列番号 1 7 5 の群から選択される軽鎖 C D R 3 を含む親抗体に由来し、ここで前記抗体は、親抗体の少なくとも一の重鎖又は軽鎖 C D R において、少なくとも一のアミノ酸置換又は欠失を含む。例えば、抗体は、親抗体の一又は複数の超可変領域又は C D R ( 1、2、3、4、5、又は 6 の超可変領域又は C D R ) において、少なくとも一、例えば約 1 から約 10 ( すなわち約 1、2、3、4、5、6、7、8 又は 10 )、及び具体的には約 2 から約 5 の置換を含み得る。ある実施態様において、上記に提供されるような親抗体の任意の一以上のアミノ酸は、以下の C D R の位置で置換され又は欠失している：

- 重鎖 C D R 1 ( 配列番号 3 ) : 位置 2、及び 3
- 重鎖 C D R 2 ( 配列番号 3 5 ) : 位置 1 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 及び 9
- 軽鎖 C D R 1 ( 配列番号 1 4 5 ) : 位置 7、8、及び 9
- 軽鎖 C D R 2 ( 配列番号 1 5 3 ) : 位置 1、2、3、4 及び 5
- 軽鎖 C D R 3 ( 配列番号 1 6 5、1 6 7、1 6 9、1 7 1、1 7 3、又は 1 7 5 ) : 位置 4 , 5 , 6 及び 7

#### 【 0 1 0 1 】

ある実施態様において、本明細書中に提供されるように、置換は保存的置換である。ある実施態様において、以下の置換又は欠失の任意の一又は複数が組合わせて作成される：

- 重鎖 C D R 1 ( 配列番号 3 ) : Y 2 F , H 又は S , A 3 T
- 重鎖 C D R 2 ( 配列番号 3 5 ) : A 1 G , S 3 G , I , W 又は L , G 4 V , S , A 又は T , S 5 G 又は N , G 6 T 又は A , G 7 R , S , A , E 又は N , S 8 Y , L , R , I , N , Q , I 又は欠失、T 9 欠失
- 軽鎖 C D R 1 ( 配列番号 1 4 5 ) : S 7 T , S 8 R 又は S 9 N
- 軽鎖 C D R 2 ( 配列番号 1 4 3 ) : Y 1 N , I 又は Q , G 2 V , A 3 G , S 4 T 又は Y , S 5 R , T 又は I
- 軽鎖 C D R 3 ( 配列番号 1 6 5 , 1 6 7 , 1 6 9 , 1 7 1 , 1 7 3 , 又は 1 7 5 ) : G 4 A , Q , N , L 又は H 5 I , L , V , Q , N 又は I 6 M , I 7 L

#### 【 0 1 0 2 】

更に、抗体は、親抗体と比較して、重鎖又は軽鎖の何れかの一以上のフレームワーク領域に一以上の付加、欠失及び / 又は置換を含み得る。一実施態様において、少なくとも一つの C D R における前記少なくとも一のアミノ酸置換は、その親抗体と比較して抗体の親和性の増加に寄与する。その他の実施態様において、前記抗体は ( 本発明の抗体と親抗体を、同じ形態、例えば F a b 形態において比較したときに ) F A P に対して少なくとも約 2 倍から約 10 倍親抗体よりも大きい親和性を有する。更に、親抗体由来の抗体は、本発明の抗体に関して、前の段落で説明される機能の何れかを単独又は組み合わせて組み込むことができる。

#### 【 0 1 0 3 】

本発明はまた、F A P に特異的に結合する抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。一態様において、本発明は、上文に記述されるような本発明に係る抗 F A P の抗体の一部を構成するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを対象とする。一実施態様において、単離されたポリヌクレオチドは、上文に記述されるような本発明に係る抗 F A P 抗体の一部を形成する抗体重鎖及び / 又は抗体軽鎖をコードしている。

#### 【 0 1 0 4 】

一実施態様において、本発明は、配列番号 3 , 5 , 7 , 9 , 1 1 , 1 3 , 1 5 , 1 7 , 1 9 , 2 1 , 2 3 , 2 5 , 2 7 , 2 9 , 3 1 , 3 3 , 3 5 , 3 7 , 3 9 , 4 1 , 4 3 , 4 5 , 4 7 , 4 9 , 5 1 , 5 3 , 5 5 , 5 7 , 5 9 , 6 1 , 6 3 , 6 5 , 6 7 , 6 9 , 7 1 , 7 3 , 7 5 , 7 7 , 7 9 , 8 1 , 8 3 , 8 5 , 8 7 , 8 9 , 9 1 , 9 3 , 9 5 , 9 7 , 9 9 , 1 0 1 , 1 0 3 , 1 0 5 , 1 0 7 , 1 0 9 , 1 1 1 , 1 1 3 , 1 1 5 , 1 1 7 , 1 1 9 , 1 2 1 , 1 2 3 , 1 2 5 , 1 2 7 , 1 2 9 , 1 3 1 , 1 3 3 , 1 3 5 , 1 3 7 , 1

3 9 , 1 4 1 , 1 4 3 , 1 4 5 , 1 4 7 , 1 4 9 , 1 5 1 , 1 5 3 , 1 5 5 , 1 5 7 , 1 5 9 , 1 6 1 , 1 6 3 , 1 6 5 , 1 6 7 , 1 6 9 , 1 7 1 , 1 7 3 , 1 7 5 及び 1 7 7 .  
 に記載される重鎖及び軽鎖の相補性決定領域 ( C D R ) の一以上 ( すなわち、 1、 2、 3、 4、 5 又は 6 ) をコードする配列、又は前記 C D R に対する少なくとも特異性決定残基 ( S D R ) を含むその変異体又は切断型をコードする配列を含むポリヌクレオチドを対象とする。別の実施態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号 3 , 5 , 7 , 9 , 1 1 , 1 3 , 1 5 , 1 7 , 1 9 , 2 1 , 2 3 , 2 5 , 2 7 , 2 9 , 3 1 , 3 3 , 3 5 , 3 7 , 3 9 , 4 1 , 4 3 , 4 5 , 4 7 , 4 9 , 5 1 , 5 3 , 5 5 , 5 7 , 5 9 , 6 1 , 6 3 , 6 5 , 6 7 , 6 9 , 7 1 , 7 3 , 7 5 , 7 7 , 7 9 , 8 1 , 8 3 , 8 5 , 8 7 , 8 9 , 9 1 , 9 3 , 9 5 , 9 7 , 9 9 , 1 0 1 , 1 0 3 , 1 0 5 , 1 0 7 , 1 0 9 , 1 1 1 , 1 1 3 , 1 1 5 , 1 1 7 , 1 1 9 , 1 2 1 , 1 2 3 , 1 2 5 , 1 2 7 , 1 2 9 , 1 3 1 , 1 3 3 , 1 3 5 , 1 3 7 , 1 3 9 , 1 4 1 , 1 4 3 , 1 4 5 , 1 4 7 , 1 4 9 , 1 5 1 , 1 5 3 , 1 5 5 , 1 5 7 , 1 5 9 , 1 6 1 , 1 6 3 , 1 6 5 , 1 6 7 , 1 6 9 , 1 7 1 , 1 7 3 , 1 7 5 及び 1 7 7 から選択される 3 つの軽鎖 C D R ( 例えば、 L C D R 1 , L C D R 2 , 及び L C D R 3 ) 又は 3 つの重鎖 C D R ( 例えば、 H C D R 1 , H C D R 2 , 及び H C D R 3 ) をコードする配列、又は前記 3 つの相補性決定領域の各々に対する少なくとも S D R を含むそれらの変異体又は切断型をコードする配列を含む。さらに別の実施態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号 3 , 5 , 7 , 9 , 1 1 , 1 3 , 1 5 , 1 7 , 1 9 , 2 1 , 2 3 , 2 5 , 2 7 , 2 9 , 3 1 , 3 3 , 3 5 , 3 7 , 3 9 , 4 1 , 4 3 , 4 5 , 4 7 , 4 9 , 5 1 , 5 3 , 5 5 , 5 7 , 5 9 , 6 1 , 6 3 , 6 5 , 6 7 , 6 9 , 7 1 , 7 3 , 7 5 , 7 7 , 7 9 , 8 1 , 8 3 , 8 5 , 8 7 , 8 9 , 9 1 , 9 3 , 9 5 , 9 7 , 9 9 , 1 0 1 , 1 0 3 , 1 0 5 , 1 0 7 , 1 0 9 , 1 1 1 , 1 1 3 , 1 1 5 , 1 1 7 , 1 1 9 , 1 2 1 , 1 2 3 , 1 2 5 , 1 2 7 , 1 2 9 , 1 3 1 , 1 3 3 , 1 3 5 , 1 3 7 , 1 3 9 , 1 4 1 , 1 4 3 , 1 4 5 , 1 4 7 , 1 4 9 , 1 5 1 , 1 5 3 , 1 5 5 , 1 5 7 , 1 5 9 , 1 6 1 , 1 6 3 , 1 6 5 , 1 6 7 , 1 6 9 , 1 7 1 , 1 7 3 , 1 7 5 及び 1 7 7 から選択される 3 つの軽鎖 C D R ( 例えば、 L C D R 1、 L C D R 2、 及び L C D R 3 ) 及び 3 つの重鎖 C D R ( 例えば、 H C D R 1、 H C D R 2、 及び H C D R 3 ) をコードする配列を含む。特定の実施態様において、一以上の C D R をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 4 , 6 , 8 , 1 0 , 1 2 , 1 4 , 1 6 , 1 8 , 2 0 , 2 2 , 2 4 , 2 6 , 2 8 , 3 0 , 3 2 , 3 4 , 3 6 , 3 8 , 4 0 , 4 2 , 4 4 , 4 6 , 4 8 , 5 0 , 5 2 , 5 4 , 5 6 , 5 8 , 6 0 , 6 2 , 6 4 , 6 6 , 6 8 , 7 0 , 7 2 , 7 4 , 7 6 , 7 8 , 8 0 , 8 2 , 8 4 , 8 6 , 8 8 , 9 0 , 9 2 , 9 4 , 9 6 , 9 8 , 1 0 0 , 1 0 2 , 1 0 4 , 1 0 6 , 1 0 8 , 1 1 0 , 1 1 2 , 1 1 4 , 1 1 6 , 1 1 8 , 1 2 0 , 1 2 2 , 1 2 4 , 1 2 6 , 1 2 8 , 1 3 0 , 1 3 2 , 1 3 4 , 1 3 6 , 1 3 8 , 1 4 0 , 1 4 2 , 1 4 4 , 1 4 6 , 1 4 8 , 1 5 0 , 1 5 2 , 1 5 4 , 1 5 6 , 1 5 8 , 1 6 0 , 1 6 2 , 1 6 4 , 1 6 6 , 1 6 8 , 1 7 0 , 1 7 2 , 1 7 4 , 1 7 6 , 1 7 8 , 1 7 9 , 1 8 0 , 1 8 1 , 1 8 2 , 1 8 3 , 1 8 4 , 1 8 5 , 1 8 6 , 1 8 7 , 1 8 8 , 1 8 9 , 1 9 0 , 1 9 1 及び 1 9 2 に示される C D R ヌクレオチド配列の一以上に対して、少なくとも約 9 0 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である配列を含む。

#### 【 0 1 0 5 】

更なる実施態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 9 7 , 配列番号 2 0 1 , 配列番号 2 0 3 , 配列番号 2 0 7 , 配列番号 2 1 1 , 配列番号 2 1 5 , 配列番号 2 1 9 , 配列番号 2 2 3 , 配列番号 2 2 7 , 配列番号 2 3 1 , 配列番号 2 3 5 , 配列番号 2 3 9 , 配列番号 2 4 3 , 配列番号 2 4 7 , 配列番号 2 5 1 , 配列番号 2 5 5 , 配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 2 9 5 , 配列番号 2 9 9 , 配列番号 3 0 3 , 配列番号 3 0 7 , 及び配列番号 3 1 1 の群から選択される重鎖可変領域をコードする配列、及び / 又は、配列番号 1 9 3 , 配列番号 1 9 5 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 4 1 , 配列

番号 2 4 5 , 配列番号 2 4 9 , 配列番号 2 5 3 , 配列番号 2 5 7 , 配列番号 2 6 1 , 配列番号 2 6 5 , 配列番号 2 6 9 , 配列番号 2 7 3 , 配列番号 2 7 7 , 配列番号 2 8 1 , 配列番号 2 8 5 , 配列番号 2 8 9 , 配列番号 2 9 3 , 配列番号 2 9 7 , 配列番号 3 0 1 , 配列番号 3 0 5 , 及び配列番号 3 0 9 の群から選択される軽鎖可変領域をコードする配列を含む。特定の実施態様において、重鎖及び / 又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 9 4 , 1 9 6 , 1 9 8 , 2 0 0 , 2 0 2 , 2 0 4 , 2 0 6 , 2 0 8 , 2 1 0 , 2 1 2 , 2 1 4 , 2 1 6 , 2 1 8 , 2 2 0 , 2 2 2 , 2 2 4 , 2 2 6 , 2 2 8 , 2 3 0 , 2 3 2 , 2 3 4 , 2 3 6 , 2 3 8 , 2 4 0 , 2 4 2 , 2 4 4 , 2 4 6 , 2 4 8 , 2 5 0 , 2 5 2 , 2 5 4 , 2 5 6 , 2 5 8 , 2 6 0 , 2 6 2 , 2 6 4 , 2 6 6 , 2 6 8 , 2 7 0 , 2 7 2 , 2 7 4 , 2 7 6 , 2 7 8 , 2 8 0 , 2 8 2 , 2 8 4 , 2 8 6 , 2 8 8 , 2 9 0 , 2 9 2 , 2 9 4 , 2 9 6 , 2 9 8 , 3 0 0 , 3 0 2 , 3 0 4 , 3 0 6 , 3 0 8 , 3 1 0 及び 3 1 2 に示される可変領域ヌクレオチド配列の群から選択される配列、又はそれらの組み合わせを含む。

#### 【 0 1 0 6 】

特定の実施態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 9 7 , 配列番号 2 0 1 , 配列番号 2 0 3 , 配列番号 2 0 7 , 配列番号 2 1 1 , 配列番号 2 1 5 , 配列番号 2 1 9 , 配列番号 2 2 3 , 配列番号 2 2 7 , 配列番号 2 3 1 , 配列番号 2 3 5 , 配列番号 2 3 9 , 配列番号 2 4 3 , 配列番号 2 4 7 , 配列番号 2 5 1 , 配列番号 2 5 5 , 配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 2 9 5 , 配列番号 2 9 9 , 配列番号 3 0 3 , 配列番号 3 0 7 , 及び配列番号 3 1 1 の群から選択される重鎖可変領域をコードする配列、及び重鎖定常領域、特にヒト重鎖定常領域をコードする配列を含む。特定の実施態様において、重鎖定常領域は、ヒト I g G 1 重鎖定常領域、特に F c 領域を含むヒト I g G 重鎖定常領域である。特定の実施態様において、前記重鎖定常領域は、配列番号 3 1 3 の配列を含む。別の特定の実施態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 9 3 , 配列番号 1 9 5 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 4 1 , 配列番号 2 4 5 , 配列番号 2 4 9 , 配列番号 2 5 3 , 配列番号 2 5 7 , 配列番号 2 6 1 , 配列番号 2 6 5 , 配列番号 2 6 9 , 配列番号 2 7 3 , 配列番号 2 7 7 , 配列番号 2 8 1 , 配列番号 2 8 5 , 配列番号 2 8 9 , 配列番号 2 9 3 , 配列番号 2 9 7 , 配列番号 3 0 1 , 配列番号 3 0 5 , 及び配列番号 3 0 9 の群から選択される軽鎖可変領域をコードする配列、及び軽鎖定常領域、特にヒト軽鎖定常領域をコードする配列を含む。特定の実施態様において、前記軽鎖定常領域は、配列番号 3 1 5 の配列を含む。

#### 【 0 1 0 7 】

一実施態様において、本発明は、配列番号 1 9 7 , 配列番号 2 0 1 , 配列番号 2 0 3 , 配列番号 2 0 7 , 配列番号 2 1 1 , 配列番号 2 1 5 , 配列番号 2 1 9 , 配列番号 2 2 3 , 配列番号 2 2 7 , 配列番号 2 3 1 , 配列番号 2 3 5 , 配列番号 2 3 9 , 配列番号 2 4 3 , 配列番号 2 4 7 , 配列番号 2 5 1 , 配列番号 2 5 5 , 配列番号 2 5 9 , 配列番号 2 6 3 , 配列番号 2 6 7 , 配列番号 2 7 1 , 配列番号 2 7 5 , 配列番号 2 7 9 , 配列番号 2 8 3 , 配列番号 2 8 7 , 配列番号 2 9 1 , 配列番号 2 9 5 , 配列番号 2 9 9 , 配列番号 3 0 3 , 配列番号 3 0 7 , 及び配列番号 3 1 1 からなる群から選択される配列に対して、少なくともおおよそ 9 0 % , 9 5 % , 9 6 % , 9 7 % , 9 8 % , 9 9 % 、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする第一の単離されたポリヌクレオチド、及び配列番号 1 9 3 , 配列番号 1 9 5 , 配列番号 1 9 9 , 配列番号 2 0 5 , 配列番号 2 0 9 , 配列番号 2 1 3 , 配列番号 2 1 7 , 配列番号 2 2 1 , 配列番号 2 2 5 , 配列番号 2 2 9 , 配列番号 2 3 3 , 配列番号 2 3 7 , 配列番号 2 4 1 , 配列番号 2 4 5 , 配列番号 2 4 9 , 配列番号 2 5 3 , 配列番号 2 5 7 , 配列番号 2 6 1 , 配列番号 2 6 5 , 配列番号 2 6 9 , 配列番号 2 7 3 , 配列番号 2 7 7 , 配列番号 2 8 1 , 配列番号 2 8 5 , 配列番号 2 8 9 , 配列番号 2 9 3 , 配列番号 2 9 7 , 配列番号 3 0 1 , 配列番号 3 0 5 , 及び配列番号 3 0 9

からなる群から選択される配列に対して、少なくともおよそ90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする第二の単離されたポリヌクレオチドを含む組成物を対象とする。

#### 【0108】

一実施態様において、本発明は、配列番号198、配列番号202、配列番号204、配列番号208、配列番号212、配列番号216、配列番号220、配列番号224、配列番号228、配列番号232、配列番号236、配列番号240、配列番号244、配列番号248、配列番号252、配列番号256、配列番号260、配列番号264、配列番号268、配列番号272、配列番号276、配列番号280、配列番号284、配列番号288、配列番号292、配列番号296、配列番号300、配列番号304、配列番号308、及び配列番号312からなる群から選択される配列に対して、少なくともおよそ90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む第一の単離されたポリヌクレオチド、及び配列番号194、配列番号196、配列番号200、配列番号206、配列番号210、配列番号214、配列番号218、配列番号222、配列番号226、配列番号230、配列番号234、配列番号238、配列番号242、配列番号246、配列番号250、配列番号254、配列番号258、配列番号262、配列番号266、配列番号270、配列番号274、配列番号278、配列番号282、配列番号286、配列番号290、配列番号294、配列番号298、配列番号302、配列番号306、及び配列番号310からなる群から選択される配列に対して、少なくともおよそ90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む第二の単離されたポリヌクレオチドを含む組成物を対象とする。

#### 【0109】

更なる態様において、本発明はまた、以上に記載されるような本発明に係るポリヌクレオチドの何れかによってコードされる単離されたポリペプチドを対象とする。

#### 【0110】

更なる態様にて、以下のセクション1-6で説明されるように、上記実施態様のいずれかに記載の抗FAP抗体は、単独または組み合わせで、任意の特徴を組み込むことができる：

#### 【0111】

##### 1. 抗体親和性

ある実施態様において、本明細書において与えられる抗体は、解離定数 ( $K_D$ ) が、 $1\mu\text{M}$ 、 $100\text{nM}$ 、 $10\text{nM}$ 、 $1\text{nM}$ 、 $0.1\text{nM}$ 、 $0.01\text{nM}$ 、又は $0.001\text{nM}$  (例えば、 $10^{-8}\text{M}$ 未満、例えば、 $10^{-8}\text{M}$ から $10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M}$ から $10^{-13}\text{M}$ )、好ましくは、本明細書で与えられる抗体は、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって決定される場合、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、特にヒトFAPに、 $K_D$  値が $1\text{nM}$ 未満で結合する。

一実施態様によれば、 $K_D$  は表面プラズモン共鳴を用いて測定される。そのようなアッセイは、例えば、BIAcore (登録商標) - T100装置 (GE Healthcare) を用いて、25℃で、抗原固定化のため、CM5チップで実施することができる。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, GE Healthcare) を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及びN-ヒドロキシスクシニミド (NHS) で活性化した。抗His抗体 (Penta His, Qiagen) を $10\text{mM}$ 酢酸ナトリウム、 $\text{pH} 5$ 、で $40\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、結合したタンパク質の応答単位 (RU) がおよそ9000になるように $10\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で注入した。抗His抗体の注入後、反応しない群をブロックするために $1\text{M}$ のエタノールアミンを注入する。続いて、Hisタグ付き抗原を $10\text{nM}$ で $10\mu\text{l}/\text{分}$ で20秒間注入し (Fab断片による測定のため)、又は $20\text{nM}$ で25秒間注入し (IgG抗体による測定のため)、固定化抗Hisタグ付き抗体によりそのHisタグを介して捕捉する。適切なFAP抗原構築物のタンパク質配列及びDNA配列が配列番号317から322に示される。動力学測定のため

に、抗体の段階希釈（F a b断片について、6 . 2 5 n Mから2 0 0 n Mの範囲で2 倍希釈、又はI g Gについて、3 . 2 p Mから1 0 n Mの範囲で5 倍の希釈）を、1 0 m MのH E P E S、1 5 0 m MのN a C l、3 m MのE D T A、0 . 0 5 %界面活性剤P 2 0、2 5、p H 7 . 4に、約9 0  $\mu$  l / 分の流速で注入する。次のパラメータが適用される：会合時間1 8 0 秒、解離が3 0 0 秒（F a bについて）又は9 0 0 秒（I g Gについて）、各サイクルの間に6 0 秒間、1 0 m Mのグリシン、p H 2で再生。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル（s i m p l e o n e - t o - o n e L a n g m u i r b i n d i n g m o d e l）（B I A C O R E（登録商標）T 1 0 0 E v a l u a t i o nソフトウェア）を用いて、会合速度（k o n）と解離速度（k o f f）を算出した。平衡解離定数（K<sub>D</sub>）をk o f f / k o n比として算出した。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)を参照。

#### 【0112】

##### 2. 抗体断片

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片は、限定されないが、F a b, F a b', F a b' - S H, F ( a b')<sub>2</sub>, F v, 及びs c F v断片、及び下記の他の断片を含む。特定の抗体断片の総説については、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)、又はCarter, Nat. Rev. Immunol. 6:343-357 (2006)を参照。

#### 【0113】

単鎖F v又はs c F v断片は、単一のポリペプチド鎖としてV Hドメイン及びV Lドメインを含む。一般的に、V Hドメイン及びV Lドメインがリンカー配列により結合される。s c F v断片の総説については、例えば、Plueckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照；また、国際公開第93 / 16185号；及び米国特許第5571894号及び第5587458号も参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期を増加させたF a b及びF ( a b')<sub>2</sub>断片の議論については、米国特許第5869046号を参照のこと。

#### 【0114】

ダイアボディは2価または二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404097号；国際公開第1993 / 01161号；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照。トリアボディ及びテトラボディもまた Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

#### 【0115】

ミニボディは、二量体化領域として、免疫グロブリンの定常領域、典型的には免疫グロブリンのC H3領域、好ましくはI g G、より好ましくはI g G1を含む、二価の、ホモ二量体s c F v誘導体である。一般的に、定常領域は、ヒンジ領域及び／又はリンカー領域を介してs c F vに接続されている。ミニボディタンパク質の例は、Hu et al., Cancer Res. 56: 3055-61 (1996)に見いだすことができる。

#### 【0116】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。ある実施態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6248516 B1号を参照）。

#### 【0117】

抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載するように、インタクトな抗体の分解、並びに組換え宿主細胞（例えば、大腸菌又はファージ）による生産を含む。

#### 【0118】

### 3. キメラ及びヒト化抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4816567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域）及びヒト定常領域を含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

#### 【0119】

ある実施態様において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したまま、ヒト化されている。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（またはその一部）が、非ヒト抗体から由来し、FR（またはその一部）がヒト抗体配列に由来する、一以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部をも含む。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、抗体特異性又は親和性を回復もしくは改善するめに、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換されている。ヒト化は、様々な方法によって達成することができ、限定されなが、（a）キメラ抗体を産生するためにヒト定常領域上に全非ヒト可変ドメインを移植する、（b）非ヒト（例えば、ドナー抗体）のCDRのみを、重要なフレームワーク残基（例えば、良好な抗原結合親和性又は抗体の機能を維持するために重要であるもの）の保持を伴うか又は伴わない、ヒト（例えば、レシピエント抗体）のフレームワーク領域及び定常領域の上に移植する、（c）非ヒト特異性決定領域（SDR又はa-CDR；抗体-抗原相互作用に重要な残基）のみを移植ヒトフレームワーク領域及び定常領域上に移植する、又は（d）非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によってヒト様部分（section）で「覆い隠す」。ヒト化抗体およびそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に総説され、更に、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 米国特許第5821337号、第7527791号、第6982321号、および第7087409号；Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 31(3):169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) グラフティングを記述); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング」を記述); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記述); 及びOsbourne et al., Methods 36:61-68 (2005) 及びKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FRシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述)に記載されている。

#### 【0120】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)）；軽鎖または重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域（例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 及びPresta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)を参照）；ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照）；及びFRライブラリスクリーニング由来のフレームワーク領域（例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 及び Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)を参照）を含む。

#### 【0121】

### 4. ヒト抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的に van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 及び Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) に記載されている。

#### 【0122】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するかもしれない動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005) を参照。また、例えば、XENOMOUSE<sup>TM</sup> 技術を記載している、米国特許第 6075181 号及び 6150584 号；HuMa b（登録商標）技術を記載している米国特許第 5770429 号；K-M MOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許第 7041870 号及び、Velo c i M o u s e（登録商標）技術を記載している米国特許出願公開第 2007/0061900 号）を参照。このような動物で生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変される可能性がある。

#### 【0123】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991) を参照）ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第 7189826 号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト Ig M 抗体の産生を記載している）及び Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している）に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）もまた、Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 及び Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005) に記載される。

#### 【0124】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択された F v クローン可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術が、以下に説明される。

#### 【0125】

##### 5. ライブラリー由来の抗体

本発明の抗体は、所望の活性または活性（複数）を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、様々な方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてのライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) に総説され、更に、例えば、McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340

(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 及びLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)に記載されている。

#### 【0126】

特定のファージディスプレイ法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により個別にクローニングされ、ファージライブラリーにランダムに再結合され、その後、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、通常、抗体断片を、単鎖Fv（scFv）断片、またはFab断片のいずれかとして提示する。免疫された起源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要性なしで免疫原に高親和性抗体を提供する。代わりに、Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)に記載されるように、ナイーブなレパートリーが、任意の免疫感作無しで、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対して、抗体の単一起源を提供するために、（例えば、ヒトから）クローン化することができる。最後に、ナイーブなライブラリーはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)に記載されるように、非常に可変なCDR3領域をコードし、インピットで再構成を達成するために、幹細胞由来の未転位V遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用することにより合成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公報は、例えば、米国特許第5750373号、及び米国特許出願公開第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号及び第2009/0002360号を含む。

#### 【0127】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体の断片とみなされる。

#### 【0128】

#### 6. 多重特異性抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様において、結合特異性の一つはFAPに対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。ある実施態様において、二重特異性抗体は、FAPの2つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体はまたFAPを発現する細胞に対して細胞傷害性薬物を局在化させるために用いることができる。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

#### 【0129】

多重特異性抗体を作製するための技術は、限定されないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照)及び“knob-in-hole”エンジニアリング（例えば、米国特許第5731168号を参照）を含む。多重特異抗体はまた、抗体のFc-ヘテロ2量体分子を作成するための静電ステアリング効果を操作すること（国際公開第2009/089004A1号）、2つ以上の抗体又は断片を架橋すること（例えば米国特許第4676980号、及びBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照）；2重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること（例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照）；二重特異性抗体フラグメントを作製するため、「ダイアボディ」技術を使用すること（例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照）；単鎖Fv（scFv）ダイマーを使用すること（例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照）、及び、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作成することができる。



## 【 0 1 3 0 】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能性抗原結合部位を持つ改変抗体もまた本明細書に含まれる（例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照）。

## 【 0 1 3 1 】

本明細書中の抗体又は断片はまた、FAP並びにその他の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む、「2重作用（Dual Acting）FAb」又は「DAF」を含む（例えば米国特許出願公開第2008/0069820号参照）。

## 【 0 1 3 2 】

## 7. 抗体変異体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、またはペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終コンストラクトに到達させるために作成され得る。

## 【 0 1 3 3 】

## a) 置換、挿入、および欠失変異体

ある実施態様において、一つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異の対象となる部位は、HVRとFRを含む。

## 【 0 1 3 4 】

アミノ酸置換は、同様の構造的及び/又は化学的特性を有する別のアミノ酸で一つのアミノ酸を置換すること、例えば、保存的アミノ酸置換をもたらすことが可能である。「保存的」アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、及び/又は、両親媒性の性質の類似性に基づいて行うことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンを含み；極性中性アミノ酸は、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンを含み；正に帯電した（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジン、及びヒスチジンを含み；負に帯電した（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含む。保存的置換は、表2の「好ましい置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表2の「典型的な置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、又はADCC又はCDCの改善についてスクリーニングされた。

表 2.

元の残基	代表的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- ( 1 ) 疎水性：ノルロイシン，M e t ，A l a ，V a l ，L e u ，I l e ；
- ( 2 ) 中性の親水性：C y s ，S e r ，T h r ，A s n ，G l n ；
- ( 3 ) 酸性：A s p ，G l u ；
- ( 4 ) 塩基性：H i s ，L y s ，A r g ；
- ( 5 ) 鎖配向に影響する残基：G l y ，P r o ；
- ( 6 ) 芳香族：T r p ，T y r ，P h e ．

#### 【 0 1 3 5 】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。例えば、アミノ酸置換はまた、異なる構造及び／又は化学的特性を有する別のアミノ酸で一つのアミノ酸を置換すること、例えば、一群（例えば、極性）由来のアミノ酸を異なる群（例えば、塩基性）由来の別のアミノ酸で置換することをもたらしことができる。許容される変異は、組換えDNA技術を用いて、ポリペプチド分子中にアミノ酸の挿入、欠失、又は置換を体系的に作成し、得られた組換え変異体を活性についてアッセイすることによって実験的に決定され得る。

#### 【 0 1 3 6 】

置換変異体の一つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体など）の一以上の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的には、更なる研究のために選択され得られた変異体は、親抗体と比較して、特定の生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性を減少）を有し、及び／又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。典型的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載されるファージディスプレイベースの親和性成熟技術を用いて、簡便に生成され得る。簡潔に言えば、一つ以上のHVR残基が変異し、変異体抗体は、ファージ上に表示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

#### 【 0 1 3 7 】

変更（例えば、置換）は、例えば抗体の親和性を向上させるために、HVRで行うこと

ができる。このような変更は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程中に高頻度で変異を受けるコドンにコードされた残基で(例えばChowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照)、及び/又はSDR( $\alpha$ -CDR)で行うことができ、得られた変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリから構築し選択し直すことによる親和性成熟が、例えばHoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様において、多様性が、種々の方法(例えば、変異性PCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発)のいずれかにより、成熟のために選択された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリが作成される。次いで、ライブラリは、所望の親和性を持つ抗体変異体を同定するためにスクリーニングされる。多様性を導入するもう一つの方法は、いくつかのHVR残基(例えば、一度に4から6残基)がランダム化されたHVR指向のアプローチを伴う。抗原結合に關与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング突然変異誘発、またはモデリングを用いて、特異的に同定され得る。CDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的にされる。

#### 【0138】

所定の実施態様において、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限りにおいて、一以上のHVR内で発生する可能性がある。例えば、実質的に結合親和性を低下させない保存的改変(例えば本明細書で与えられる保存的置換)をHVR内で行うことができる。このような改変は、HVR「ホットスポット」又はSDRの外側であってもよい。上記に与えられた変異体VH又はVL配列の所定の実施態様において、各HVRは不変であるか、又はわずか1個、2個または3個のアミノ酸置換が含まれているかの何れかである。

#### 【0139】

突然変異誘発のために標的とすることができる抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085により説明されるように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基またはグループ(例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGluなどの荷電残基)が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを判断するために、中性または負に荷電したアミノ酸(例えば、アラニンまたはポリアラニン)に置換される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入され得る。代わりに、又は更に、抗体と抗原との接触点を同定するために、抗原抗体複合体の結晶構造を分析することは有益であり得る。そのような接触残基及び隣接残基が、置換の候補として標的とされるか又は排除され得る。変異体はそれらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

#### 【0140】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体のN末端またはC末端への融合(例えばADEPTの場合)、または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

#### 【0141】

##### b) グリコシル化変異体

幾つかの実施態様において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は一定の改善された特性を有する抗体変異型を作成するために行われ得る。

#### 【0142】

一つの態様において、本発明は、抗体依存性細胞傷害を含む、増加したエフェクター機能を有する抗FAP抗体のグリコフォームを提供する。抗体のグリコシル化学は以前に記載されている。例えば、米国特許第6602684号を参照し、参照によりその全体が援用される。グリコシル化に關与する遺伝子の活性を変化させた宿主細胞からの抗FAP

抗体の生産の方法もまた本明細書に詳細が記述される（下の「組換えの方法及び組成物」と題された節を参照）。

【0143】

I g G分子は、そのF c領域内の2つのN - 結合型オリゴ糖、各重鎖上に1つ、を運び。任意の糖タンパク質として、抗体は、同じポリペプチド骨格を共有するが、グリコシル化部位に付着された異なる糖鎖を持つグリコフォームの集団として生成される。血清I g GのF c領域に通常見られるオリゴ糖は、低レベルの末端シアル酸及び二分したN - アセチルグルコサミン（G l c N A c）、及び様々な程度の末端のガラクトシル化とコアフコシル化（フコースが二分岐糖鎖構造の「基部」においてG l c N A c残基に付着している）を持つ複雑な二分岐型である。幾つかの研究では、F c R結合のために必要な最小限の炭水化物構造はオリゴ糖コア内にあることを示唆している。Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996).

【0144】

抗体の産生のために産業界及びアカデミアで使用されるマウス又はハムスター由来の細胞株は、要求されるオリゴ糖決定因子をF c部位に対して通常付着させる。これらの細胞株で発現されるI g Gは、しかしながら、血清中のI g Gの低い量で見いだされる分岐したG l c N A cを欠いている。Lifely et al., Glycobiology 318:813-22 (1995). N-結合型グリコシル化経路では、分岐したG l c N A cがG n T I I Iによって付加される。Schachter, Biochem. Cell Biol. 64:163-81 (1986).

【0145】

Umanaらは、クローン化されたG n T I I I酵素遺伝子の異なるレベルを外部制御される様式で発現するように以前に操作された、単一の抗体産生C H O細胞株を使用した（Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)）。このアプローチでは、グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、G n T I I I）の発現及び修飾された抗体のA D C C活性間の厳密な相関関係を初めて確立した。従って、本発明は、抗体産生宿主細胞内での糖転移酵素遺伝子の発現レベルを変化させたことによる、グリコシル化を変化させたF c領域又はF c領域に等価な領域を含む、抗F A P抗体を熟慮する。特定の実施態様において、遺伝子発現レベルの変化はG n T I I I活性の増加である。G n T I I I活性の増加は、抗体のF c領域において、二分岐型のオリゴ糖の割合の増加、並びにフコシル化オリゴ糖の割合の減少をもたらす。この抗体又はその断片は、F c受容体結合親和性を増加させ、かつエフェクター機能を増加させている。

【0146】

抗体が、例えば、抗体のF c領域に結合した二分岐オリゴ糖がG l c N A cによって二分されている二分岐型のオリゴ糖とともに与えられる。このような抗体変異体はフコシル化を減少させ、及び/又はA D C C機能を改善している可能性がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号（Jean-Mairetら）；米国特許第6602684号（Umanaら）；及び米国特許出願公開第2005/0123546号（Umanaら）に記載されている。

【0147】

一実施態様において、本発明の抗F A P抗体は、本発明の方法によるそのオリゴ糖の修飾の結果として、F c領域に二分岐型のオリゴ糖の割合が増加している。一実施態様において、本発明の抗F A P抗体のF c領域における二分岐型のN - 結合型オリゴ糖の割合は、全オリゴ糖のうち少なくとも約100%から約10%、具体的には少なくとも約50%、より具体的には少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも約90 - 95%である。二分岐型のオリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体型のものであり得る。

【0148】

別の実施態様において、本発明の抗F A P抗体は、本発明の方法によるそのオリゴ糖の修飾の結果として、F c領域に非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。一実施態様において、非フコシル化オリゴ糖の割合は、少なくとも約20%から約100%、具体的

には少なくとも約 50%、少なくとも約 60% から少なくとも約 70%、及びより具体的には少なくとも約 75% である。非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体型のものであり得る。

#### 【0149】

フコースの量は、例えば、国際公開第 2008/077546 号に記載されているように、MALDI-TOF 質量分析法によって測定される Asn297 に付着しているすべての糖構造の合計（例えば、コンプレックス、ハイブリッド及び高マンノース構造）に対して、Asn297 の糖鎖中のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297 は、Fc 領域（Fc 領域残基の EU 番号付け）でおおよそ 297 の位置に位置するアスパラギン残基を指し、しかし、Asn297 もまた位置 297 の上流または下流のおおよそ 3 アミノ酸に、すなわち抗体の軽微な配列変異に起因して、位置 294 と 300 の間に配置され得る。フコースの相対量は、MALDI-TOF MS により、N-グリコシダーゼ F 処理した試料（例えば、複合体、ハイブリッド及び高マンノース構造）に同定された全ての糖構造に関連したフコース含有構造の割合である。このようなフコシル化変異体は ADC 機能を改善させた可能性がある。

#### 【0150】

本発明の抗 FAP 抗体を用いて使用することができる糖鎖工学の方法論は、米国特許第 6602684 号、米国特許出願公開第 2004/0241817 A1 号、米国特許出願公開第 2003/0175884 A1 号、米国仮特許出願第 60/441,307 号及び国際公開第 2004/065540 号により詳細に説明されており、それらの各々の内容全体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明の抗 FAP 抗体は、あるいは、米国特許出願公開第 2003/0157108 号（ジェネンテック）、又は欧州特許第 1176195 A1 号、国際公開第 03/084570 号、国際公開第 03/085119 号及び米国特許出願公開第 2003/0115614 号、米国特許出願公開第 2004/093621 号、米国特許出願公開第 2004/110282 号、米国特許出願公開第 2004/110704 号、米国特許出願公開第 2004/132140 号、Niwa et al., J Immunol Methods 306, 151/160 (2006)、米国特許第 6,946,292 号（Kyowa）に開示された技術に従って、Fc 領域にフコース残基を減少させるように糖鎖を操作することができる。本発明の糖鎖操作抗 FAP 抗体はまた、米国特許出願公開第 60/344,169 号及び国際公開第 03/056914 号（GlycoFi, Inc.）又は国際公開第 2004/057002 号及び国際公開第 2004/024927 号（Greenovation）に教授されるものなど、修飾された糖タンパク質を産生する発現系において生産することができる。

#### 【0151】

「フコース非修飾」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の更なる例は次のとおりである：国際公開第 2000/61739 号；国際公開第 2001/29246 号；米国特許出願公開第 2002/0164328 号；米国特許出願公開第 2004/0109865 号；国際公開第 2005/035586 号；国際公開第 2005/035778 号；国際公開第 2005/053742 号；国際公開第 2002/031140 号；Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。非フコシル化抗体を産生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損している Lec13 CHO 細胞（Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国特許出願公開第 2003/0157108 A1 号、Presta, L；及び国際公開第 2004/056312 A1 号、Adams ら、特に実施例 11）、及びノックアウト細胞株、例えばアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウト CHO 細胞（例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)；及び国際公開第 2003/085107 号を参照）を含む。

#### 【0152】

特定の実施態様において、本発明の抗 FAP 抗体は、Fc 領域において、二分岐型の非フ

コシル化オリゴ糖の割合が増加している。二分岐型の非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体の何れかであり得る。具体的には、本発明の方法は、抗原結合分子のFc領域のオリゴ糖の少なくとも約10%から約100%、具体的には少なくとも約15%、より具体的には少なくとも約20%から約25%、及びより具体的には少なくとも約30%から約35%が二分岐型となり、非フコシル化型抗FAPI抗体を産生するために使用することができる。本発明の抗FAPI抗体は、抗体のFc領域のオリゴ糖の少なくとも約10%から約100%、具体的には少なくとも約15%、より具体的には少なくとも約20%から約25%、及びより具体的には少なくとも約30%から約35%が二分岐型となり、ハイブリッドで、非フコシル化型抗FAPI抗体を産生するために使用することができる。

#### 【0153】

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、その抗体がグリコシル化される程度を増加または減少するように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、一以上のグリコシル化部位が作成または削除されるようにアミノ酸配列を変えることによって簡便に達成することができる。

#### 【0154】

Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体も提供される。このような抗体変異体はCDC機能を改善させた可能性がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号(Pateilら)；国際公開第1998/58964号(Raju, S.)；及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

#### 【0155】

ADCC又は本発明の抗FAPI抗体の他のエフェクター機能の増加はまた、FAPIに対する抗原結合分子の親和性の増加により、例えば、親和性成熟又は親和性を改善する別の方法により(Tang et al., J. Immunol. 2007, 179:2815-2823を参照)、又は下記のようにFc領域におけるアミノ酸修飾により、達成することができる。これらのアプローチの組み合わせもまた、本発明に包含される。

#### 【0156】

##### c) Fc領域変異体

ある実施態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変を、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入することができ、それによってFc領域変異体を生成する。Fc領域の変異体は、1つまたは複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域の配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含んでもよい。

#### 【0157】

ある実施態様において、本発明は、インビボにおける抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能(例えば補体およびADCCなど)が不要または有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有する抗体変異体を意図している。インビトロ及び/又はインビボでの細胞毒性アッセイを、CDC活性及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠くが(それゆえ、おそらくADCC活性を欠く)、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。ADCCを媒介する初代細胞、NK細胞は、FcRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)の464ページの表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5500362号(例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)を参照)及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)；第5821337号(Brugemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照)に説明される。ある

いは、非放射性の方法を用いることができる（例えば、フローサイトメトリー用の A C T I <sup>T M</sup> 非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mount View, CA；及び C y t o T o x 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（P B M C）およびナチュラルキラー（N K）細胞が含まれる。あるいは、又は更に、目的の分子の A D C C 活性は、Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998)に開示されるように、インビボで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。C 1 q 結合アッセイはまた、抗体が体 C 1 q を結合することができること、したがって、C D C 活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、国際公開第 2 0 0 6 / 0 2 9 8 7 9 号及び国際公開第 2 0 0 5 / 1 0 0 4 0 2 号の C 1 q および C 3 c 結合 E L I S A を参照。補体活性化を評価するために、C D C アッセイを行うことができる（例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 及び Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照）。FcRn 結合、及びインビボでのクリアランス / 半減期の測定ではまた、当該分野で公知の方法を用いて行うことができる（例えば、Petkova, S.B. et al., Int ' l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照）。

#### 【 0 1 5 8 】

エフェクター機能が減少した抗体は、F c 領域の残基 2 3 8、2 6 5、2 6 9、2 7 0、2 9 7、3 2 7、3 2 9 の一つ以上の置換を有するものが含まれる（米国特許第 6 7 3 7 0 5 6 号）。そのような F c 変異体は、残基 2 6 5 及び 2 9 7 のアラニンへの置換を有する、いわゆる「D A N A」F c 変異体を含む、アミノ酸位置 2 6 5、2 6 9、2 7 0、2 9 7 及び 3 2 7 の 2 以上での置換を有する F c 変異体を含む（米国特許第 7 3 3 2 5 8 1 号）。

#### 【 0 1 5 9 】

F c R への改善又は減少させた結合を持つ特定の抗体変異体が記載されている。（例えば、米国特許第 6 , 7 3 7 , 0 5 6 号；国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2 号、及び Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照）。

#### 【 0 1 6 0 】

ある実施態様において、抗体変異体は A D C C を改善する 1 つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、F c 領域の位置 2 9 8、3 3 3、及び / 又は 3 3 4 における置換（E U の残基番号付け）を含む。

#### 【 0 1 6 1 】

幾つかの実施態様において、例えば、米国特許第 6 1 9 4 5 5 1 号、国際公開第 9 9 / 5 1 6 4 2 号、及び Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に説明されるように、変更された（すなわち改善されたか又は減少した）C 1 q 結合及び / 又は補体依存性細胞傷害（C D C）を生じる、F c 領域における変更がなされる。

#### 【 0 1 6 2 】

増加した半減期を持ち、胎仔への母性 I g G の移送を担う、新生児 F c 受容体（F c R n）への結合が改善された抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 及び Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）が、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 1 4 9 3 4 A 1 号（H i n t o n ら）に記載されている。これらの抗体は、F c R n への F c 領域の結合を改善する一つまたは複数の置換を有する F c 領域を含む。このような F c 変異体は、F c 領域の残基の 1 以上の置換を有するものが含まれる：2 3 8 , 2 5 6 , 2 6 5 , 2 7 2 , 2 8 6 , 3 0 3 , 3 0 5 , 3 0 7 , 3 1 1 , 3 1 2 , 3 1 7 , 3 4 0 , 3 5 6 , 3 6 0 , 3 6 2 , 3 7 6 , 3 7 8 , 3 8 0 , 3 8 2 , 4 1 3 , 4 2 4 又は 4 3 4、例えば、F c 領域の残基 4 3 4 の置換（米国特許第 7 3 7 1 8 2 6 号）。

#### 【 0 1 6 3 】

F c 領域の変異体に関する更なる例については、米国特許出願第 6 0 / 4 3 9 4 9 8 号；米国特許出願第 6 0 / 4 5 6 0 4 1 号；米国特許出願第 6 0 / 5 1 4 5 4 9 号；又は国際公開第 2 0 0 4 / 0 6 3 3 5 1 号（アミノ酸改変により増加した結合親和性を有する変

異体 F c 領域) ; 又は米国特許出願第 1 0 / 6 7 2 2 8 0 号又は国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 9 2 4 9 号 ( アミノ酸改変に起因する F c R に対する結合の変化を伴う F c 変異体 ) , Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第 5 6 4 8 2 6 0 号 ; 米国特許第 5 6 2 4 8 2 1 号 ; 及び国際公開第 9 4 / 2 9 3 5 1 号もまた参照。

【 0 1 6 4 】

d ) システイン改変抗体変異体

ある実施態様において、抗体の 1 つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン改変抗体、例えば、「 t h i o M A b s 」を作成することが望まれ得る。特定の実施態様において、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で起きる。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書中でさらに記載されるように、抗体コンジュゲートを作成するために、例えば薬物部分またはリンカー - 薬剤部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートするために使用することができる。ある実施態様において、一以上の以下の残基がシステインで置換され得る : 軽鎖の V 2 0 5 ( K a b a t の番号付け ) ; 重鎖の A 1 1 8 ( E U 番号付け ) ; 及び重鎖 F c 領域の S 4 0 0 ( E U 番号付け ) 。システイン改変抗体は、例えば、米国特許第 7 5 2 1 5 4 1 号に記載のように生成され得る。

【 0 1 6 5 】

e ) 抗体誘導体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手されている追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール ( P E G ) 、エチレングリコール / プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1 , 3 - ジオキソラン、ポリ - 1 , 3 , 6 - トリオキソラン、エチレン / 無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸 ( 単体重合体又はランダム共重合体の何れか ) 及びデキストラン又はポリ ( n - ビニルピロリドン ) ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単体重合体、プロピレンオキシド / エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール ( 例えばグリセロール ) 、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性のために製造上の利点を有し得る。ポリマーは何れかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、一以上の重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び / 又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が特定の条件下で治療に使用されるのか等を考慮しながら決定することができる。

【 0 1 6 6 】

その他の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱されてもよい抗体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが、提供される。一実施態様において、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))。放射線は、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体 - 非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

【 0 1 6 7 】

B . 組換え方法及び組成物

抗体は、例えば米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号で説明したように、組換えの方法および組成物を用いて製造することができる。一実施態様において、本明細書に記載される抗 F A P 抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。このようなポリヌクレオチドは、抗体の V L を含むアミノ酸配列、及び / 又は抗体の V H を含むアミノ酸配列 ( 例えば、抗体の軽鎖及び / 又は重鎖 ) をコードし得る。更なる実施態様において、そのようなポリヌクレオチドを含む 1 つ以上のベクター ( 例えば、クローニングベクター又は発現



ベクター)が提供される。更なる実施態様において、そのようなポリヌクレオチド又はそのようなベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施態様において、宿主細胞は以下を含む(例えば、以下で形質転換される): (1) 抗体のV<sub>L</sub>を含むアミノ酸配列、及び抗体のV<sub>H</sub>を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含むベクター(例えばポリシストロンベクター)、又は(2) 抗体のV<sub>L</sub>を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む第一ベクター、及び抗体のV<sub>H</sub>を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む第二ベクター。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物細胞、特に哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、又はリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施態様において、抗FAP抗体を作る方法が提供され、その方法は、上記のように、抗体の発現に適した条件下で、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することを含み、および必要に応じて、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から抗体を回収することを含む。

#### 【0168】

抗FAP抗体の組換え生産のために、例えば上述したように、抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドが単離され、宿主細胞内での更なるクローニング及び/又は発現のために1つ以上のベクターに挿入される。当業者によく知られている方法は、適切な転写/翻訳制御シグナルとともに、抗FAP抗体のコード配列を含む発現ベクターを構築するために使用することができる。これらの方法は、インビトロでの組換えDNA技術、合成技術及びインビボでの組換え/遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatis et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) and Ausubel et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載される技術を参照。

#### 【0169】

一実施態様において、抗FAP抗体をコードする1つ又は複数のポリヌクレオチドは、構成的プロモーター又は、代わりに、調節された発現システムの制御下において発現させることができる。適切な調節発現系は、限定されないが、テトラサイクリン調節発現系、エクジソン誘導発現系、lac-switch発現系、グルココルチコイド誘導性発現系、温度誘導性プロモーター系、及びメタロチオネイン金属誘導発現システムを含む。本発明の抗体をコードする複数の異なるポリヌクレオチドが宿主細胞系内に含まれている場合、それらの幾つかは、構成的プロモーターの制御下で発現させることができ、一方で他は調節されるプロモーターの制御下で発現される。

#### 【0170】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要ない場合には、抗体は、細菌で産生することができる。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号、第5789199号及び第5840523号を参照。(また、大腸菌における抗体の発現を説明している、Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照。)発現の後、抗体は可溶性画分において細菌の細胞ペーストから単離され得、更に精製することができる。

#### 【0171】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含む抗体をコードするベクターのための、適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路が、「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の生成をもたらす。Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)、及びLi et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)を参照。このような発現系はまた、米国特許第60/344169号及び国際公開第03/056914号(非ヒト真核生物宿主細胞中でヒト様糖タンパク質を産生するための方法)に教示されている。

#### 【0172】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物と脊椎動物）から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のパキウウイルス株が同定され、これらは特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。

#### 【0173】

植物細胞培養を宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号（トランスジェニック植物における抗体産生に関する *PLANT BODIES*<sup>TM</sup> 技術を記載）を参照。

#### 【0174】

脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40 (COS-7) で形質転換されたサル腎臓 CV1 株、ヒト胚腎臓株 (Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977) に記載された 293 又は 293 T 細胞、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスのセルトリ細胞 (Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) に記載される TM4 細胞)、サル腎臓細胞 (CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa)、イヌ腎臓細胞 (MDCK; バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138); ヒト肝細胞 (HepG2)、マウス乳腺腫瘍 (MMT060562)、例えば Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) に記載される TRI 細胞、MRC5 細胞、および FS4 細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHF R - CHO 細胞 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、及び Y0、NS0 および SP2/0 などの骨髓腫細胞株を含む。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞系の評価については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照。

#### 【0175】

安定的な発現は、一般に一過性発現に対して好ましく、その理由は、それがより再現可能な結果を典型的に達成し、及び大規模生産により適しているためである；しかし一過性発現が特定の状況において良好であるかどうかを判断することは当業者の技術範囲内である。

#### 【0176】

本発明は、宿主細胞によって産生される本発明の抗 FAP 抗体のグリコシル化プロファイルを修飾するための方法を対象としており、前記宿主細胞中で、抗 FAP 抗体をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド、又はグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド、又はそうしたポリヌクレオチドを含むベクターを発現させることを含む。一般に、上述した細胞株を含む培養細胞株の任意のタイプが、変更されたグリコシル化パターンを有する抗 FAP 抗体の産生のための細胞株を生成するために使用できる。好ましい細胞株は、CHO 細胞、BHK 細胞、NS0 細胞、SP2/0 細胞、Y0 骨髓腫細胞、P3X63 マウス骨髓腫細胞、PER 細胞、PER.C6 細胞又はハイブリドーマ細胞、及び他の哺乳動物細胞が挙げられる。グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、(1, 4) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnTIII)、- マンノシダーゼ II (ManII)、(1, 4) - ガラクトシルトランスフェラーゼ (GalT)、(1, 2) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I (GnTI)、(1, 2) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnTII) を含む。一実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドの組み合わせは、宿主細胞中で発現される（例えば、GnTIII 及び Man II）。同様に、この方法はまた、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子が破壊されたか又はそう

でなければ非活性化された宿主細胞内（例えば、1, 6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の活性がノックアウトされた宿主細胞）で抗FAP抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドの発現を網羅する。特定の実施態様において、本発明の抗FAP抗体は、前記抗体のグリコシル化パターンを修飾するためにGnTIII活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に発現する宿主細胞で生産することができる。特定の実施態様において、GnTIII活性を有するポリペプチドは、ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドである。その他の特定の実施態様において、GnTIII活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現する宿主細胞における本発明の抗FAP抗体の発現は、増加したFc受容体結合親和性及び/又は増加したエフェクター機能を有する抗FAP抗体をもたらす。従って、一実施態様において、本発明は、(a) GnTIII活性を有するポリペプチドをコードする配列を含む1つ以上の単離されたポリヌクレオチド；及び(b) 本発明の抗FAP抗体をコードする1つ以上の単離されたポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を対象とする。特定の実施態様において、GnTIII活性を有するポリペプチドは、異種性ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメイン及びGnTIIIの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドである。特に、前記ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼIIのゴルジ局在化ドメインである。このような融合ポリペプチドを生成し、増加したエフェクター機能を有する抗体を産生するためにそれらを使用するための方法は、国際公開第2004/065540号、米国仮特許出願第60/495,142号及び米国特許出願公開第2004/0241817号に開示され、その内容全体が参照により本明細書に援用される。その他の実施態様において、宿主細胞は、マンノシダーゼII (ManII) 活性を有するポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドを更に含む。抗FAP抗体をコードするポリヌクレオチドなど、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、構成的プロモーター又は、代わりに、調節された発現システムの制御下において発現させることができる。このようなシステムは、当技術分野でよく知られており、上述したシステムが含まれている。

#### 【0177】

抗FAP抗体のコード配列及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドのコード配列を含有し、生物学的に活性な遺伝子産物を発現する宿主細胞は、例えば、DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーション；「マーカー」遺伝子機能の有無；宿主細胞内でのそれぞれのmRNA転写物の発現により測定されるように転写のレベルを評価すること；又はイムノアッセイによって、又はその生物学的活性-当技術分野でよく知られている方法によって測定されるような遺伝子産物の検出により同定され得る。GnTIII又はManII活性は、例えば、GnTIII又はManIIの生合成産物に結合するレクチンを用いることによって検出することができる。そのようなレクチンの例は二分するGlcNAcを含むオリゴ糖に優先的に結合するE<sub>4</sub>-PHAレクチンである。GnTIII又はManII活性を有するポリペプチドの生合成産物（すなわち、特定のオリゴ糖構造）はまた、前記ポリペプチドを発現する細胞により生産される糖タンパク質から遊離されたオリゴ糖の質量分析によって検出することができる。あるいは、GnTIII活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにより操作された細胞により産生される抗体によって媒介されるFc受容体結合の増加又はエフェクター機能の増加を測定する機能的アッセイを使用することができる。

#### 【0178】

本発明はまた、修飾されたオリゴ糖を有する抗FAP抗体を産生するための方法を対象とし、(a) グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを、本発明に係る抗FAP抗体の産生を可能にする条件下で発現させるように操作された宿主細胞を培養し、ここで、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する前記ポリペプチドが、前記宿主細胞により産生される前記抗FAP抗体のFc領域においてオリゴ糖を修飾するために十分な量で発現され；及び(b) 前記抗FAP抗体を単離することを含む。一実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性

を有するポリペプチドはG n T I I Iである。その他の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する2つのポリペプチドがある。特定の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する2つのポリペプチドはG n T I I I及びM a n I I Iである。その他の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、G n T I I Iの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドである。より特定の実施態様において、融合ポリペプチドはさらに、ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む。特に、ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼI I又はG n T I Iの局在化ドメインであり、最も具体的にはマンノシダーゼI Iの局在化ドメインである。あるいは、ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼIの局在化ドメイン、G n T I I Iの局在化ドメイン、及び 1, 6 コアフコシルトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群から選択される。

#### 【0179】

特定の実施態様において、宿主細胞又は上述された方法によって生産された修飾された抗F A P抗体は、I g G定常領域又はF c領域を含むその断片を有する。その他の特定の実施態様において、抗F A P抗体は、ヒト化又はヒト抗体又はF c領域を含むそれらの断片である。

#### 【0180】

宿主細胞又は上記の方法により産生されたグリコシル化が変化した抗F A P抗体は、典型的には、宿主細胞の修飾の結果（例えば、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現により）、F c受容体結合親和性の増加及び／又はエフェクター機能の増加を示す。好ましくは、F c受容体結合の増加は、活性化F c受容体、最も好ましくはF c R I I I aへの結合の増加である。エフェクター機能の増加は、好ましくは以下の一つ又は複数における増加である：F c媒介性細胞傷害性の増加、抗体依存性細胞食作用（A D C P）の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込みの増加、F c媒介性細胞傷害の増加、N K細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、多形核細胞（P M N C）への結合の増加、単球への結合の増加、標的結合抗体の架橋の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、樹状細胞成熟の増加、又はT細胞プライミングの増加。

#### 【0181】

##### C. アッセイ

本明細書で提供される抗F A P抗体は、同定され、当技術分野で公知の様々なアッセイによってその物理的／化学的性質及び／又は生物学的活性についてスクリーニングされ、または特徴づけることができる。

#### 【0182】

##### 1. 結合アッセイとその他のアッセイ

一態様において、本発明の抗体は、例えばE L I S A、ウエスタンブロット法など公知の方法により、その抗原結合活性について試験される。

#### 【0183】

その他の態様において、競合アッセイを、F A Pに結合するための他の特異的抗F A P抗体と競合する抗体を同定するために用いることができる。ある実施態様において、このような競合する抗体は、前記の他の特異的抗F A P抗体により結合される同一のエピトープ（例えば、直鎖状又は立体構造エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な典型的な方法が、Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,” in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。

#### 【0184】

典型的な競合アッセイにおいて、固定化F A Pは、F A Pに結合する第一の標識された抗体（実施例に記載される3 F 2抗体など）、及びF A Pへ結合について第一の抗体と競合する能力について試験されている第二の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在してもよい。コントロールとして、固定化F

A P が、第二の未標識の抗体でなく、第一の標識された抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第一の抗体の F A P への結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰の未結合の抗体が除去され、固定化された F A P に結合した標識の量が測定される。もし、固定化 F A P に結合した標識の量が、コントロールサンプルと比較して試験サンプル中で実質的に減少している場合、それは、第二抗体が、F A P への結合に対して、第一の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照。

【 0 1 8 5 】

## 2. 活性のアッセイ

一態様において、アッセイは、生物学的活性を有するそれらの抗 F A P 抗体を同定するために与えられる。生物学的活性は、例えば、標的細胞の溶解、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C)、補体依存性細胞傷害 (C D C)、又はアポトーシスの誘導の溶解を含み得る。インビボ及び/又はインビトロでこのような生物学的活性を有する抗体もまた提供される。

【 0 1 8 6 】

ある実施態様において、本発明の抗体は、そのような生物学的活性について試験される。A D C C を試験するための例示的なアッセイは以上に (「定義」; 「A D C C が増加した抗体」を参照) 及び実施例 11 に記載されている。細胞溶解 (例えば L D H 放出の測定による) 又はアポトーシス (例えば、T U N E L アッセイを使用して) を検出するためのアッセイは、当該分野で周知である。A D C C 又は C D C を測定するためのアッセイは国際公開第 2 0 0 4 / 0 6 5 5 4 0 号 (そのなかの実施例 1 を参照) に記載されており、その全内容が参照により本明細書に援用される。

【 0 1 8 7 】

## D. 抗体コンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤又は薬物、成長抑制剤、毒素 (例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片)、又は放射性同位元素など、1 つ以上の細胞傷害性薬物にコンジュゲートした本明細書中の抗 F A P 抗体を含むコンジュゲートを提供する。

【 0 1 8 8 】

一実施態様において、抗体 - 薬物コンジュゲート (A D C) において、抗体は、限定されないが、メイタンシノイド (米国特許第 5 2 0 8 0 2 0 号、第 5 4 1 6 0 6 4 号及び欧州特許 E P 0 4 2 5 2 3 5 B 1 を参照); モノメチルアウリスタチン薬物部分 D E 及び D F (M M A E 及び M M A F) (米国特許第 5 6 3 5 4 8 3 号及び 5 7 8 0 5 8 8 号及び 7 4 9 8 2 9 8 号を参照) などのアウリスタチン; ドラスタチン、カリケアマイシン又はその誘導体 (米国特許第 5 7 1 2 3 7 4 号、5 7 1 4 5 8 6 号、5 7 3 9 1 1 6 号、5 7 6 7 2 8 5 号、5 7 7 0 7 0 1 号、5 7 7 0 7 1 0 号、5 7 7 3 0 0 1 号、及び 5 8 7 7 2 9 6 号を参照; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); 及び Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); ダウノマイシン又はドキソルビシンなどのアントラサイクリン (Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); 及び米国特許第 6,630,579 号を参照); メトトレキサート、ビンデシン、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセルなどのタキサン、トリコテセン、及び CC1065 を含む一つ以上の薬物とコンジュゲートしている。

【 0 1 8 9 】

その他の実施態様において、抗体コンジュゲートは、酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートした、本明細書に記載の抗体を含み、限定されないが、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの) 外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アブリ

ン A 鎖、モデクシン(modeccin) A 鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。

#### 【0190】

その他の実施態様では、抗体コンジュゲートは、放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートした本明細書に記載されるような抗体を含む。様々な放射性同位体が放射性コンジュゲートの生産のために入手可能である。例としては、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$  及び  $Lu$  の放射性同位体を含む。検出のために放射性コンジュゲートを使用するとき、それはシンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば  $tc^{99m}$  又は  $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)画像化(磁気共鳴画像化  $mr i$  としても知られている)のためのスピン標識、例えば再び、ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含んでよい。

#### 【0191】

抗体と細胞傷害性薬物のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPD P)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの2官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル(例えばジスクシンイミジルズベレート)、アルデヒド(例えばグルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体(例えばビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えばトルエン2,6-ジイソシアネート)及びビス活性フッ素化合物(例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)など、を使って作成され得る。Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載されるように、例えば、リシンイムノトキシンを調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのためのキレート剤の例である国際公開第94/11026号を参照。リンカーは、細胞中に細胞毒性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); 米国特許第5208020号)が使用され得る。

#### 【0192】

本明細書で抗体コンジュゲートは、限定されないが、市販の(例えばPierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.Aからの)、BMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMPB、及びスルホ-SMPB、SVSB(スクシンイミジル(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)を含むクロスリンカー試薬を用いて調製されるコンジュゲートを限定されないが明示的に熟考している。

#### 【0193】

#### E. 診断及び検出のための方法および組成物

ある実施態様において、本明細書で提供される抗FAP抗体の何れかは、生物学的サンプル中のFAPの存在を検出するのに有用である。本明細書で使用する「検出」という用

語は、定量的または定性的検出を包含する。ある実施態様において、生物学的サンプルは細胞又は組織、例えば、脳、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、前立腺、骨格筋、皮膚、小腸、胃、又は子宮からの細胞又は組織などを、これらの器官の腫瘍の細胞又組織も含み、含む。

【0194】

一実施態様において、診断又は検出の方法に使用される抗FAP抗体が提供される。更なる態様において、生物学的サンプル中のFAPの存在を検出する方法が提供される。ある実施態様において、本方法は、抗FAP抗体のFAPへの結合を許容する条件下で、本明細書に記載のように抗FAP抗体と生物学的サンプル、任意でコントロールサンプルと接触させること、及び複合体が抗FAP抗体とFAPとの間に形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ又はインビボでの方法であり得る。一実施態様において、例えばFAPが患者の選択のためのバイオマーカーであるなど、抗FAP抗体が抗FAP抗体による治療に好適な被検体を選択するために使用される。

【0195】

本発明の抗体を用いて診断することができる例示的な疾患は、癌及び特定の炎症性症状などFAPの発現に関連する疾患を含む。

【0196】

一態様において、被検体における疾患を診断する方法が提供され、前記方法は、診断薬の有効量を前記被検体に投与することを含み、ここで、前記診断薬は、本明細書に記載される抗FAP抗体、前記診断薬とFAPの複合体の検出を可能とする標識、典型的には造影剤を含む。

【0197】

ある実施態様において、標識された抗FAP抗体が提供される。標識は、限定されるものではないが、(例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、放射性標識など)直接検出される標識又は部分、並びに、例えば、酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドのような部分が含まれる。典型的な標識の例には、ラジオアイソトープ $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、及び $^{131}\text{I}$ 、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ(米国特許第4737456号)、ルシェフェリン、2,3-ジヒドロフタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、色素前駆体、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離ラジカルなどを酸化する過酸化水素を利用する酵素とカップリングさせたもの、などが含まれる。

【0198】

F. 薬学的製剤

本明細書に記載の抗FAP抗体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有するその抗体と任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.: Williams and Wilkins PA, USA (1980))とを、凍結乾燥製剤または水性溶液の形態で混合することによって調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およ

び m - クレゾール) ; 低分子量 ( 約 10 残基未満 ) ポリペプチド ; タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン ; 親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン ; アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン ; マンノサッカライド、ジサッカライド、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物 ; キレート剤、例えば、EDTA ; 糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール ; 塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体 ( 例えば、Zn - タンパク質錯体 ) ; 及び / 又はポリエチレングリコール ( PEG ) 等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における典型的な薬学的に許容される担体は、介在性薬物分散剤、例えば、水溶性の中性アクティブヒアルロニダーゼ糖タンパク質 ( s H A S E G P )、例えば、r H u P H 20 ( H Y L E N E X ( 登録商標 )、Baxter International, Inc. ) などのヒト可溶性 P H - 20 ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。所定の典型的な s H A S E G P 及び使用法は、r H u P H 20 を含み、米国特許出願公開第 2005 / 0260186 号及び第 2006 / 0104968 に開示されている。一態様において、s H A S E G P は、コンドロイチナーゼなどの 1 つまたは複数の追加のグルコサミノグリカンと組み合わせられる。

#### 【0199】

典型的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第 6267958 号に記載されている。水性の抗体製剤は、米国特許第 6171586 号及び国際公開第 2006 / 044908 号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン - 酢酸緩衝液を含む。

#### 【0200】

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な一以上の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。例えば、治療すべき疾患が癌である場合、1 つ又は複数の抗癌剤、例えば、化学療法剤は、腫瘍細胞の増殖の阻害剤、又は腫瘍細胞のアポトーシスの活性化剤などを更に提供するのが望まれ得る。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わせられ適切に存在する。

#### 【0201】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ ( メチルメタクリレート ( methylmethacrylate ) ) マイクロカプセル)、コロイド薬物送達系 ( 例えばリボソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル) 又はマクロ・エマルジョンなどの調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示される。

#### 【0202】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリックスが成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形をしている。

#### 【0203】

インビボ投与に使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、達成することができる。

#### 【0204】

本明細書中に記載の分子は多様な投与形態であってよく、限定されないが、液体溶液又は懸濁液、錠剤、丸剤、散剤、坐剤、ポリマーマイクロカプセル又はマイクロベシクル、リボソーム、及び注射可能溶液又は注入可能溶液が含まれる。好ましい形態は、投与及び治療用途の様式に依存するが、典型的には、注射可能溶液又は注入可能溶液となる。

#### 【0205】

### G . 治療的方法及び組成物

本明細書中に提供される抗 F A P 抗体又は抗 F A P 抗体を含む薬学的製剤のいずれも、



治療方法で使用するすることができる。

【0206】

本明細書で提供される抗FAP抗体は、同じ細胞型の正常組織に比べて、FAPの発現によって、とりわけFAPの異常な発現（例えば過剰発現又は細胞内の異なるパターンでの発現）によって特徴付けられる疾患を治療するために使用することができる。FAPは、同じ細胞型の非腫瘍組織に比べて多くのヒト腫瘍で異常に発現（例えば過剰発現）される。従って、本明細書で提供される抗FAP抗体は、腫瘍形成の防止、腫瘍の根絶及び腫瘍の増殖又は転移の抑制に特に有用である。本明細書で提供される抗FAP抗体は、FAPを発現する任意の腫瘍を治療するために使用することができる。本明細書において与えられる抗FAP抗体によって治療することができる特定の悪性腫瘍は、例えば、肺癌、結腸癌、胃癌、乳癌、頭頸部癌、皮膚癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、骨格筋の癌を含む。

【0207】

本明細書に開示される抗FAP抗体は、腫瘍の増殖を阻害するか又は腫瘍細胞を死滅ために使用することができる。例えば、抗FAP抗体は癌細胞（腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞）の膜又は細胞表面上にあるFAPに結合し、癌細胞の、例えばADCCまたは他のエフェクター介在性死滅を引き出すことができる。

【0208】

抗FAP抗体は、あるいは特に物理的に別の化合物の結合を妨害することにより、FAP機能をブロックするために使用することができる。例えば、抗原結合分子は、FAPの酵素活性（例えば、セリンペプチダーゼ、ゼラチナーゼ、コラゲナーゼ活性）、FAP媒介性ECM分解、及び/又はFAP媒介性細胞浸潤又は細胞遊走をブロックするために使用することができる。

【0209】

一態様では、医薬として使用するための抗FAP抗体が提供される。更なる態様において、FAPの発現によって特徴付けられる疾患の治療に使用される抗FAP抗体が提供される。ある実施態様において、治療の方法に使用される抗FAP抗体が提供される。ある実施態様において、本発明は、個体に抗FAP抗体の有効量を投与することを含む、FAPの発現により特徴付けられる疾患を有する個体を治療する方法に使用のための抗FAP抗体を提供する。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも1つの追加の治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様において、本発明は、細胞の溶解を誘導するのに使用される抗FAP抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、細胞の溶解を誘導する抗FAP抗体の有効量を個体に投与することを含む、個体の細胞の溶解を誘導する方法で使用される抗FAP抗体を提供する。上記実施態様のいずれかに記載の「個体」は、好ましくはヒトである。上記実施態様の何れかに記載の「FAPの発現によって特徴付けられる疾患」は、好ましくは癌、最も好ましくは、肺癌、結腸癌、胃癌、乳癌、頭頸部癌、皮膚癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、骨格筋の癌から選択される癌である。上記実施態様の何れかに記載の「細胞」は、好ましくは腫瘍に存在する細胞、例えば、腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞、最も好ましくは腫瘍細胞の細胞である。上記実施態様の何れかに記載の「FAP発現」は、異常な発現、例えば、同じ細胞型の正常組織と比較して、過剰発現又は細胞における異なるパターンでの発現である。

【0210】

更なる態様にて、本発明は、医薬の製造又は調製における抗FAP抗体の使用を提供する。一実施態様において、本医薬は、FAPの発現によって特徴付けられる疾患の治療のためのものである。更なる実施態様において、本医薬は、FAPの発現によって特徴付けられる疾患を有する個体に、医薬の有効量を投与することを含む、FAPの発現によって特徴付けられる疾患を治療する方法で使用するためのものである。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも1つの追加の治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様において、本医薬は、細胞の溶解を

誘導するためである。更なる実施態様にて、本医薬は、細胞の溶解を誘導するために本医薬の有効量を個体に投与することを含む、個体における細胞の溶解を誘導する方法で使用するためである。上記実施態様のいずれかに記載の「個体」は、好ましくはヒトである。上記実施態様の何れかに記載の「FAPの発現によって特徴付けられる疾患」は、好ましくは癌、最も好ましくは、肺癌、結腸癌、胃癌、乳癌、頭頸部癌、皮膚癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、骨格筋の癌から選択される癌である。上記実施態様の何れかに記載の「細胞」は、好ましくは腫瘍に存在する細胞、例えば、腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞、最も好ましくは腫瘍細胞の細胞である。上記実施態様の何れかに記載の「FAP発現」は、異常な発現、例えば、同じ細胞型の正常組織と比較して、過剰発現又は細胞における異なるパターンでの発現である。

#### 【0211】

更なる態様にて、本発明は、FAPの発現により特徴付けられた疾患を治療するための方法を提供する。一実施態様において、本方法は、FAPの発現により特徴付けられた疾患などを有する個体に、抗FAP抗体の有効量を投与することを含む。一つのそのような実施態様において、この方法は、後述するように、少なくとも1つの追加の治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様において、本発明は、個体における細胞の溶解を誘導する方法を提供する。一実施態様において、本方法は、細胞の溶解を誘導するために抗FAP抗体の有効量を個体に投与することを含む。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。上記実施態様の何れかに記載の「FAPの発現によって特徴付けられる疾患」は、好ましくは癌、最も好ましくは、肺癌、結腸癌、胃癌、乳癌、頭頸部癌、皮膚癌、肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、骨格筋の癌から選択される癌である。上記実施態様の何れかに記載の「細胞」は、好ましくは腫瘍に存在する細胞、例えば、腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞、最も好ましくは腫瘍細胞の細胞である。上記実施態様の何れかに記載の「FAP発現」は、異常な発現、例えば、同じ細胞型の正常組織と比較して、過剰発現又は細胞における異なるパターンでの発現である。更なる態様において、本発明は、例えば、上記の治療法の何れかに使用される、本明細書で提供される抗FAP抗体の何れかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗FAP抗体の何れかと、及び一以上の薬学的に許容される担体を含む。その他の実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗FAP抗体のいずれかと、少なくとも1つの更なる治療薬を、例えば後述するように含む。

#### 【0212】

本発明の抗体は、治療において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は少なくとも1つの更なる治療薬と同時に投与され得る。ある実施態様において、追加の治療薬は、抗癌剤、例えば、化学療法剤、腫瘍細胞増殖の阻害剤、又は腫瘍細胞のアポトーシスの活性化剤である。

#### 【0213】

上記のこうした併用療法は、併用投与（2つ以上の治療薬が、同一または別々の製剤に含まれている）、及び、本発明の抗体の投与が、追加の治療薬及び/又はアジュバントの投与の前、同時、及び/又はその後起きうる分離投与を包含する。本発明の抗体はまた放射線治療と併用して用いることができる。

#### 【0214】

本発明の抗体（および任意の追加の治療薬）は、任意の適切な手段によって投与することができる。経口、肺内、および鼻腔内、及び局所治療が所望される場合、病巣内投与が含まれる。非経口投与には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。静脈内投与が典型的には好ましい。しかしながら、腹腔内経路が、例えば結腸直腸腫瘍の治療において特に有用であると期待されている。投薬は、その投与が短期間か又は長期であるかどうか部分的に依存し、任意の適切な経路、例えば、静脈内または皮下注射などの注射により行うことができる。限定されないが、様々な時間点にわたる、単一または複数回投与、ボラス投与、パルス注入を含む様々な投与スケジュールが本明細書で考えら

れている。

【0215】

本発明の抗体は良好な医療行為に合致した方法で処方され、投与され、投薬される。この観点において考慮すべき要因は、治療すべき特定の障害、治療すべき特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与日程及び医療従事者が知る他の要因を包含する。抗体は、必要ではないが任意で、問題となる障害の予防又は治療のために、現在使用中の一又は複数の薬剤とともに処方される。そのような他の薬剤の有効量は製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療の種類及び上記した他の要因に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路において、又は、本明細書に記載された用量の1%から99%で、又は経験的に/臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

【0216】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の抗体の適切な用量（単独で使用されるか、又は、一以上の更なる治療的薬剤との組み合わせられる場合）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答性、及び担当医の判断に依存する。抗体は、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、抗体約1 µg / kg から15 mg / kg（例えば0.1 mg / kg から10 mg / kg）が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日当たり用量は上記した要因に応じて約1 µg / kg から100 mg / kg 又はそれ以上の範囲である。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。1つの例示される抗体用量は約0.05 mg / kg から約10 mg / kg の範囲である。従って、約0.5 mg / kg、2.0 mg / kg、4.0 mg / kg 又は10 mg / kg の1つ以上の用量（又はこれらの何れかの組み合わせ）を患者に投与してよい。このような用量は断続的に、例えば毎週又は3週毎（例えば患者が約2から約20、例えば抗体の約6投与量を受けると）投与してよい。初期の高負荷用量の後、1つ以上の低用量を投与してよい。しかしながら、他の用量用法も使用してよい。この治療法の進行は従来の手法及び試験により容易にモニタリングされる。

【0217】

上記の製剤または治療方法のいずれかが、抗FAP抗体の代わりか又は抗FAP抗体に加えて、本発明の抗体コンジュゲートを用いて行うことができることが理解される。

【0218】

H. 製造品

本発明の他の実施態様において、上述した障害の治療、予防、及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器とラベルまたは容器上にあるまたは容器に付属するパッケージ挿入物を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患の治療、予防、及び/又は診断に有効である、それ自体が、又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも一の活性剤は本発明の抗体である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が特定の症状の治療のために使用されることを示している。更に、製造品は、（a）組成物が本発明の抗体を包含する組成物を含む第一の容器；および（b）組成物が更なる細胞障害性又はその他の治療的薬剤を包含する組成物を含む第二の容器を含み得る。本発明の本実施態様における製造品は、組成物が特定の疾患を治療することに用いることができることを示すパッケージ挿入物をさらに含んでもよい。別法として、または加えて、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用静菌水（BWFI）、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液およびデキストロス溶液を含む第二（または第三）の容器をさらに含んでもよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルター

、針、およびシリンジを含む、商業的およびユーザーの立場から望まれる他の物質のさらに含んでもよい。

【0219】

上記の製造品のいずれかは、抗FAP抗体の代わりか又はそれに加えて、本発明の抗体コンジュゲートを含み得ることが理解される。

【実施例】

【0220】

III. 実施例

以下は本発明の方法および組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

実施例1：

組換えDNA技術

Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に既述されるように、標準的な方法がDNAを操作するために使用された。分子生物学的試薬を、製造元の指示に従って使用した。DNA配列は、二本鎖配列決定により決定した。幾つかのケースでは、所望の遺伝子セグメントは、自動化された遺伝子合成による合成オリゴヌクレオチド及びPCR産物から、Geneart AG (Regensburg, Germany)により調製された。特異な制限酵素切断部位に隣接する遺伝子セグメントがpGA18 (amp<sup>r</sup>)プラスミドにクローニングされた。プラスミドDNAを形質転換した細菌から精製し、UV分光法により濃度を決定した。サブクローニング遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。遺伝子セグメントは、それぞれの発現ベクター中にサブクローニングできるように適切な制限部位を伴って設計された。

【0221】

ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の塩基配列に関する一般情報については次に与えられる：Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH出版番号91-3242。発現のために、全ての構築物は、真核細胞内の分泌のためにタンパク質を標的とするリーダーペプチドをコードする5'末端DNA配列を含んでいた。配列番号323から331は、典型的なリーダーペプチドを提供し、ポリヌクレオチド配列は、それらをコードする。

【0222】

(糖鎖操作) 抗体の作製

完全な抗体重鎖及び軽鎖DNA配列は、各レシピエント哺乳動物発現ベクターに予め挿入された定常重鎖又は定常軽鎖の何れかとともに、フレーム内の可変領域をサブクローニングすることにより得られている。抗体の発現はMP5Vプロモーターによって駆動され、ベクターは、CDSの3'末端の合成ポリAシグナル配列を運ぶ。加えて、各ベクターは、EBV OriP配列を含む。

【0223】

抗体は、リン酸カルシウム形質移入を使用して、哺乳動物抗体の発現ベクターをHEK293-EBNA細胞に同時導入することによって産生させた。指数関数的に増殖しているHEK293-EBNA細胞は、リン酸カルシウム法により形質移入される。あるいは、懸濁液中で増殖しているHEK293細胞は、ポリエチレンジアミンで形質移入される。未修飾の非糖鎖操作抗体の生産に対しては、細胞を1:1の比の抗体重鎖及び軽鎖発現ベクターだけで形質移入した。

【0224】

糖鎖操作抗体の生産に対しては、細胞に、2つの追加のプラスミド、融合GnTIIIIポリペプチド発現のために一つ(GnT-III発現ベクター)、及びマンノシダーゼII発現のために一つ(ゴルジマンノシダーゼII発現ベクター)をそれぞれ4:4:1:1の比で同時導入した。細胞を、10%のFCSを補填したDMEM培養培地を使用してTフラスコ中で付着単層培養として増殖させ、それらが50及び80%集密になったとき

に形質移入した。T 1 5 0 フラスコの形質移入では、F C S ( 最終 1 0 % V / V で ) を補填した 2 5 m l の D M E M 培養培地に形質移入の 2 4 時間前に 1 5 0 0 万細胞を播種し、細胞を 5 % C O <sub>2</sub> 大気のインキュベーターに 3 7 ° で一晩配した。形質移入される各 T 1 5 0 フラスコに対して、D N A 、C a C l <sub>2</sub> 及び水の溶液を、軽鎖及び重鎖発現ベクター間に等しく分配された 9 4 μ g の全プラスミドベクター D N A 、4 6 9 μ l の最終容量までの水及び 4 6 9 μ l の 1 M の C a C l <sub>2</sub> 溶液を混合することによって調製した。この溶液に、9 3 8 μ l の 5 0 m M の H E P E S 、2 8 0 m M の N a C l 、1 . 5 m M の N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> 溶液 ( p H 7 . 0 5 ) を加え、直ぐに 1 0 秒間混合し、室温で 2 0 秒間静置した。懸濁液を、2 % の F C S を補填した 1 0 m l の D M E M で希釈し、既存の培地の代わりに T 1 5 0 に加えた。ついで、更なる 1 3 m l の形質移入培地を加えた。細胞を約 1 7 から 2 0 時間、3 7 ° 、5 % C O <sub>2</sub> でインキュベートし、ついで培地を 2 5 m l の D M E M 、1 0 % F C S に置換した。条件培養培地を 2 1 0 × g での 1 5 分の遠心分離によって形質移入から 7 日後に収集し、溶液を滅菌濾過 ( 0 . 2 2 μ m フィルター ) し、0 . 0 1 % w / v の最終濃度のアジ化ナトリウムを加え、4 ° に維持した。

#### 【 0 2 2 5 】

分泌された野生型又は糖鎖操作されたアフコシル化抗体 ( a f u c o s y l a t e d a n t i b o d i e s ) は、プロテイン A ( H i T r a p P r o t A , G E H e a l t h c a r e ) アフィニティークロマトグラフィーを使用するアフィニティークロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製された。簡潔には、カラムは 2 0 m M のリン酸ナトリウム、2 0 m M クエン酸ナトリウム、p H 7 . 5 で平衡化し、細胞上清がロードされ、その後、2 0 m M リン酸ナトリウム、2 0 m M クエン酸ナトリウム p H 7 . 5 による一回目の洗浄、及び 1 3 . 3 m M リン酸ナトリウム、2 0 m M クエン酸ナトリウム、5 0 0 m M 塩化ナトリウム、p H 5 . 4 5 による二回目の洗浄が続いた。抗体は、2 0 m M クエン酸ナトリウム、1 0 0 m M 塩化ナトリウム、1 0 0 m M グリシン p H 3 で溶出した。続く H i L o a d S u p e r d e x 2 0 0 カラム ( G E H e a l t h c a r e ) 上のサイズ排除クロマトグラフィー工程において、バッファーは、2 5 m M リン酸カリウム、1 2 5 m M 塩化ナトリウム、1 0 0 m M のグリシン溶液、p H 6 . 7 、又は 1 4 0 m M 塩化ナトリウム、2 0 m M のヒスチジン、p H 6 . 0 に交換し、純粋なモノマー I g G 1 抗体を採取した。必要であれば、追加の陽イオン交換クロマトグラフィー工程が、2 つの標準的な精製工程の間に含まれる。

#### 【 0 2 2 6 】

精製されたタンパク質サンプルのタンパク質濃度を、アミノ酸配列に基づいて計算されたモル吸光係数を用いて、2 8 0 n m での光学密度 ( O D ) を測定することによって決定する。抗体の純度及び分子量は、還元剤 ( 5 m M の 1 , 4 - ジチオトレイトール ) の存在下及び非存在下での S D S - P A G E 、及びクマシー ( インビトロジェンからの S i m p l e B l u e S a f e S t a i n ) による染色により分析される。N u P A G E ( 登録商標 ) P r e - C a s t ゲルシステム ( I n v i t r o g e n , U S A ) を、製造業者の取扱説明書に従って使用した ( 4 - 2 0 % のトリスグリシン・ゲル ) 。抗体サンプルの凝集体量を、2 m M の M O P S 、1 5 0 m M の N a C l , 0 . 0 2 % の N a N <sub>3</sub> 、p H 7 . 3 の泳動バッファー中、2 5 ° にて S u p e r d e x 2 0 0 1 0 / 3 0 0 G L 分析用サイズ排除カラム ( G E H e a l t h c a r e , S w e d e n ) を使用して分析した。還元した抗体軽鎖及び重鎖のアミノ酸骨格の完全性を、ペプチド - N - グリコシダーゼ F ( R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s ) での酵素的処理による N - グリカンの除去後の N a n o E l e c t r o s p r a y Q - T O F 質量分析によって確認した。

#### 【 0 2 2 7 】

野生型及び糖鎖操作 2 8 H 1 , 2 9 B 1 1 , 3 F 2 及び 4 G 8 ヒト I g G 抗体の精製及び分析の結果を、図 1 5 から図 2 2 に示す。収率は以下の表に与えられる：

	収率[mg/L]	
	野生型	糖鎖操作
28H1 hu IgG	46	40
29B11 hu IgG	10	14
3F2 hu IgG	144	7
4G8 hu IgG	55	12.6

## 【 0 2 2 8 】

抗体のFc領域に結合したオリゴ糖は、後述するように、MALDI TOF-MSによって分析される。オリゴ糖はPNGase F消化により抗体から酵素的に放出される。放出オリゴ糖を含む得られた消化溶液は、MALDI TOF-MS分析のために直接調製されるか、又はMALDI TOF-MS分析のためのサンプル調製に先立ち、Endo Hグリコシダーゼで更に消化する。

## 【 0 2 2 9 】

(糖鎖操作) 抗体の糖鎖構造の分析

フコース及び非フコース(a-フコース)含有オリゴ糖構造の相対比の測定のために、精製した抗体材料の放出されたグリカンにMALDI-ToF-質量分析法によって分析する。タンパク質骨格からオリゴ糖を放出するために、抗体サンプル(約50 µg)を2 mMのTris、pH 7.0中で5 mUのN-グリコシダーゼF(QAbio; PNGase F; E-PNG01)と一緒に37 °Cにて一晩インキュベートするグリカンの脱アミノ化のために、酢酸が最終濃度150 mMまで添加され、37 °Cで1時間インキュベートされる。MALDI TOF質量分析法による分析のために、2 µLのサンプルが2 µLのDHBマトリックス溶液(4 mg/mlで50%エタノール/5 mMのNaClに溶解された2,5-ジヒドロキシ安息香酸[Bruker Daltonics #201346])とともにMALDIターゲット上で混合され、MALDI TOF質量分析計Autoflex II測定器[Bruker Daltonics]で分析される。日常的に、50から300ショットが記録され、単一の実験にまとめられる。得られたスペクトルを、フレックス分析ソフトウェア(Bruker Daltonics)によって評価し、そして質量を検出したピークのそれぞれについて決定する。それに続いて、計算した質量を、それぞれの構造物(例えばそれぞれフコースを含む及び含まない複合体、ハイブリッド、及びオリゴ又は高マンノース)について理論的に予想した質量を比較することによって、ピークをフコース又はa-フコース(非フコース)含有グリコール構造物に割り当てる。

## 【 0 2 3 0 】

ハイブリッド構造の比率を決定するために、抗体サンプルはN-グリコシダーゼFとEndo-グリコシダーゼH[QAbio; Endo H; E-EH02]とで同時に消化される。N-グリコシダーゼFはタンパク質骨格から全てのN-結合型糖鎖構造(複合体、ハイブリッド、及びオリゴ及び高マンノース構造)を放出し、EndoグリコシダーゼHは、グリカンの還元末端で、2つのN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の間の全てのハイブリッドグリカンにさらに開裂する。この消化物は、その後、N-グリコシダーゼF消化サンプルについて上記と同様にMALDI TOF質量分析法によって処理され、分析される。N-グリコシダーゼF消化物からのパターンをN-グリコシダーゼF/Endo Hの組み合わせによる消化物と比較することにより、特定の糖鎖構造のシグナルの減少の程度が、ハイブリッド構造の相対含量を推定するために使用される。各糖鎖構造の相対的な量は、個々の構造のピーク高さと検出された全オリゴ糖のピーク高さの和との比から算出される。フコースの量は、N-グリコシダーゼF処理した試料(例えば

、複合体、ハイブリッド、及びオリゴ及び高マンノース構造のそれぞれ)に同定された全ての糖構造に関連したフコース含有構造の割合である。非フコシル化型の量は、N-グリコシダーゼF処理した試料(例えば、複合体、ハイブリッド、及びオリゴ及び高マンノース構造のそれぞれ)に同定された全ての糖に関連したフコース欠失構造の割合である。

【0231】

別の野生型および糖鎖操作抗FAP抗体の非フコシル化の程度は、次の表で与えられる：

抗体	非フコシル化[%]	
	野生型	糖鎖操作
Hu IgG 28H1	10	40
Hu IgG 29B11	5	27
Hu IgG 3F2(YS)	2.4	64
Hu IgG 4G8	3.8	78

実施例2：

一般的なFabライブラリの構築

Fab形態の一般的な抗体ライブラリを、以下のV-ドメイン組合せを用いてヒト生殖細胞系遺伝子に基づいて構築した。DP47-3ライブラリのためにVH3\_\_23重鎖とVk3\_\_20軽鎖、DP88-3ライブラリのためにVH1\_\_69重鎖とVk1\_\_17軽鎖。配列番号1、2を参照。

【0232】

両ライブラリは、軽鎖(L3)のCDR3および重鎖(H3)のCDR3においてランダム化し、スプライシングパイオーバーラッピングエクステンション(SOE)PCRによって1ライブラリにつき3つのフラグメントから集めた。フラグメント1は、ランダム化したL3を含む抗体遺伝子の5'末端を含み、フラグメント2は、L3からH3に拡がる中央の定常フラグメントであるのに対し、フラグメント3はランダム化したH3と抗体遺伝子の3'部位を含む。

【0233】

以下のプライマーの組合せを用いて、DP47-3ライブラリのためのライブラリフラグメントを生成した。フラグメント1(LMB3-LibL1b\_\_new)、フラグメント2(MS63-MS64)、フラグメント3(Lib2H-fdseq1ong)。表3を参照。以下のプライマーの組合せを用いて、DP88-3ライブラリのためのライブラリフラグメントを生成した。フラグメント1(LMB3-RJH\_\_LIB3)、フラグメント2(RJH31-RJH32)及びフラグメント3(LIB88\_\_2-fdseq1ong)。表4を参照。

表 3.

DP47-3 ライブラリで用いたプライマー		配列番号
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
LibL1b_new	CACTTTGGTCCCCTGGCCGAACGTMNNGGGMNMMNMMNNAC CCTGCTGACAGTAATACACTGC	333
MS63	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC	334
MS64	ACGTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGG	335
Lib2H	GGCCGTATATTACTGTGCGAAANNKNNKNNKNNKNNKTTTGA CTACTGGGGCCAAGGAAC	336
fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG	337

表 4.

DP88-3 ライブラリで用いたプライマー		配列番号
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
RJH_LIB3	GACTTTGGTGGCCCTGGCCAAACGT MNN GGG MNN MNN ACC MNN CTGCAAGCAGTAATAGGTGGCAAAATC	338
RJH31	ACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAG	339
RJH32	TCTCGCACAGTAATACACGGCGGTGTCC	340
LIB88_2	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA -[(33% GAC Asp; 26% GGT Gly; 10% GAA Glu; 9% CGT Arg; 7% Lys; 6% GTT Val; 5% TCT Ser; 4% CTG Leu)1 - (23% GGT Gly; 17% TAC Tyr; 16% TCT Ser; 11% GCT Ala; 9% CGT Arg; 7% AAC Asn; 6% ACT Thr; 6% GTT Val; 5% CCG Pro)8]- TTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC	341
fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG	337

## 【 0 2 3 4 】

ライブラリフラグメント生成のための P C R プロトコールは以下の通りとした。9 4 で 5 分の初期変性と、9 4 で 1 分、5 8 で 1 分および 7 2 で 1 分を 2 5 サイクルと、7 2 で 1 0 分間の最終伸長。アセンブリ P C R のために、等モル比率の 3 フラグメントを鋳型として用いた。アセンブリ P C R プロトコールは以下の通りとした。9 4 で 3 分の初期変性と、9 4 で 3 0 秒、5 8 で 1 分および 7 2 で 2 分を 5 サイクル。この段階で、フラグメント 1 - 3 の外側の配列に相補的プライマーを加え、7 2 で 1 0 分間の最終伸長の前に、さらに 2 0 サイクル行った。

## 【 0 2 3 5 】

十分な量の完全長ランダム化 F a b コンストラクトをアセンブリした後、F a b コンストラクトを、同じように処理したアクセプタファジミドベクターと共に、D P 4 7 - 3 ライブラリのために N c o I / N o t I にて、そして、D P 8 8 - 3 ライブラリのために N c o I / N h e I にて消化した。D P 4 7 - 3 ライブラリのために、2 2 . 8  $\mu$  g の F a b ライブラリを 1 6 . 2  $\mu$  g のファジミドベクターにてライゲートした。D P 8 8 - 3 ライブラリのために、3 0 . 6  $\mu$  g の F a b ライブラリを 3 0 . 6  $\mu$  g のファジミドベクターにてライゲートした。

## 【 0 2 3 6 】

精製したライゲーションは、それぞれ D P 4 7 - 3 ライブラリに 6 8 の形質転換体、D P 8 8 - 3 ライブラリに 6 4 の形質転換体を用いて、D P 4 7 - 3 に 4 . 2 の  $10^{10}$ 、D P 8 8 - 3 に 3 . 3  $\times 10^9$  のサイズの最終ライブラリを得た。F a b ライブラリを表出するファジミド粒子をレスキューし、P E G / N a C l 精製によって精製して選別に用いた。

## 【 0 2 3 7 】

実施例 3 :



#### 抗FAPクローンの選別（一次選別）

ポリ-リジン及び6×his-タグの上流にクローニングしたヒト又はマウス線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）の外部ドメインに対して選別を行った。配列番号：317および319を参照。選別の前に、選別のラウンドに応じて、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の抗原をイムノチューブにコートした。選別は、以下のプロトコールに従って行った。（i）およそ $10^{12}$ ファジミド粒子のライブラリDP47-3の、固定したヒト又はマウスFAPへの2時間の結合、（ii）5mlのPBS/Tween20にて5回及び5mlのPBSにて5回によるイムノチューブの洗浄、（iii）1mlの100mM TEA（トリエチルアミン）を10分間添加することによるファージ粒子の溶出と、500 $\mu\text{l}$ の1M トリス/HCl pH7.4の添加による中和、及び（v）対数期大腸菌TG1細胞の再感染、ヘルパーファージVCSM13による感染、およびその後の選別ラウンドに用いるためのファジミド粒子のその後のPEG/NaCl沈殿。

#### 【0238】

選別は、ヒトFAPの抗原濃度を低下させることを用いて3回又は4回にわたって、及び幾つかのケースでは最終選別ラウンドで $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のマウスFAPを用いて実施された。特異的な結合体を、バックグラウンドの5倍の高さのシグナルと定義し、ELISAによって識別した。NUNCマキシソーププレートに $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒト又はマウスFAPにてコートし、その後Fab含有細菌上清物の添加、抗Flag/HRP二次抗体を用いたそれらのFlag-タグによる特異的結合Fabの検出を行った。

#### 【0239】

ELISAポジティブクローンを、96ウェルフォーマット中で1mLの培養物として細菌を用いて発現させ、上清物をBIACORE T100を用いた動力学的スクリーニング実験に用いた。 $K_D$ は、BIACORE（登録商標）T100装置（GE Healthcare）を用いる表面プラズモン共鳴法により、GM5チップ上でアミン結合により固定された抗ヒトF(ab')<sub>2</sub>断片特異的捕捉抗体（Jackson ImmunoResearch #109-005-006）により25で測定し、続いて、細菌上清、又は精製されたFab調製物に由来するFabを捕獲した。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5, GE Healthcare）を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシニミド（NHS）で活性化した。抗ヒトF(ab')<sub>2</sub>断片特異的抗体を10mM酢酸ナトリウム、pH5.0、で $50\mu\text{g}/\text{ml}$ で希釈し、結合した捕捉抗体の応答単位（RU）がおよそ最大で10,000になるように $10\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で注入した。捕捉抗体の注入後、反応しない群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入した。動力学的測定のために、細菌の上清に由来するFab又は精製されたFabが、流速 $10\mu\text{l}/\text{分}$ で300秒間注入され、捕捉ベースライン安定化のために300秒間解離した。捕捉レベルは100～500RUの範囲であった。続く工程にて、ヒト又はマウスFAP分析物が、HBS-EP+（GE Healthcare, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Surfactant P20, pH7.4）で希釈される単一濃度として又は濃度系列として（100nMから250pMの範囲のクローンの親和性に依存して）、25で $50\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で注入された。会合時間は120又は180秒で、解離時間は300から600秒であった。センサーチップの表面は、グリシンpH1.5の90 $\mu\text{l}/\text{分}$ で30秒間の注入、続いてNaOHを同じ流速で20秒間の注入により再生された。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル（simple one-to-one Langmuir binding model）（BIACORE（登録商標）T100エバリュエーションソフトウェア又はスクラパーソフトウェア（BioLogic））を用いて、会合速度（ $k_{on}$ ）と解離速度（ $k_{off}$ ）を算出した。平衡解離定数（ $K_D$ ）は $k_{off}/k_{on}$ 比として算出された。

#### 【0240】

実施例4：

# 抗FAP親和性成熟ライブラリの構築

3つの親和性成熟ライブラリを、一次抗FAP選別から予め選択した抗体に基づいて構築した。より正確に言うと、それらは、(i)抗ヒトFAPクローン2D9(ライブラリア.m.FAP2D9)(配列番号:229および231を参照)、(ii)抗マウスFAPクローン4B8(ライブラリア.m.FAP4B8)(配列番号:233および235を参照)、および(iii)交差反応性クローン7A1、13B2、13C2、13E8、14C10および17A11(ライブラリア.m.FAPプール)(7A1の可変領域配列に対応する配列番号:237および239;13C2の可変領域配列に対応する配列番号:241および243;13E8の可変領域配列に対応する配列番号:245および247;14C10の可変領域配列に対応する配列番号:249および251;そして、17A11の可変領域配列に対応する配列番号:253および255)に基づいている。

## 【0241】

これら各ライブラリは、軽鎖(L1/L2)のCDR1およびCDR2又は重鎖(H1/H2)のCDR1およびCDR2の何れかをランダム化している2つのサブライブラリからなる。これらサブライブラリは形質転換でプールした。これら各サブライブラリは、増幅およびアセンブリの4つの連続した工程により構築した。

## 【0242】

L1/L2ライブラリでは、増幅およびアセンブリプロトコールには、(i)フラグメント1(LMB3-DPK22\_CDR1\_rand\_ba\_opt)およびフラグメント2(DPK22\_CDR1\_fo-DPK22\_Ck\_BsiWI\_ba)の増幅;(ii)外側のプライマーLMB3とDPK22\_Ck\_BsiWI\_baを用いてフラグメント1及び2をアセンブリし、フラグメント3のための鋳型の作製;(iii)フラグメント3(LMB3-DPK22\_CDR2\_rand\_ba)およびフラグメント4(DPK22\_CDR2\_fo-DPK22\_Ck\_BsiWI\_ba)の増幅;及び、(iv)上記と同じ外側のプライマーを用いたフラグメント3および4の最終アセンブリが含まれる。プライマー配列については表5を参照のこと。

表5.

抗FAP親和性成熟のための L1/L2親和性成熟ライブラリに用いたプライマー		配列番号
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
DPK22_CDR1_rand_ba_opt	CAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAAGT <u>AGC</u> <u>TGCTGCT</u> AACACTCTGACTGGCCCTGCAAG	342
DPK22_CDR1_fo	TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG	343.
DPK22_Ck_BsiWI_ba	GGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTC	344
DPK22_CDR2_rand_ba	CTGTCTGGGATGCCAGTGGCCCTG <u>GCTGGAG</u> <u>GCGCCATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTG</u>	345
DPK22_CDR2_fo	AGGGCCACTGGCATCCCAGACAG	346

下線: 60%元の塩基、40%Vとしてランダム化

太字: 60%元の塩基、40%Nとしてランダム化

## 【0243】

H1/H2ライブラリでは、増幅およびアセンブリプロトコールには、(i)フラグメント1(RJH53-DP47\_CDR1\_rand\_ba\_opt)とフラグメント2(DP47\_CDR1\_fo-MS52)の増幅;(ii)外側のプライマーRJH53とMS52を用いてフラグメント1及び2をアセンブリし、フラグメント3のための鋳型の作製;(iii)フラグメント3(RJH53-DP47\_CDR2\_rand\_ba)およびフラグメント4(DP47\_CDR2\_fo-MS52)の増幅;及び、(iv)上記と同じ外側のプライマーを用いたフラグメント3および4の最終アセンブリが含まれる。プライマー配列については表6を参照のこと。

表 6.

抗FAP親和性成熟のための H1/H2 親和性成熟ライブラリに用いたプライマー		配列番号
RJH53	CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC	347
DP47_CDR1_rand_ba_opt	GAGCCTGGCGGACCCAGCTCAT <u>G</u> <u>G</u> CATAAC TGCTAAAGGTGAATCCGGAGGC	348
DP47_CDR1_fo	ATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTC	349
MS52	GAAGACCGATGGGCCTTTGGTGCTAG	350
DP47_CDR2_rand_ba	CCTTCACGGAGTCTGCGTAGTATGT <u>G</u> <u>G</u> CTAC <u>C</u> <u>A</u> CCACTACC <u>A</u> CTAATAG <u>G</u> CTGAGACCCACT CCAGCCCCTTCCC	351
DP47_CDR2_fo	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG	352

下線: 60% 元の塩基、40% Vとしてランダム化

太字: 60%元の塩基、40% Nとしてランダム化

#### 【0244】

最終アセンブリ生成物は、クローン2D9、4B8又はクローン7A1、13B2、13C2、13E8、14C10および17A11の等モル混合物のプラスミド調製に基づく同様に処理したアクセプタベクターと共に、a.m.FAP2D9およびa.m.FAP4B8のL1/L2サブライブラリではNcoI/BsiWIにて、a.m.FAP2D9及びa.m.FAP4B8のH1/H2サブライブラリではMunIおよびNheIにて、並びに、a.m.FAPpoolのL1/L2ライブラリではNcoI/BamHIにて、そしてa.m.FAPプールのH1/H2ライブラリではBspEI/PstIにてそれぞれ消化した。以下の量の消化したランダム化(部分的)V-ドメインおよび消化したアクセプタベクター(一又は複数)を、それぞれのライブラリのためにライゲートした。(μgのV-ドメイン/μgのベクター): a.m.FAP2D9 L1/L2サブライブラリ(5.7/21.5)、a.m.FAP2D9 H1/H2サブライブラリ(4.1/15.5)、a.m.FAP4B8 L1/L2サブライブラリ(6.5/24.5)、a.m.FAP4B8 H1/H2サブライブラリ(5.7/21.5)、a.m.FAPプールL1/L2サブライブラリ(4.4/20)、a.m.FAPプールH1/H2サブライブラリ(3.4/15.5)。

L1/L2およびH1/H2サブライブラリの精製したライゲートをプールし、3つ各々の親和性成熟ライブラリのために60の形質転換体に用い、a.m.FAP2D9には $6.2 \times 10^9$ 、a.m.FAP4B8には $9.9 \times 10^9$ およびa.m.FAPプールには $2.2 \times 10^9$ のサイズの最終ライブラリを得た。

#### 【0245】

これらFabライブラリを表出するファジミド粒子をレスキューし、PEG/NaCl精製にて精製し、二次選別に用いた。

#### 【0246】

追加の抗FAP親和性成熟ライブラリ(クローン3F2、3D9、4G8、4B3および2C6に基づく)の構築

抗FAP抗体の第一親和性成熟キャンペーンから予め選択した交差反応性の抗体、すなわち、クローン3F2、3D9、4G8、4B3及び2C6を基礎として、さらに4つの親和性成熟ライブラリを構築した(3F2の可変領域配列に対応する配列番号: 195および197; 3D9の可変領域配列に対応する配列番号: 199および201; 4B3の可変領域配列に対応する配列番号: 209および211; 2C6の可変領域配列に対応する配列番号: 217および219)。より正確に言うと、4つのライブラリは、1)抗FAPクローン3F2、4G8および4B3(可変重鎖のCDR1および2においてランダム化したV<sub>H</sub>ライブラリ、すなわちH1/H2ライブラリ)、2)抗FAPクローン3D9および2C6(可変軽鎖のCDR1および2においてランダム化したV<sub>L</sub>ライブラリ、すな

わち L 1 / L 2 ライブラリ)、3) 抗 F A P クローン 3 F 2 (軽鎖の C D R 3 にソフトランダム化を持つ L 3 ライブラリ、すなわち L 3 ライブラリ)および 4) 抗 F A P クローン 3 F 2 (重鎖の C D R 3 にソフトランダム化を持つ H 3 ライブラリ、すなわち H 3 ライブラリ)に基づく。それぞれ L 1 / L 2 および H 1 / H 2 ライブラリには、抗 F A P 抗体の第一親和性成熟キャンペーンで概説したのと全く同じように、最初の 2 つのライブラリを構築した。これに対して、クローン 3 F 2 に基づく L 3 および H 3 親和性成熟ライブラリには、2 つの新規なプライマーを用いて、親のクローンの L 3

<

(AM\_3F2\_DPK22\_L3\_ba: CACTTTGGTCCCCTGGCCGAACGT CGGGGGAAGCA  
TAATACCCTGCTGACAGTAATACACTGC

下線を付した塩基は 6 0 % が所定の塩基で 4 0 % が混合物 N (4 つのヌクレオチド A、C、G および T の混合物)である)、及び H 3

(AM\_3F2\_DP47\_H3\_fo: GGCCGTATATTACTGTGCG AAA GGG TGG TTT GGT GGT  
TTT AAC TACTGGGGCCAAGGAAC

下線を付した塩基は 6 0 % が所定の塩基で 4 0 % が混合物 N であり、イタリック体の塩基は 6 0 % が所定の塩基で 4 0 % が G、並びにイタリック体の下線を付した塩基は 6 0 % が所定の塩基で 4 0 % が混合物 K (2 つのヌクレオチド G および T の混合物)である)にソフトランダム化を導入した。ライブラリサイズは以下になった。H 1 / H 2 ライブラリ ( $1.13 \times 10^{10}$ )、L 1 / L 2 ライブラリ ( $5.6 \times 10^9$ )、L 3 ライブラリ ( $2.3 \times 10^{10}$ ) および H 3 ライブラリ ( $2.64 \times 10^{10}$ )。

【0247】

実施例 5：

親和性成熟した抗 F A P クローンの選別

ポリ-リジン及び  $6 \times \text{his}$ -タグの 5' にクローニングしたヒト又はマウス線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) の外部ドメインに対して選別を行った。配列番号：317 および 319 を参照。選別の前に、ライブラリと選別のラウンドに応じて、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$  又は  $0.2 \mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度の抗原をイムノチューブにコートした。選別は、以下のプロトコールに従って行った。(i) およそ  $10^{12}$  ファジミド粒子のライブラリ a.m.F A P 2 D 9、a.m.F A P 4 B 8 又は a.m.F A P プールの、固定したヒト又はマウス F A P への 2 時間の結合、(ii) (ライブラリと選別ラウンドに応じて)  $5 \text{mL}$  の P B S / T w e e n 2 0 にて 10 - 20 回及び  $5 \text{mL}$  の P B S にて 10 - 20 回によるイムノチューブの洗浄、(iii)  $1 \text{mL}$  の  $100 \text{mM}$  T E A (トリエチルアミン) を 10 分間添加することによるファージ粒子の溶出と、 $500 \mu\text{L}$  の  $1 \text{M}$  トリス / H C l p H 7.4 の添加による中和、及び (v) 対数期大腸菌 T G 1 細胞の再感染、ヘルパーファージ V C S M 1 3 による感染、およびその後の選別ラウンドに用いるためのファジミド粒子のその後の P E G / N a C l 沈殿。

【0248】

選別は 2 ラウンド以上行い、3 つのライブラリ各々について個々に条件を調整した。具体的には、選別パラメータは、a.m.F A P 2 D 9 (ラウンド 1 では  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$  のヒト F A P と合計 20 回の洗浄、ラウンド 2 では  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  のヒト F A P と合計 30 回の洗浄)、a.m.F A P 4 B 8 (ラウンド 1 では  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  のマウス F A P と合計 30 回の洗浄、ラウンド 2 では  $0.2 \mu\text{g} / \text{mL}$  のヒト F A P と合計 40 回の洗浄)、および a.m.F A P プール (ラウンド 1 では  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$  のヒト F A P と合計 30 回の洗浄、ラウンド

2では5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のマウスFAPと合計30回の洗浄)とした。特異的な結合体を、バックグラウンドの5倍の高さのシグナルと定義し、ELISAによって識別した。NUNCマキシソーププレートに1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒト又はマウスFAPにてコートし、その後Fab含有細菌上清物の添加、抗Flag/HRP二次抗体を用いたそれらのFlag-タグによる特異的結合Fabの検出を行った。

#### 【0249】

上記の通り、ELISAポジティブクローンを、96ウェルフォーマット中で1mLの培養物として細菌を用いて発現させ、上清物をBIACORE T100を用いた動力学的スクリーニング実験に用いた(実施例3を参照)。

#### 【0250】

親和性成熟した抗FAPクローンの更なる選別

6xリジンおよび6xhistタグの上流にクローニングしたヒト及びマウス線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)の外部ドメインに対して選別を行った(配列番号:317および319を参照)。選別の前に、ライブラリと選別のラウンドに応じて、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の抗原をイムノチューブにコートした。抗FAP抗体の第一親和性成熟キャンペーンについて記述したように、選別およびELISAベースのスクリーニングを行った。二次スクリーニングはProtein XPR36バイオセンサ(Biorad)を使用して行い、動力学的速度定数および親和性を同じ計測器上で親和性精製したFab調製物を分析して決定した。 $K_D$ は、Protein XPR36バイオセンサ装置(Biorad)を用いる表面プラズモン共鳴法により、GLMチップ上に固定された抗ヒトF(ab')<sub>2</sub>断片特異的捕捉抗体(Jackson ImmunoResearch #109-005-006)により25で測定し、続いて、細菌上清、又は精製されたFab調製物に由来するFabを捕獲した。簡潔には、GLMバイオセンサーチップ(Biorad)は、新たに調製したN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の混合物で5分間活性化した。抗ヒトF(ab')<sub>2</sub>断片特異的捕捉抗体が、10mMの酢酸ナトリウム、pH5.0で24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈され、最大約10,000応答単位(RU)の結合捕捉抗体を獲得するため5分間注入した。捕捉抗体の注入後、反応しない群をブロックするために1Mのエタノールアミンを5分間注入した。動力学測定のために、細菌上清からのFabが流速30  $\mu\text{L}/\text{分}$ で100秒間注入された。捕捉量は250RUの範囲にあった。続く工程において、25で50  $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で、PBS/0.005%Tween-20で希釈された、ヒトマウスまたはカニクイザルのFAP分析物の段階希釈が注入された(2段階希釈、最高濃度25nM)。会合時間は240秒で、解離時間は600から1800秒であった。センサーチップは0.85%のH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を30秒間100  $\mu\text{L}/\text{分}$ での注入、続く50mMのNaOHを同じ流速で30秒間注入により再生された。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)(Proteinマネージャーソフトウェアバージョン2.1)を用いて、会合速度( $k_{on}$ )と解離速度( $k_{off}$ )を算出した。平衡解離定数( $K_D$ )は $k_{off}/k_{on}$ 比として算出される。

#### 【0251】

以下の親和性成熟クローンが識別された。19G1(配列番号257および259を参照)、20G8(配列番号281および263を参照)、4B9(配列番号265および267を参照)、5B8(配列番号269および271を参照)、5F1(配列番号273および275を参照)、14B3(配列番号277および279を参照)、16F1(配列番号281および283を参照)、16F8(配列番号285および287を参照)、O3C9(配列番号289および291を参照)、22A3(配列番号301および303を参照)および29B11(配列番号305および307を参照)(全てのこれらのクローンはH1/H2ライブラリから選択されており、親クローンの3F2かた由来する)、O2D7(配列番号293および295を参照)(親クローンの3F2に基づくL3

ライブラリから選択される)および28H1(配列番号297および299)および23C10(配列番号309および311を参照)(これら二つのクローンはH1/H2ライブラリから選択されており、親クローン4G8から由来する)。

#### 【0252】

図1から5は、固定化したFAPに結合する選択した親和性成熟Fabの表面プラズモン共鳴を示し、表7は生成された各々の親和性を示す。選択されたFabはpMからnMの高親和性範囲におよび、選択されたクローンについて測定される場合、ヒト(hu)及びマウス(mu)FAP、ならびにカニクイザル(cyno)FAPに対して交差反応性である。親和性成熟抗FAP Fabは、特異性解析のために、IgG抗体及びFab-IL2-Fab形態に変換された。結合の特異性は、HEK293またはCHO細胞に発現し、FAPの近接ホモログとしてのDPPIVへの結合の欠如によって示された(実施例9を参照)。

表7.

*Fab断片(一価の結合)としての親和性成熟抗FAP抗体の  
動力学的平衡定数( $K_D$ )の概要*

抗体	hu FAPに対する 親和性( $K_D$ ) [pM]	mu FAPに対する 親和性( $K_D$ ) [pM]	cyno FAPに対する 親和性( $K_D$ ) [pM]
19G1	76	2600	n.d.
20G8	69	2800	n.d.
4B9	157	3300	n.d.
5B8	690	3200	n.d.
5F1	243	4100	n.d.
14B3	377	3800	n.d.
16F1	193	3400	n.d.
16F8	301	3800	n.d.
O3C9	160	3700	n.d.
O2D7	619	8300	n.d.
28H1	200	9	3600
22A3	34	655	522
29B11	35	436	23
23C10	1600	125	990

#### 【0253】

実施例6:

FAPに結合するFabのIgG変換

親3F2、4G8および3D9 Fabおよび親和性成熟3F2および4G8 Fab誘導体が、ヒトIgG1形態、マウスIgG2a形態およびヒトIgG1形態に変換された。

#### 【0254】

完全抗体の重鎖及び軽鎖DNA配列が、異なるレシピエント哺乳動物発現ベクター中に予め挿入された各々の定常重鎖及び定常軽鎖とともにフレーム中に可変領域をサブクローニングすることにより得られ、あるいはレシピエントベクターに相同な短い配列伸展を融合することにより組換えられた。組換えは、インビトロジェンからの「In-Fusionクローニングシステム」に従って行われた。

#### 【0255】

全てのベクターにおいて、抗体の発現はMPSVプロモーターによって駆動され、全て

のベクターは、CDSの3'末端の合成ポリAシグナル配列を運ぶ。加えて、各ベクターは、EBV OriP配列を含む。

#### 【0256】

実施例7：

抗FAP IgG抗体のピアコア分析

抗FAP Fab断片の3F2、4G8及び3D9、ならびにヒトIgG1変換抗FAP抗体の親和性が続いて決定され、BIACORE（登録商標）T100装置（GE Healthcare）を用いた25°での表面プラズモン共鳴（SPR）分析により、ヒト、マウス及びカニクイザルのFAPについて確認された。この目的のために、ヒト、マウスまたはカニクイザルFAPの細胞外ドメイン（配列番号317から322）が固定された抗His抗体（Penta His Qiagen 34660）により捕捉され、その抗体を分析物として用いた。固定化のために、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5, GE Healthcare）を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシニミド（NHS）で活性化した。Penta His抗体を10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5、で40 µg/mlに希釈し、結合したタンパク質の応答単位（RU）がおおよそ9000になるように10 µl/分の流速で注入した。リガンドの注入後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入した。

#### 【0257】

動力学測定のために、ヒト又はカニクイザルFAP細胞外ドメインが、（Fab断片について）10 nMで20秒間、又は（IgGについて）20 nMで25秒間、10 µl/分で注入され、固定化ペンタHis抗体によりそのHisタグを介して捕捉された。抗体の段階希釈（Fab断片について、6.25 nMから200 nMの範囲で2倍希釈、又はIgGについて、3.2 pMから10 nMの範囲で5倍の希釈）を、HBS-EP+（GE Healthcare, 10 mMのHEPES、150 mMのNaCl、3 mMのEDTA、0.05%界面活性剤P20、pH 7.4）に、25°で約90 µl/分の流速で注入する。次のパラメータが適用された：会合時間180秒、解離が300秒（Fabについて）又は900秒（IgGについて）、各サイクルの間に60秒間、10 mMのグリシン、pH 2で再生。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル（simple one-to-one Langmuir binding model）（BIACORE（登録商標）エバリュエーションソフトウェアバージョン1.1.1）を用いて、会合速度（ $k_{on}$ ）と解離速度（ $k_{off}$ ）を算出した（モデルパラメータは、ローカルRmaxおよびRI=0であった）。平衡解離定数（ $K_D$ ）は $k_{off}/k_{on}$ 比として算出された。

#### 【0258】

結合の $K_D$ 値が、表8に示されている。図6A-CはFab断片について対応するSPRベースの動力学解析を示し、図7A-CはIgG抗体について示す。

表 8.

*Fab* 断片として及び *IgG* としての 3F2, 4G8 および 3D9 FAP 抗体の  
動力学的平衡定数( $K_D$ )の概要

コンストラクト	ヒト FAP	マウス FAP	カニクイザル FAP
<b>IgG 3F2</b>	結合活性: 39 pM (avidity)	結合活性: 29 pM (avidity)	結合活性: 42 pM (avidity)
<b>IgG 4G8</b>	結合活性: 51 pM (avidity)	結合活性: 1 pM (avidity)	結合活性: 59 pM (avidity)
<b>IgG 3D9</b>	結合活性: 93 pM (avidity)	結合活性: 96 pM (avidity)	結合活性: 96 pM (avidity)
<b>Fab 断片 3F2</b>	親和性: 13 nM (affinity)	親和性: 14 nM (affinity)	親和性: 11 nM (affinity)
<b>Fab 断片 4G8</b>	親和性: 74 nM (affinity)	親和性: 7 nM 以下 (affinity)	親和性: 56 nM (affinity)
<b>Fab 断片 3D9</b>	親和性: 133 nM (affinity)	親和性: 32 nM (affinity)	親和性: 143 nM (affinity)

## 【 0 2 5 9 】

## 実施例 8 :

抗 F A P 抗体 3 F 2、4 G 8 および 3 D 9 のヒト腫瘍組織切片上への結合

我々は、抗 F A P 抗体クローン 3 F 2、4 G 8 と 3 D 9 をマウス I g G 2 a として使用し、新鮮な凍結ヒト腫瘍組織（乳癌、結腸腺癌および N S C L C 組織）における F A P の発現を検出して比較する実験を行った。

## 【 0 2 6 0 】

R o c h e T R S P a t h o l o g y & T i s s u e B i o m a r k e r s t u m o r b a n k . からの、各々 2 つのスポットを持つ 30 の異なる腫瘍を含む、一つの新鮮な凍結組織マイクロアレイ ( T M A ) ( A S T 2 7 4 ) を用いた。T M A は、乳房の 10 の浸潤性乳管癌、10 の結腸直腸腺癌および 10 の非小細胞肺癌を含む T M A は、A s t e r a n d L t d , R o y s t o n , U K から入手した。

## 【 0 2 6 1 】

免疫組織化学 ( I H C ) 染色のために、以下の抗体が用いられた: モノクローナルマウス抗ヒト F A P クローン 3 F 2 ( 1 5 . 8 n g / m l、ペンタナ抗体希釈液 ( V e n t a n a A n t i b o d y D i l u e n t ) で希釈)、モノクローナルマウス抗ヒト F A P クローン 4 G 8 ( 1 0 0 0 n g / m l、ペンタナ抗体希釈液 ( V e n t a n a A n t i b o d y D i l u e n t ) で希釈)、及びモノクローナルマウス抗ヒト F A P クローン 3 D 9 ( 1 0 0 0 n g / m l、ペンタナ抗体希釈液 ( V e n t a n a A n t i b o d y D i l u e n t ) で希釈) ポリクローナルマウス I g G 2 a、濃度 1 0 0  $\mu$  g / m l ( プロバイダー: D A K O , X 0 9 4 3 , ロット # 0 0 0 5 8 0 6 6 ) がアイソタイプコントロールとして用いられた。

## 【 0 2 6 2 】

染色は、( 染色用の D A B とユニバーサル H R P マルチマーを含む ) 検出用の H R P システムを伴うペンタナウルトラビュー検出キット ( V e n t a n a U l t r a - V i e w d e t e c t i o n k i t ) を用いて、ペンタナベンチマーク X T 機器 ( V e n t a n a B e n c h m a r k X T i n s t r u m e n t ) 上で、標準的なプロトコルに従って実施された。対比染色はヘマトキシリン I I ( ペンタナ、マイヤーのヘマトキシリン ) とブルーイング ( B l u e i n g ) 試薬 ( ペンタナ ) で 8 分間行われた。T M A は半定量的に分析され、腫瘍組織における F A P 発現 ( 染色強度 ) の総量並びに F A P の発現の局在が解析された。



## 【 0 2 6 3 】

3つ全ての抗FAP抗体により、評価することが可能な3つの腫瘍組織サンプル（乳癌、結腸直腸癌および肺癌）の全てが、腫瘍の間質成分において中程度から強い染色のFAPシグナル強度を示した。各腫瘍と抗体に対して10サンプルのうち少なくとも7が評価可能であった。残りのサンプルは評価することができなかったが、その理由は組織コアが、フォールディングした人工物を持っていたか、正常組織のみを含有していたか、又は欠失していたためである。

## 【 0 2 6 4 】

期待されたように、FAPシグナルは、腫瘍の間質成分に常に局在化していた。クローン3F2およびクローン3D9と4G8の間のシグナル強度にわずかな違いがあった。若干強いシグナルがクローン3D9と4G8で見られたが、しかしながら違いは軽微であった。

## 【 0 2 6 5 】

図8A-Dは、抗FAPマウスIgG2a 3F2、3D9はまたは4G8、またはアイソタイプコントロール抗体を用いた、FAPについて免疫組織化学的染色されたヒト腫瘍組織サンプルの代表的な顕微鏡写真を示す。

## 【 0 2 6 6 】

実施例9：

細胞上での抗FAP抗体のFAPに対する結合

ヒトIgG1抗体の3F2、4B3及び4G8の、安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞に発現したヒトおよびマウスのFAPに対する結合を、FACSにより測定した。簡潔には、丸底96ウェルプレートにおいて、ウェルあたり150,000細胞を、抗FAP抗体の3F2、4B3及び4G8の指示された濃度でインキュベートし、4で30分間インキュベートし、PBS/0.1%のBSAで1回洗浄した。結合した抗体を、FACS Canto II (Software FACS Diva) を使用して30分間4でインキュベーション後、FITC結合AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>断片ヤギ抗ヒトF(ab')<sub>2</sub> Specific (Jackson Immuno Research Lab #109-096-097, 希釈標準溶液: PBS/0.1% BSAで1:20に希釈, 新たに調製) を用いて検出した。結果を図9に示す。ヒト及びマウスFAPについて最大半量結合でのEC50値が決定され、表9に与えられる。

表9.

細胞における抗FAP抗体のFAPに対する結合 (EC50値)

	細胞におけるEC50値[nM]	
	ヒト FAP	マウス FAP
3F2 IgG	4.8	1.0
4B3 IgG	5.5	1.6
4G8 IgG	5.0	1.7

## 【 0 2 6 7 】

FAP抗体の特異性

ファージディスプレイ由来抗体の結合特異性を評価するために、DPP IV (健常者組織で発現されるFAPの近接ホモログ) 又はHER2を安定的に発現するHEK293細胞に対する結合が、抗FAPヒトIgG1抗体の3F2、4B3及び4G8について測定された。簡潔には、丸底96ウェルプレートにおいて、ウェルあたり200,000細胞 (

HEK293-DPP-IV又はコントロールとしてHEK293-HER2)を、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗FAP抗体の3F2、4B3又は4G8でインキュベートし、4で30分間インキュベートし、PBS/0.1%のBSAで1回洗浄した。トラスツズマブ(抗HER2抗体)またはフィコエリトリン(PE)結合マウス抗ヒト抗CD26/DPP-IV抗体(CD26=DPP-IV、マウスIgG1、k、BDバイオサイエンス、#555437、クローンM-A261)を陽性コントロールとして使用した。結合した抗体を、FACS Canto II (Software FACS Diva)を使用して30分間4でインキュベーション後、PE結合AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>断片ヤギ抗ヒトIgG Fc Specific (Jackson Immuno Research Lab #109-116-170, 希釈標準溶液: PBS/0.1%BSAで1:20に希釈, 新たに調製)を用いて検出した。この実験の結果を図10に示す。抗FAP抗体のいずれもDPP-IVまたはHER2に対する有意な結合を示さなかったが、陰性コントロール(二次抗体単独、アイソタイプコントロール抗体、または全く抗体無し)の範囲のシグナルを示した。

#### 【0268】

ヒト線維芽細胞での抗FAP抗体のFAPに対する結合

ヒト線維芽細胞株GM05389(ヒト胎児肺に由来; 一般医科学研究所(National Institute of General Medical Sciences)、Camden, NJ)に発現されたヒトFAPに対するヒトIgG1抗体の結合をFACSによって測定した。簡潔には、丸底96ウェルプレートにおいて、ウェルあたり200.000細胞を、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗FAP抗体の3F2又は4G8とともにインキュベートし、4で30分間インキュベートし、PBS/0.1%のBSAで1回洗浄した。結合した抗体を、FACS Canto II (Software FACS Diva)を使用して30分間4でインキュベーション後、FITC結合AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>断片ヤギ抗ヒトIgG Fc Specific (Jackson Immuno Research Lab #109-096-098, 希釈標準溶液: PBS/0.1%BSAで1:20に希釈, 新たに調製)を用いて検出した。この実験の結果を図11に示す。両方の抗-FAP抗体が、ヒト線維芽細胞上に発現したFAPに強く結合する。

#### 【0269】

ヒト腫瘍細胞での抗FAP抗体のFAPに対する結合

FACSによって、ヒト線維芽細胞株GM05389上と安定的にトランスフェクトされたHEK293細胞上に発現されたヒトFAPに対するヒトIgG1抗体の結合を、ヒト癌細胞株のACHN, Colo205, MDA-MB231, MDA-MB435及びKPL4におけるFAP発現に対して比較した。

#### 【0270】

簡潔には、丸底96ウェルプレートにおいて、ウェルあたり200.000細胞を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗FAP抗体の3F2又は4G8とともにインキュベートし、4で30分間インキュベートし、PBS/0.1%のBSAで1回洗浄した。結合した抗体を、FACS Canto II (Software FACS Diva)を使用して30分間4でインキュベーション後、FITC結合AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>断片ヤギ抗ヒトF(ab')<sub>2</sub> Specific (Jackson Immuno Research Lab #109-096-097, 希釈標準溶液: PBS/0.1%BSAで1:20に希釈, 新たに調製)を用いて検出した。この実験の結果を図12に示す。抗体の3F2及び4G8は、線維芽細胞及び安定にトランスフェクトしたHEK293細胞上に強く過剰発現されるFAPに特異的に結合するが、ACHN, Colo205, MDA-MB231, MDA-MB435及びKPL4のヒト腫瘍細胞上にはほんの弱い結合しか検出されないことを示す。

#### 【0271】

実施例10:

#### FACSによる抗FAP抗体の結合の際のFAP内部移行の分析

当該分野で既知の幾つかのFAP抗体について、それらは結合の際にFAPの内部移行を誘導することが記述されている（例えば、Baum et al., J Drug Target 15, 399-406 (2007); Bauer et al., Journal of Clinical Oncology, 2010 ASCO年会予稿集（ポストミーティング版）, 28巻（5月20日補足）, アブストラクト番号13062（2010）; Ostermann et al., Clin Cancer Res 14, 4584-4592 (2008)に記載）。

#### 【0272】

従って、我々は我々の抗体の内部移行特性を分析した。簡単に言えば、EMEM培地+FCSで培養されたGM05389細胞（ヒト肺線維芽細胞）が分離され、洗浄され、カウントされ、生存能力についてチェックされ、12ウェルプレートに0.2mio細胞/ウェルの密度で播種した。翌日、FAP抗体4G8及び3F2（図13A）又は4G8のみ（図13B）が冷却培地に10µg/mlまで希釈され、細胞は氷上で冷却され、その希釈抗体（0.5ml/ウェル）又は培地のみが指示されるように添加された。その後、細胞を穏やかに攪拌しながら、低温室で30分間インキュベートし、0.5mlの温かい培地を添加し、37℃で指定された時間、細胞を更にインキュベートした。異なる時点に到達したとき、細胞は氷へと移され、冷却PBSで1回洗浄し、0.4mlの2次抗体（Alexa Fluor 633結合ヤギ抗ヒトIgG; Molecular Probes #A-21091, 2mg/ml, 使用1:500）とともに30分間4℃でインキュベートした。細胞は次いでPBS/0.1%BSAで2回洗浄され、96ウェルプレートに移し、4℃で4分間、400×gで遠心分離し、細胞ペレットをボルテックスで再懸濁した。細胞は、100µlの2パーセントPFAを用いて固定した。FACS測定のため、細胞を200µl/サンプルPBS/0.1%BSA中に再懸濁し、FACS Canto IIのプレートプロトコルで測定した（Software FACS Diva）。これらの実験の結果が図13A及びBに示され、4G8と3F2抗FAP抗体が線維芽細胞でFAPの内部移行を誘発しないことを示している。

#### 【0273】

#### 免疫蛍光法による抗FAP抗体の結合の際のFAP内部移行の分析

GM05389細胞（ヒト肺線維芽細胞）が、ガラスカバースリップ上、EMEM培地+15%FCS中で増殖された。処置の前に、細胞はPBSで3回洗浄され、EMEM培地+0.1%BSA中で2時間飢餓状態にした。抗FAP抗体（4G8 IgG抗体）または抗CD20抗体（GA101、アイソタイプコントロールとして使用）が冷却EMEM培地中で最終濃度10µg/mlまで希釈した。飢餓状態後に、細胞を氷上で冷却し、冷却PBSで2回すすぎ、希釈抗体（0.5ml/ウェル）と共に、表面結合可能なように持続性攪拌下、4℃で45分間インキュベートした。次いで細胞は冷却PBSで2回洗浄し、冷却PFA（（T0, パラホルムアルデヒド PBS中に4% pH7.4））で固定するか、又はEMEM+10%FCS中で、37℃で、20分間、1時間、3時間、および6時間さらにインキュベートした。各時点で、細胞を冷却PBSで2回洗浄し、氷上で20分間PFA固定した。固定した後、細胞を冷却PBSで4回洗浄し、0.03%トリトンで透過し、ブロッキングバッファー（PBS+10%FCS）中、室温で45分間、抗EEA1（初期エンドソームマーカー）抗体と共にインキュベートした。次いで、細胞をPBSで3回洗浄し、蛍光標識二次抗体（ロバ抗マウスAlexa Fluor 594結合抗体、およびヤギ抗ヒトAlexa Fluor 488結合抗体）と共に45分間室温でインキュベートした。細胞を最終的に洗浄し、Immuno Mount封入剤を使用してガラス製の支持スライド上にマウントした。

#### 【0274】

図14-Dは、（A）4℃で45分間の抗FAP 4G8 IgGの結合後、（B）37℃で20分間の抗FAP 4G8 IgGの結合後、（C）37℃で1時間の抗FAP 4G8 IgGの結合後、又は（D）37℃で6時間の抗FAP 4G8 IgGの結合後に得られたGM05389肺線維芽細胞上のFAP細胞膜染色を示す代表的な免疫蛍光を示す。抗CD20抗体GA101は、アイソタイプコントロールとして使用され、バックグラウ

ンド染色を示す。E E A 1 は初期エンドソームをラベルする。抗 F A P 4 G 8 抗体結合後最長 6 時間までの、F A P 表面細胞膜染色の持続性を注意のこと。

【0275】

実施例 11:

親和性成熟抗 F A P I g G 抗体のピアコア分析

3 F 2 及び 4 G 8 に由来する親和性成熟抗 - F A P F a b 断片を、ウサギ I g G 抗体に変換した。親和性成熟 3 F 2 及び 4 G 8 ベースのウサギ I g G 1 変換性抗 F A P 抗体の F A P に対する親和性が、続いて決定され、25 での S P R 解析により ( B i a c o r e )、ヒト、マウス、及びカニクリザルの F A P において確認された。この目的のために、ヒト、マウスまたはカニクイザル F A P の細胞外ドメイン ( 配列番号 3 1 7 から 3 2 2 ) が固定された抗 H i s 抗体 ( P e n t a H i s Q i a g e n 3 4 6 6 0 ) により捕捉され、その抗体を分析物として用いる。I g G は 1 0 n M から 3 . 2 n M まで 1 : 5 に希釈される。次のパラメータが適用される: 会合時間 1 8 0 秒、解離 9 0 0 秒、流れは 9 0  $\mu$  l / 分。1 0 m M のグリシン p H 2 により 6 0 秒間で再生。K D 値を得るために、曲線を 1 : 1 モデルによりフィットさせた ( R m a x ローカル , R I = 0 )。

【0276】

実施例 12:

細胞上での親和性成熟抗 F A P 抗体の F A P に対する結合

4 G 8 親抗体に由来し、A l e x a - 6 4 7 で標識された親和性成熟ヒト I g G 1 抗体 2 8 H 1 の、安定的にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞上で発現されたヒト F A P に対する結合が F A C S により測定された。簡潔には、ウェルあたり 2 0 0 0 0 0 細胞が、丸底 9 6 ウェルプレート中で、親の 4 G 8 抗体及び親和性成熟 2 8 H 1 抗 F A P 抗体の指定された濃度の 2  $\mu$  g / m l 及び 1 0  $\mu$  g / m l とともにインキュベートし、4 で 3 0 分間インキュベートし、P B S / 0 . 1 % B S A で 1 回洗浄した。結合抗体を、F A C S C a n t o I I ( S o f t w a r e F A C S D i v a ) を用い、4 で 3 0 分間のインキュベーションの後に検出した。データは、両方の抗体が、ヒト F A P でトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞に強く結合することを示している ( 図 2 3 )。

【0277】

実施例 13:

ヒト線維芽細胞での親和性成熟抗 F A P 抗体の F A P に対する結合

ヒト線維芽細胞株 G M 0 5 3 8 9 ( ヒト胎児肺に由来; 一般医科学研究所 ( N a t i o n a l I n s t i t u t e o f G e n e r a l M e d i c a l S c i e n c e s ) , C a m d e n , N J ) に発現されたヒト F A P に対する、3 F 2 に由来する親和性成熟ヒト I g G 1 抗体の結合を F A C S によって測定する。簡潔には、丸底 9 6 ウェルプレートにおいて、ウェルあたり 2 0 0 . 0 0 0 細胞を、3 0  $\mu$  g / m l の親和性成熟 3 F 2 抗 F A P 抗体とともにインキュベートし、4 で 3 0 分間インキュベートし、P B S / 0 . 1 % の B S A で 1 回洗浄した。結合した抗体を、F A C S C a n t o I I ( S o f t w a r e F A C S D i v a ) を使用して 3 0 分間 4 でインキュベーション後、F I T C 結合 A f f i n i P u r e F ( a b ' ) 2 断片ヤギ抗ヒト I g G F c S p e c i f i c ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b # 1 0 9 - 0 9 6 - 0 9 8 , 希釈標準溶液: P B S / 0 . 1 % B S A で 1 : 2 0 に希釈, 新たに調製) を用いて検出する。ヒト及びマウス F A P について最大半量結合での E C 5 0 値が決定されている。

【0278】

実施例 14:

糖鎖操作抗 F A P I g G 1 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

4 G 8 又は 3 F 2 由来 F A P に対するヒト I g G 1 抗体は、実施例 1 に記載されるように、G n T I I I と M a n I I をコードするプラスミドによる同時導入によって糖鎖操作された。続いて、糖鎖操作親 4 G 8 および 3 F 2 および親和性成熟 2 8 H 1 ヒト I g G 1 抗体を、それらの非糖鎖操作野生型バージョンに比較して優れた抗体媒介性細胞傷害を媒介するそれらの能力について、A D C C アッセイで比較した。

簡潔には、ヒトFAPで安定的にトランスフェクトされたHEK293細胞を標的細胞として収集し、洗浄し、培地中に再懸濁し、30分間37℃で新たに調製したカルセインAM (Molecular Probes) で染色し、3回洗浄し、カウントされ、300,000細胞/mlに希釈した。この懸濁液を丸底96ウェルプレート(30,000細胞/ウェル)に移し、それぞれの抗体希釈液を添加し、試験された抗体の細胞に対する結合を容易にするために、エフェクター細胞と接触させる前に、10分間インキュベートした。PBM Cについてエフェクターとターゲットの比率は1~25であった。共インキュベーションは4時間実施された。読み出し情報として、攻撃された細胞の分解後の上澄み液中への乳酸脱水素酵素(LDH)の放出が使用される。共培養上清からのLDHはLDH検出キット(Roche Applied Science)を使用して収集され分析された。LDH酵素による基質変換は、ELISA吸光リーダー(SoftMax Proソフトウェア、リファレンス波長:490nm対650nm)を用いて測定された。図24に示すように、試験されたすべての抗FAP抗体は、HEK293-hFAP細胞上でADCCを誘導することができた。糖鎖操作(glyco)バージョンは、対応する野生型(wt)非糖鎖操作バージョンよりも常に良好に機能した。

#### 【0279】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために例示および実施例によってある程度詳細に説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。すべての特許および本明細書に引用される科学文献の開示は、参照によりその全体が援用される。