

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-541601

(P2023-541601A)

(43)公表日 令和5年10月3日(2023.10.3)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18		4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全127頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-515861(P2023-515861)	(71)出願人	523085533		
(86)(22)出願日	令和3年9月10日(2021.9.10)		プレシリックス・ナームローゼ・ベンノ		
(85)翻訳文提出日	令和5年5月1日(2023.5.1)		ートシヤープ		
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/075009		ベルギー、ブリュッセル・ビー-109		
(87)国際公開番号	WO2022/053651		0、ブルゲメステール・エティエンヌ・		
(87)国際公開日	令和4年3月17日(2022.3.17)		デミュンターラン・3		
(31)優先権主張番号	20195428.6	(74)代理人	100114188		
(32)優先日	令和2年9月10日(2020.9.10)		弁理士 小野 誠		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100119253		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 金山 賢教		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(	(74)代理人	100124855		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		弁理士 坪倉 道明		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR	(74)代理人	100129713		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		弁理士 重森 一輝		
	最終頁に続く	(74)代理人	100137213		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 F A P に対する抗体フラグメント

(57)【要約】

本発明は、ヒト及び／又はマウス F A P のエピトープに特異的に結合し、且つ部分構造などのエンティティに連結され得る抗体フラグメントの分野に関する。形成された抗体フラグメント及び化合物は、治療又は診断目的で使用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 4、1、2 若しくは 3 の少なくとも 1 つとの少なくとも 80 % の配列同一性又は前記配列番号の長さの 50 % を超える少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって表される抗体フラグメント。

【請求項 2】

配列番号 4、1、2 又は 3 のいずれかを含む、請求項 1 に記載の抗体フラグメント。

【請求項 3】

配列番号 4 の正確な長さ又は配列番号 4 の正確な長さよりも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 アミノ酸だけ長い範囲にわたる長さを有する、請求項 1 又は 2 に記載の抗体フラグメント。

10

【請求項 4】

ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合し、前記抗体のエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65～90 及び／若しくは 101～140 内に含まれる、好ましくは請求項 1～3 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント。

【請求項 5】

ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合し、前記抗体の構造的エピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65～90 及び 101～140 の組合せ内に含まれる、好ましくは請求項 1～3 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント。

20

【請求項 6】

配列番号 26 の以下のアミノ酸：

1) I 62、S 63、G 64、Q 65、E 66 から選択される少なくとも 1 つ、又は少なくとも 2 つ、又は少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

2) I 76、V 77、L 78、Y 79、N 80、I 81、E 82、T 83、G 84、Q 85、S 86、Y 87、T 88、I 89、L 90、S 91 から選択される少なくとも 1 つ、又は少なくとも 2 つ、又は少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

3) L 105、S 106、P 107、D 108、R 109、Q 110、F 111 から選択される少なくとも 1 つ、又は少なくとも 2 つ、又は少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

30

4) D 134、L 135、S 136、N 137 から選択される少なくとも 1 つ、又は少なくとも 2 つ、又は少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

5) V 158 及び／又は G 159、及び／又は

6) R 175、及び／又は

7) D 457 及び／又は Y 458

に特異的に結合する、請求項 4 又は 5 に記載の抗体フラグメント。

【請求項 7】

重鎖抗体 (V H H) 由来の重鎖可変ドメイン又はそのフラグメントである、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント。

【請求項 8】

ヒト F A P (配列番号 26) に特異的に結合し、且つマウス F A P (配列番号 30) に特異的に結合する、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント。

40

【請求項 9】

ヒト及び／又はマウス F A P のモジュレータではなく、好ましくは F A P ジペプチジルペプチダーゼ活性を実質的に阻害しない、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント。

【請求項 10】

好ましくはバイオレイヤー干渉法を用いて評価される、 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ モル／リットルの範囲にわたる K_D 及び／又は $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 秒 $^{-1}$ の範囲にわたる k_{off} でヒト F A P に特異的に結合する、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント

50

。

【請求項 1 1】

部分構造などのエンティティに連結されている、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体フラグメントを含む化合物。

【請求項 1 2】

前記部分構造は、標識、好ましくは放射性核種である、請求項 1 1 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

前記放射性核種は、 α 線放出放射性核種及び β^- 線放出放射性核種からなる群から選択され、好ましくは、前記放射性核種は、アクチニウム-225、アスタチン-211、ビスマス-212、ビスマス-213、セシウム-137、クロム-51、コバルト-60、銅-67、ジスプロシウム-165、エルビウム-169、フェルミウム-255、金-198、ホルミウム-166、ヨウ素-125、ヨウ素-131、イリジウム-192、鉄-59、鉛-212、ルテチウム-177、モリブデン-99、パラジウム-103、リン-32、カリウム-42、レニウム-186、レニウム-188、サマリウム-153、ラジウム-223、ラジウム-224、ルテニウム-106、スカンジウム-47、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テルビウム-149、テルビウム-161、テルビウム-149、トリウム-227、キセノン-133、イッテルビウム-169、イッテルビウム-177 及び イットリウム-90 からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の化合物。

10

【請求項 1 4】

前記放射性核種は、ヨウ素-131、イットリウム-90、ヨウ素-125、ルテチウム-177、レニウム-186、レニウム-188、スカンジウム-43、スカンジウム-44、テクネチウム-99m、テルビウム-161、インジウム-111、キセノン-133、タリウム-201、フッ素-18、ガリウム-68、ガリウム-67、銅-67、ヨウ素-123、ヨウ素-124、ジルコニウム-89 及び 銅-64 からなる群から選択されるものを含む、陽電子放出放射性同位体 (PET) 又は γ 線放出放射性同位体 (SPECT) からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の化合物。

20

【請求項 1 5】

前記放射性核種は、ヨウ素-131 である、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の化合物。

【請求項 1 6】

前記抗体フラグメント及び前記放射性核種は、リンカー、好ましくはベンゾエートリンカーによって分離されており、より好ましくは、前記リンカーは、N-スクシンイミジル-4-グアニジノメチル-3-[I-131] ヨードベンゾエート又はその好適な誘導体を含む、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 1 7】

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、前記構造的エピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び 101 ～ 140 の組合せ内に含まれ、前記抗体フラグメントは、SGMIB を介してヨウ素-131 に連結されている、抗体フラグメント、

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、前記構造的エピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び 101 ～ 140 の組合せ内に含まれ、前記抗体フラグメントは、DOTA 又は DTPA を介してルテチウム-177 に連結されている、抗体フラグメント、

40

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、前記構造的エピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び 101 ～ 140 の組合せ内に含まれ、前記抗体フラグメントは、DOTA を介してアクチニウム-225 に連結されている、抗体フラグメント、又は

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、前記構造的エピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び 101 ～ 140 の組合せ内に含まれ、前記抗体フラグメントは、テクネチウム-99m に連結さ

50

れている、抗体フラグメント

を含むか又はそれである、請求項 11～16 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 18】

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 4 と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列によって表され、SGMIB を介してヨウ素－131 に連結されている抗体フラグメント、

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 4 と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列によって表され、DOTA 又は DTPA を介してルテチウム－177 に連結されている抗体フラグメント、

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 4 と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列によって表され、DOTA を介してアクチニウム－225 に連結されている抗体フラグメント、又は

－ ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 4 と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列によって表され、テクネチウム－99m に連結されている抗体フラグメント

を含むか又はそれである、請求項 11～16 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 19】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント又は請求項 11～18 のいずれか一項に記載の化合物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物。

【請求項 20】

医薬品として使用するためのものであり、好ましくは、前記医薬品は、癌細胞上及び／又は CAF 上でのヒト FAP の発現と関連する癌を処置するためのものである、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント、請求項 11～13、15 若しくは 16～18 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント又は請求項 11、12、14～18 のいずれか一項に記載の化合物を含む診断用組成物。

【請求項 22】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント、請求項 11～13、15 若しくは 16～18 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 19 若しくは 20 に記載の組成物を含む併用療法であって、前記医薬品は、癌細胞上及び／又は CAF 上でのヒト FAP の発現に関連する癌を処置するためのものであり、追加の化合物が使用される、併用療法。

【請求項 23】

前記追加の化合物は、抗体又は抗体フラグメントであるか、或いは腎臓保持を最適化することができる分子、例えば血漿若しくは代用血液又は正に荷電されたアミノ酸である、請求項 22 に記載の併用療法。

【請求項 24】

方法であって、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体フラグメント、又は請求項 11、12、14～18 のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項 21 に記載の組成物は、対象における FAP、好ましくはヒト FAP の発現を評価するために使用される、方法。

【請求項 25】

ヒト FAP の発現を可能にする核酸構築物を含む非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）のエピトープに特異的に結合し、且つ部分構造などのエンティティに連結され得る抗体フラグメントの分野に関する。前記抗

10

20

30

40

50

体フラグメントの用途に応じて、この部分構造は、放射性核種であり得る標識であり得る。本発明は、癌の予防及び／又は治療に使用するための標識抗体フラグメントに関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、世界中の罹患率及び死亡率の主な原因の1つである。副作用を最小限に抑えながら癌に対抗する改善された治療法が継続的に必要とされている。FAPは、癌関連線維芽細胞（CAF）及びまた骨、脳、乳房、結腸直腸、食道、胃、肝臓、肺、卵巣、脾臓、副甲状腺、腎臓などの癌細胞（Pureら（2018年）「Oncogene Aug」；第37巻（第32号）：第4343～43573頁）で発現又は過剰発現されることが分かっている一方、FAPは、健康な細胞では発現されないか又は低レベルである。したがって、FAPは、興味深い癌標的と思われる。これまで、FAPを標的とする抗体は、治療用抗体として承認されていない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

したがって、当技術分野では、ヒトFAPを標的とする更なる抗体が必要とされている。

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】ターゲティングベクターの異なる要素である。

20

【図2】ELISAによって決定される、ヒトFAP組換えタンパク質、マウスFAP組換えタンパク質又はヒトDPP IV組換えタンパク質に結合するHA-His₆タグ付けVHH B1、B2、B3及びB4のシグナル対バックグラウンド比である。＊未決定。

【図3】ヒトFAP発現GM05389細胞及びマウスFAP発現HEK293細胞に対する、HA-His₆タグ付けVHH B1、B2、B3及びB4の結合の $\Delta m f i$ 値である。HEK-マウスFAP細胞におけるVHH B3及びGM05389細胞におけるVHH B4についての $\Delta m f i$ 値は、10よりも小さかった。

【図4】HA-His₆タグ付けVHH（B1、B2又はB3）、メシル酸タラボスタット（阻害剤対照）とプレインキュベートされるか、又はFAP結合分子を伴わない（陽性対照）ヒトFAP組換えタンパク質による基質加水分解である。全ての条件について、平均相対蛍光単位（ $n=2$ ）を時間の関数で示す。

30

【図5】24時間にわたるヒトFAP発現GM05389細胞に対する¹³¹I標識B1（そのHis₆タグ付け及び非タグ付けバージョン）の細胞保持である。データを平均±SDとして表した（ $n=3$ ）。

【図6】24時間にわたるヒトFAP発現GM05389及びHEK-293細胞上における¹⁷⁷Lu標識非タグ付けVHH B1の細胞保持である。データを平均±SDとして表した（ $n=3$ ）。

【図7】24時間にわたるヒトFAP発現GM05389細胞上における²²⁵Ac標識非タグ付けVHH B1の細胞保持である。データを平均±SDとして表した（ $n=3$ ）。

【図8】異なる放射性標識非タグ付けVHH B1で処置したマウスの生存を表す Kaplan-Meier 曲線である。¹³¹I標識非タグ付けVHH B1は、（A1）腫瘍発生を阻害するその能力、及び（A2）結果として生じる処置マウスの延命によって明らかにされるように、確立された皮下ヒト神経膠芽腫瘍（U87 MG）を有するマウスで有効であり；（B）²²⁵Ac標識非タグ付けVHH B1は、（B1）腫瘍発生を阻害するその能力、及び（B2）結果として生じる処置マウスの延命によって明らかにされるように、確立された皮下ヒトHEK-293腫瘍を有するマウスで有効であり；（C）¹⁷⁷Lu標識非タグ付けVHH B1は、（C1）腫瘍発生を阻害するその能力、及び（C2）結果として生じる処置マウスの延命によって明らかにされるように、確立された皮下ヒト神経膠芽腫瘍（U87 MG）を有するマウスで有効である。MS：平均生存。

40

【発明を実施するための形態】

50

【0005】

抗体フラグメント

本発明の第1の態様では、ヒト及び／又はマウスFAPと特異的に結合する抗体フラグメントが提供される。一実施形態では、前記抗体フラグメントは、配列番号1、2、3、4の少なくとも1つ又はその一部と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって表される。

【0006】

一実施形態では、ヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する、提供される抗体フラグメントは、以下の少なくとも1つを満たす：

a. エピトープは、配列番号26のアミノ酸26～760内に含まれ、好ましくは、エピトープは、配列番号26のアミノ酸65～90及び／又は101～140内に含まれ（又はそれを含み）、

b. 配列番号26の少なくともアミノ酸I62、S63、G64、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137、V158、G159、R175、D457及び／又はY458は、前記抗体フラグメントと相互作用し、

c. 前記抗体フラグメントは、配列番号1、2、3、4の少なくとも1つ又はその一部と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって表される。

【0007】

この態様の一実施形態では、ヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する、提供される抗体フラグメントは、以下の少なくとも1つを満たす：

a. エピトープは、配列番号26のアミノ酸26～760内に含まれ、好ましくは、エピトープは、配列番号26のアミノ酸65～90及び／又は101～140内に含まれ（又はそれを含み）、

b. 抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D134、L135、S136、N137から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V158及び／又はG159、及び／又は

6) R175、及び／又は

7) D457及び／又はY458

に特異的に結合し、

c. 前記抗体フラグメントは、配列番号1、2、3、4の少なくとも1つ又はその一部と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって表される。

【0008】

この態様の一実施形態では、ヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する、提供される抗体フラグメントであって、そのエピトープが配列番号26のアミノ酸26～760の範囲内に含まれる、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも1つ、又は少

なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V 1 5 8及び／又はG 1 5 9、及び／又は

6) R 1 7 5、及び／又は

7) D 4 5 7及び／又はY 4 5 8

に特異的に結合する。

【0009】

この態様の一実施形態では、ヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する、提供される抗体フラグメントであって、そのエピトープが配列番号26のアミノ酸65～90及び／又は101～140の範囲内に含まれる（又はそれらを含むそのエピトープを有する）、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V 1 5 8及び／又はG 1 5 9、及び／又は

6) R 1 7 5、及び／又は

7) D 4 5 7及び／又はY 4 5 8

に特異的に結合する。

【0010】

本出願を通して、FAPは、FAPアルファと同義であり、且つポリペプチドのプロリルエンドペプチダーゼFAPに対応し、これは、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（FAPアルファ）とも称される。このタンパク質をコードする遺伝子は、FAPと呼ばれる。

【0011】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. ヒト FAP 及びマウス FAP のアミノ酸配列(Uniprot エントリ Q12884 及び P97321 からそれぞれ誘導)

配列番号 26 ヒト	MKTWVKIVFGVATSAVLALLVMCIVLRPSRVHNSEENTMRALTLKDILNG TFSYKTFFPNWISGQEYLHQSadNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNA SNYGLSPDRQFVYLESdYSKLWRYSYATYYIYDLNNGEFVRGNELPRP IQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPgDPPFQITfNGRENKIFNGIPDW VYEEEmLATKYALWWSPNGKFLAYAEfNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRTI NIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVpVPAMIASSDYYfSWLTW VTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQTwDCPKTQEHIEESRTG WAGGFFVSTPVfSYDAISYYKIFSDKdGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWE AINIFRVTQDSLfySSNEfEYpGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCHLRKER CQYYTASfSDYAKYYALVCYGPgIPISLHDGRtdQEIKILEENKELENAL KNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMILPPQfDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSV RSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGDkLLYAVYRKLGVYEVE DQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWsYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVA PVSSWEYYASVYTERfMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLI HGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHL YTHMTHFLKQCfSLSD
配列番号 30 マウス	MKTWLKTVFGVTTLAALALVVICIVLRPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGT FSYKTYFPNWISEQEYLHQSEDDNIVfYNIETRESYIILSNSTMKSVNATD YGLSPDRQFVYLESdYSKLWRYSYATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPIQ YLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPgDPPFQITYTGRENRIfNGIPDWV YEEEmLATKYALWWSPDGKFLAYVEfNDSDIPIIAYSYYGDGQYPRTINI PYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPVPEMIASSDYYfSWLTW VSSERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWHAWECpKNQEHVEESRTG WAGGFFVSTPAfSQDATSYKIFSDKdGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKW EAIYIFRVTQDSLfySSNEfEGYpGRRNIYRISIGNSPPSKKCVTCHLRKE RCQYYTASfSYKAKYYALVCYGPGLPISTLHDGRtdQEIQVLEENKELE NSLRNIQLPKVEIKKLKDGGLTFWYKMILPPQfDRSKKYPLLIQVYGGPC SQSVKSVFAVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDkFLHAVYRKLGVY EVEDQLTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWsYGGYVSSLALASGTGLFKCGI AVAPVSSWEYYASISYERfMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVD YLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGISSGRS QNHLYTHMTHFLKQCfSLSD

10

20

30

40

【0012】

本発明に関連して、「抗体フラグメント」という用語は、抗体又は免疫グロブリンの任意のフラグメントを指す。一実施形態では、抗体フラグメントは、単一ドメイン抗体フラグメントである。一実施形態では、抗体フラグメントは、重鎖抗体（VHH）由来の重鎖可変ドメイン又はそのフラグメントである。好ましい実施形態では、単一ドメイン抗体フラグメントは、VHH又はそのフラグメントである。本明細書に開示される重鎖抗体（すなわちVHH）に由来する重鎖可変ドメインは、単一のポリペプチド鎖からなる。本出願に関連して、「抗体フラグメント」という表現は、「単一ドメイン抗体フラグメント」、又は「VHH」、又は「VHHのフラグメント」、又は「VHHの機能的フラグメント」

50

によって置き換えられ得る。好ましくは、抗体又はV H Hのフラグメントは、少なくとも抗体の活性又はV H Hの活性をある程度呈するため、機能的フラグメントである。「ある程度」とは、少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%又はそれを超えるものを意味し得る。抗体フラグメント、V H H又はV H Hのフラグメントの好ましい活性は、ヒト及び／又はマウスF A Pに対する特異的結合である。「ヒト及び／又はマウスF A Pに対する特異的結合」は、本明細書で後に定義される。

【0013】

説明の最後に、「抗体」、「抗体フラグメント」、「アゴニスト」、「アンタゴニスト」、「抗体フラグメントのバリエーション」のより詳細な定義を提供する。

【0014】

より具体的には、本明細書に開示されるV H H又はそのフラグメントは、自然免疫系又は適応免疫系、好ましくは自然免疫系又は適応免疫系のタンパク質に由来する。更により詳細には、本明細書に開示されるV H Hは、4つのフレームワーク領域（F R）及び3つの相補性決定領域（C D R）又はその任意の好適なフラグメント（通常、C D Rの少なくとも1つを形成するアミノ酸残基の少なくともいくつかを含む）を含み得る。特に、本明細書に開示されるV H Hは、好ましくは、微生物組換え発現系において高収率で生成するのが容易であり、続いて単離及び／又は精製するのに便利である。

【0015】

本明細書で後により詳細に記載される特定の実施形態によれば、本発明は、ヒト及び／又はマウスF A Pへの結合に特に適した抗体フラグメントを提供する。一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、ヒトF A P及びマウスF A Pに特異的に結合する。一実施形態では、抗体フラグメントは、ヒト及び／又はマウスF A Pの細胞外ドメインの一部に結合する。

【0016】

ヒトF A Pは、腫瘍形成機能を有する癌関連線維芽細胞（C A F）で特異的に発現、より具体的には過剰発現されるため、標的とされるのに非常に魅力的である（P u r eら（2018年）「O n c o g e n e」、8月；第37巻（第32号）：第4343～4357頁）。これは、一部の癌細胞（例えば、本明細書で後に開示される白血病、骨、子宮、膵臓、皮膚、筋肉、脳、乳房、結腸直腸、食道、胃、肝臓、肺、卵巣、副甲状腺、腎臓の癌など）でも発現され、且つ健常細胞ではあまり発現されない。したがって、ヒトF A Pは、腫瘍抗原又は癌細胞抗原と見なされ得、したがって診断標的及び／又は治療標的として使用され得る。

【0017】

しかしながら、本発明の抗体フラグメントの他の用途（診断及び治療）も本発明に包含される。そのような他の診断及び／又は治療用途は、癌に関連しないが、線維症、創傷治療、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、関節炎並びに他の炎症性及び線維性疾患に関連し得る。換言すれば、本発明の抗体フラグメントは、線維症、創傷治療、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、関節炎並びに他の炎症性及び線維性疾患を診断及び／又は治療するための診断及び／又は治療用途で使用する事ができる。より詳細な説明は、本明細書で後述する。

【0018】

本発明の抗体フラグメントは、抗体のC D R（相補性決定領域）配列を含み得（又は本明細書で更に記載されるように、そのようなC D R配列に基づき得、且つ／若しくはそのようなC D R配列から誘導され得る）、それらは、一般に、本明細書では（すなわちそれぞれC D R 1配列、C D R 2配列及びC D R 3配列として）「C D R配列」とも称される。一実施形態では、本明細書に開示されるV H Hは、本明細書に記載のC D R 1配列、C D R 2配列及びC D R 3配列からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。したがって、特定の実施形態では、本発明は、以下の（一般的な）構造を有する重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメインを提供する：

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

10

20

30

40

50

本発明に関連して、I M G T命名法は、F R（フレームワーク領域）F R 1、F R 2、F R 3及びF R 4並びに対応するC D R領域C D R 1、C D R 2及びC D R 3を定義するために使用される。使用されるI M G T命名法の定義は、本明細書において、本発明の定義の目的のための一般的な部分で後に提供される。しかしながら、本発明は、その最も広い意味において、これらのアミノ酸残基のストレッチが、本明細書に開示されるような可変ドメインがヒト及び／又はマウスF A Pに特異的に結合することを可能にする限り、これらのアミノ酸残基のストレッチが、本明細書に開示されるような重鎖可変ドメインにおいて有し得る特定の構造的役割又は機能に限定されないことに留意されたい。したがって、一般に、本発明は、その最も広い意味において、部分構造などのエンティティにカップリングすることができる単一ドメイン抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントに関する。本発明に関連して、部分構造などのエンティティにカップリングした抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントは、化合物と呼ばれ得る。

10

【0019】

この部分構造は、標識であり得る。標識は、放射性核種であり得る。代わりに、標識は、非放射性であり得る。本発明の化合物が標識を含む場合、これは、標識化合物と呼ばれ得る。放射性標識化合物は、好ましくは、C A F細胞及び／又は癌細胞におけるヒトF A Pの発現に関連する癌を処置するために使用される。非放射性標識化合物は、本明細書で後に開示されるように、診断用途で使用されることが好ましい。

20

【0020】

別の用途では、この部分構造は、線維症、創傷治癒、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、関節炎並びに他の炎症性及び線維性疾患を治療するための医薬品であり得る。そのような用途では、本発明の抗体フラグメントは、それを処置するために列挙された疾患の部位に医薬品を標的化するために使用される。

【0021】

好ましい実施形態では、部分構造は、国際公開第2013064508A1号パンフレットに記載のアドレノメデュリンのプロドラッグ、国際公開第2014097151A2号パンフレットに記載のオートタキシン阻害剤、国際公開第2014091446A1号パンフレットに記載のピリミド[4, 5-b]キノリン-4, 5(3h, 10h)-ジオン誘導体、国際公開第2013064450A1号パンフレットに記載のアミロライド誘導体、国際公開第2014177527A1号パンフレットに記載のピロロ[2, 3-d]ピリミジン誘導体、国際公開第2015173683A1号パンフレットに記載のピラゾロピリジン誘導体又はピラゾロピリミジン誘導体、国際公開第201326797A1号パンフレットに記載のビペリジノ-ジヒドロチエノピリミジンスルホキシド誘導体、国際公開第2016061161A1号パンフレットに記載の2-[1, 4]ピリジン-3-イル]-2, 3-ジヒドロ-ベンゾジオキシン誘導体、国際公開第201486705A1号パンフレットに記載のピリジン誘導体、国際公開第2011113894A1号パンフレットに記載のピリジン誘導体又はピラジン誘導体、国際公開第201627195A1号パンフレットに記載のアミノピリミジニル誘導体、国際公開第2015175796A1号パンフレットに記載のカルボキサミド誘導体、国際公開第2010125082A1号パンフレットに記載のオキサゾール置換インダゾール誘導体、国際公開第2014126979A1号パンフレットに記載のビスフェニルブタン酸誘導体、国際公開第201235158A1号パンフレットに記載のピラジン誘導体、国際公開第201472956A1号パンフレットに記載のオキサゾリジン-2-オン-ピリミジン誘導体、国際公開第201696721A1号パンフレットに記載のピラゾロピリジナミン誘導体、国際公開第2010101849A1号パンフレットに記載のN-(ヘテロ)アリール、2-(ヘテロ)アリール置換アセトアミド誘導体、国際公開第2017115205A1号パンフレットに記載の3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン誘導体、国際公開第201728927A1号パンフレットに記載のフェノキシアセトアミド誘導体、国際公開第20172221142A1号パンフレットに記載のN-(5-(4-アセチルピペラジン-

30

40

50

1-イル)ピリジン-2-イル)-2-(2'-フルオロ-3-メチル-2,4'-ビピリジン-5-イル)アセトアミド誘導体又は2-(2',3-ジメチル-2,4'-ビピリジン-5-イル)-N-(5-(ピラジン-2-イル)ピリジン-2-イル)アセトアミド誘導体、国際公開第2013171166A1号パンフレットに記載のキサンチン誘導体、国際公開第2013174768A1号パンフレットに記載のキサンチン誘導体、国際公開第2016150901A1号パンフレットに記載のヘテロシクリルメチル-チエノウラシル誘導体、国際公開第201637954A1号パンフレットに記載のn,2-ジアリールキノリン-4-カルボキサミド誘導体、国際公開第2012168350A1号パンフレットに記載のピリジン-2-アミド誘導体、国際公開第2005044817A1号パンフレットに記載の細胞接着のモジュレータとして作用するベンズアミド誘導体、国際公開第2012117000A1号パンフレットに記載の3-アミノ-ピリジン誘導体、国際公開第201267965A1号パンフレットに記載のNamp t又はrock阻害剤、国際公開第201616242A1号パンフレットに記載のオキセタン誘導体、国際公開第2018134695A1号パンフレットに記載の1,1,1-トリフルオロ-3-ヒドロキシプロパン-2-イルカルバメート誘導体、国際公開第2014135507A1号パンフレットに記載のピラゾール誘導体、国際公開第2009156462A1号パンフレットに記載のインドール誘導体、国際公開第201815088A1号パンフレットに記載の[1,2,3-トリアゾロ[4,5-d]ピリミジン誘導体、国際公開第2016177660A1号パンフレットに記載のsgc刺激薬、国際公開第201760879A1号パンフレットに記載のCFTRタンパク質、国際公開第2018109607A1号パンフレットに記載のベンズイミダゾールの6-カルボン酸又は4-アザ-、5-アザ-、7-アザ-若しくは4,7-ジアザ-ベンズイミダゾール、国際公開第201728926A1号パンフレットに記載のベンズアミド誘導体、国際公開第201287519A1号パンフレットに記載の8-アザビシクロ[3.2.1]オクタン誘導体、国際公開第201671375A1号パンフレットに記載のトリアゾロ[4,5-d]ピリミジン誘導体、国際公開第2015104354A1号パンフレットに記載のアリールスルタム誘導体、国際公開第201415905A1号パンフレットに記載の2-(アザインドール-2-イル)ベンズイミダゾール誘導体又は国際公開第2005104745A1号パンフレットに記載のキヌクリジン若しくはイソキヌクリジン誘導体である。好ましくは、この実施形態にかかる化合物は、線維症、創傷治癒、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、関節炎並びに／又は他の炎症性及び線維性疾患を治療するための医薬品である。

10

20

30

【0022】

国際公開第2013064508A1号パンフレット、同第2014097151A2号パンフレット、同第2014091446A1号パンフレット、同第2013064450A1号パンフレット、同第2014177527A1号パンフレット、同第2015173683A1号パンフレット、同第201326797A1号パンフレット、同第2016061161A1号パンフレット、同第201486705A1号パンフレット、同第2011113894A1号パンフレット、同第201627195A1号パンフレット、同第2015175796A1号パンフレット、同第2010125082A1号パンフレット、同第2014126979A1号パンフレット、同第201235158A1号パンフレット、同第201472956A1号パンフレット、同第201696721A1号パンフレット、同第2010101849A1号パンフレット、同第2017115205A1号パンフレット、同第201728927A1号パンフレット、同第20172221142A1号パンフレット、同第2013171166A1号パンフレット、同第2013174768A1号パンフレット、同第2016150901A1号パンフレット、同第201637954A1号パンフレット、同第2012168350A1号パンフレット、同第2005044817A1号パンフレット、同第2012117000A1号パンフレット、同第201267965A1号パンフレット、同第201616242A1号パンフレット、同第2018134695A1号パンフレット、同第20

40

50

1 4 1 3 5 5 0 7 A 1 号パンフレット、同第 2 0 0 9 1 5 6 4 6 2 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 8 1 5 0 8 8 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 6 1 7 7 6 6 0 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 7 6 0 8 7 9 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 8 1 0 9 6 0 7 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 7 2 8 9 2 6 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 2 8 7 5 1 9 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 6 7 1 3 7 5 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 5 1 0 4 3 5 4 A 1 号パンフレット、同第 2 0 1 4 1 5 9 0 5 A 1 号パンフレット及び同第 2 0 0 5 1 0 4 7 4 5 A 1 号パンフレットは、それらの全体が組み込まれ、それらに開示される全ての化合物は、本出願に関連して、抗体フラグメントに連結された部分構造であり得る。

【0023】

単ドメイン抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントは、機能的特徴及び／又は構造的特徴によって特徴付けられ得る。構造的特徴の例は、配列に関連し、機能的特徴の例は、前記抗体フラグメントの活性に関連する。活性は、特異的結合活性であり得る。活性は、特異的結合活性の非存在又は特異的結合活性の検出の非存在でもあり得る。

【0024】

抗体フラグメントの特異的結合は、例えば、バイオパニング、スキャチャード分析及び／又は競合結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素イムノアッセイ（EIA）（酵素結合免疫吸着アッセイ、ELISAとも呼ばれる）、サンドイッチ競合アッセイ、表面プラズモン共鳴（SPR）又はバイオレイヤー干渉法及び当技術分野で公知のそれらの様々な変形形態などを含む、それ自体公知である任意の好適な様式で決定することができる。これらのアッセイの各々を、支持体上又は溶液中に固定化され得るヒトFAP組換えタンパク質及び／又はマウスFAP組換えタンパク質を用いてインビトロで行うことができる。代わりに、いくつかの特定の状況下では、これらのアッセイのいくつかは、ヒト及び／又はマウスFAPを発現する細胞を用いてインビトロで行われ得る。そのような細胞は、ヒト及び／又はマウスFAPを内因的に発現又は過剰発現し得る。評価は、通常、培養培地若しくはPBS中又は好適な培地若しくは緩衝液中でインビトロにおいて行われる。好ましい細胞は、ヒト及び／又はマウスFAPを発現する線維芽細胞である。好ましい細胞株は、GM05389又はU-87 MGであり得る。代わりに、好ましい細胞は、ヒト及び／又はマウスFAPを発現するトランスフェクトされた細胞である。好ましいトランスフェクト細胞株は、HEK293であり得る。

【0025】

代わりに、抗体フラグメントの結合は、ヒト及び／又はマウスFAPを発現する動物においてインビボで評価され得る。そのような設定では、抗体フラグメントは、好ましくは、標識され、より好ましくは放射性標識され、イメージング技術が使用される。好ましいイメージング技術は、SPECT/CT、PET/CT、SPECT/MRI又はPET/MRIである。ヒト及び／又はマウスFAPを過剰発現する細胞も動物に異種移植され得る。ヒトFAPを発現する本発明のヒトFAPノックインマウスを使用することも可能である。

【0026】

したがって、本明細書で使用される「インビトロ」という表現は、ヒトFAP組換えタンパク質及び／又はマウスFAP組換えタンパク質が支持体若しくは溶液中に固定化されている場合には無細胞アッセイの状況において、又は培養中の細胞の状況において使用される。それとは対照的に、「インビボ」又は「エクスビボ」という用語は、本明細書では、非ヒト動物又はこの非ヒト動物の組織若しくは器官に関連して使用される。通常、「エクスビボ」とは、非ヒト又はヒト動物の組織又は器官に対して定量を行う場合に用いられ、「インビボ」は、非ヒト又はヒト動物に対してイメージング法による定量を行う場合に用いられる。通常、「結合」は、インビトロ条件を用いて評価され、インビボ条件を用いて更に確認される。

【0027】

本明細書に開示されるインビトロ、インビボ及びエクスビボアッセイでは、陰性対照を

使用することが好ましい。ヒト及び／又はマウス F A P に対する特異的結合を、本明細書で後に説明されるような他の抗原の存在下で評価することも可能である。実験の部では、本発明の抗体フラグメントの特異的結合を評価するためにいくつかのアッセイが使用されている：E L I S A 及びバイオレイヤー干渉法が使用されている実施例 4、切断された組織の S P E C T / C T イメージング及び／又はエキスピボガンマ計数を用いてヒト F A P ノックインマウスにおいて結合が評価されている実施例 5、並びに切断された組織の S P E C T / C T イメージング及び／又はエキスピボガンマ計数を用いて、ヒト F A P を過剰発現する細胞を含むマウスにおいて結合が評価されている実施例 6。

【0028】

本明細書で使用される場合、「親和性」、「特異的結合」、「結合」、「結合活性」又は「特異的結合活性」という用語は、単ドメイン抗体フラグメント、好ましくは V H H 又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントが、ヒト及び／又はマウス F A P に結合することで、ヒト及び／又はマウス F A P と抗体フラグメントとの平衡を、それらの結合によって形成される複合体の存在に向けてシフトさせる程度を指す。結合は、S P R 又はバイオレイヤー干渉法を用いて評価することができる。したがって、例えばヒト及び／又はマウス F A P と抗体フラグメントとが比較的等しい濃度で組み合わせられる場合、高親和性の抗体フラグメントは、高濃度の得られる複合体に向けて平衡をシフトさせるように、利用可能なヒト及び／又はマウス F A P に結合するであろう。平衡解離定数 (K_D) は、タンパク質結合ドメイン (抗体フラグメント) と抗原性標的 (ヒト及び／又はマウス F A P) との間の親和性を説明するために一般に使用される。典型的には、平衡解離定数は、 10^{-7} M 未満である。好ましくは、平衡解離定数は、 10^{-8} M 未満若しくは 10^{-9} M 未満又はより好ましくは 10^{-9} M ~ 10^{-12} M の範囲である。

【0029】

本明細書に開示されるような任意の抗体フラグメントは、好ましくは、ヒト及び／又はマウス F A P に、 10^{-9} ~ 10^{-12} モル / リットル又は 10^{-10} ~ 10^{-12} モル / リットルの範囲の平衡解離定数 (K_D) で (本明細書で定義されるように) 特異的に結合するようなものであり、好ましくはバイオレイヤー干渉法を用いて評価される。

【0030】

本明細書に開示される単ドメイン抗体フラグメント、好ましくは V H H 又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントの「特異性」は、親和性及び／又は結合活性に基づいて決定することができる。本明細書に開示されるような抗体フラグメントの「親和性」は、本明細書に開示されるような抗体フラグメントと、それが結合するヒト及び／又はマウス F A P との解離についての平衡定数によって表される。 K_D 値が低いほど、本明細書に開示される抗体フラグメントと、それが結合する目的の標的タンパク質との間の結合強度が強くなる。代わりに、親和性は、 $1 / K_D$ に対応する平衡会合定数 (K_A) で表すこともできる。本明細書に開示される抗体フラグメントの結合親和性は、目的の特定の標的タンパク質に応じて、当業者に公知の様式で決定することができる。本明細書に開示される抗体フラグメントの「結合活性」とは、本明細書に開示される抗体フラグメントと目的の好適な標的タンパク質との間の結合強度の尺度である。結合活性は、目的の標的タンパク質上の結合部位と、本明細書に開示される抗体フラグメント上の結合部位との間の親和性及び本明細書に開示される抗体フラグメント上に存在する好適な結合部位の数の両方に関連する。V H H などの本発明の好ましい抗体フラグメントは、1つのみの単ドメインを有し、したがって1つのみの結合部位を有する。そのような単ドメイン抗体フラグメントによって呈される親和性は、サブナノモル濃度範囲であり、したがって単一の結合部位の存在を考慮すると非常に例外的である。約 1 ミリモルを超える K_D 値は、一般に、非結合又は非特異的結合を示すと考えられる。 K_D は、 k_{off} 又は k_d (秒⁻¹ 又は秒⁻¹ で表される) として示される複合体の解離速度定数と、 k_{on} 又は k_a (モル⁻¹ 秒⁻¹ 又は M⁻¹ 秒⁻¹ で表される) として示されるその会合の速度定数との比としても表され得ることが当技術分野で一般的に知られている。特に、本明細書に開示される抗体フラグメントは、 $0.1 \sim 0.00001$ 秒⁻¹ の範囲若しくは $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 秒⁻¹ の範囲にわた

る k_{on} 及び／又は $1, 000 \sim 10, 000, 000 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ の範囲、若しくは $10^4 \sim 10^7 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ の範囲、若しくは $10^5 \sim 10^7 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ の範囲にわたる k_{off} で目的の標的タンパク質（すなわちヒト及び／又はマウス FAP）に結合する。結合親和性、 k_{off} 及び k_{on} 速度は、当業者に公知の手段、例えば ELISA 法、等温滴定熱量測定、SPR、バイオレイヤー干渉法、蛍光活性化細胞分取分析などによって決定することができる（実施例 4 を参照されたい）。

【0031】

好ましい実施形態では、本明細書に開示されるような抗体フラグメントは、ヒト及び／又はマウス FAP に、 $0.1 \sim 0.00001 \text{秒}^{-1}$ の範囲又は $10^{-2} \sim 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 若しくは $10^{-3} \sim 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ の範囲にわたる k_{off} で特異的に結合し、好ましくはバイオレイヤー干渉法を用いて評価される。

10

【0032】

好ましい実施形態では、本明細書に開示されるような抗体フラグメントは、好ましくはバイオレイヤー干渉法を用いて評価される、 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ モル／リットルの範囲にわたる K_D 及び／又は $10^{-2} \sim 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ の範囲にわたる k_{off} 、より好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-12}$ モル／リットルの範囲にわたる K_D 及び $10^{-2} \sim 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ の範囲にわたる k_{off} でヒト及び／又はマウス FAP に（本明細書で定義されるように）特異的に結合するようなものである。

【0033】

したがって、本明細書に開示されるような単ドメイン抗体フラグメント（好ましくは VHH 又はそのフラグメント）などの抗体フラグメントは、その抗体フラグメントがその標的（又はその少なくとも 1 つの部分若しくはフラグメント）に対する親和性、特異性を有し、且つ／又はその標的に対して特異的に向けられる場合、ヒト及び／又はマウス FAP に「特異的に結合する」と言われる。

20

【0034】

本明細書に開示されるような VHH などの抗体フラグメント又はそのフラグメントに関して、本明細書に開示されるような抗体フラグメントに存在する用語「結合領域」、「結合部位」又は「相互作用部位」は、ヒト及び／又はマウス FAP に対する結合又は特異的結合を担う、本明細書に開示されるような抗体フラグメントに存在するアミノ酸残基の特定の部位、部分、遺伝子座、ドメイン又はストレッチの意味を有するものとする。抗体フラグメント上に存在するこの結合領域は、パラトープと呼ばれる。そのような結合領域は、ヒト及び／又はマウス FAP と接触している抗体フラグメントの本明細書に開示されるようなアミノ酸配列に由来する特定のアミノ酸残基を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる。前記抗体フラグメントと接触しているヒト及び／又はマウス FAP の細胞外ドメインの領域又は一部のアミノ酸若しくは不連続なアミノ酸は、エピトープと呼ばれ得、本明細書で後に定義される。一実施形態では、本発明の抗体フラグメントのファミリーは、本明細書で後に定義されるエピトープ（第 2 の構造的特徴）を共有する。抗体フラグメントのこのファミリーは、インビトロ及びインビボの両方で魅力的な特性を呈する。インビトロ引力特性は、少なくともそれらの結合親和性及び結合速度論に関連し得るか、又は FAP 酵素活性を調節し得ない。インビボ引力特性は、前記抗体フラグメントが本発明の標識化合物中に存在する場合、それらの体内分布及び腫瘍ターゲティングに少なくとも関連し得る。

30

40

【0035】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」及び「特異的結合」という用語は、一般に、ポリペプチド、特に免疫グロブリン、例えば抗体又は抗体フラグメントなど、例えば単ドメイン抗体フラグメント、好ましくは VHH 又はそのフラグメントがヒト及び／又はマウス FAP などの特定の抗原に優先的に結合する能力を指す。そのような抗体フラグメントは、ヒト及び／又はマウス FAP に対して惹起される抗体フラグメントとしても同定され得る。

【0036】

50

ヒト及び／又はマウス F A P に対する結合は、異なる抗原の均一な混合物において評価され得る。特定の実施形態では、特異的結合相互作用は、試料中の望ましい抗原と望ましくない抗原とを、いくつかの実施形態では約 10 倍～100 倍又はそれを超えて（例えば、約 1000 倍超又は 10,000 を超えて）区別する。

【0037】

一実施形態では、結合は、ヒト及び／又はマウス F A P を発現する細胞を用いてインビトロで、任意選択的に本明細書で先に定義されたようにインビボ又はエクスピボで評価され得る。これらの細胞は、ヒト細胞であり得、内因性のヒト及び／又はマウス F A P を発現し得る。代わりに、これらの細胞は、ヒト及び／又はマウス F A P を過剰発現し得る。ヒト及び／又はマウス F A P を過剰発現する細胞は、ヒト細胞又は非ヒト細胞であり得る。好ましい細胞は、ヒト及び／又はマウス F A P を発現する線維芽細胞である。好ましいトランスフェクト細胞株は、H E K 2 9 3 である。F A P を発現する好ましい細胞株は、G M 0 5 3 8 9 又は U - 8 7 M G である。ヒト F A P を発現する好ましい癌細胞株は、U - 8 7 M G である。

10

【0038】

一実施形態では、単ドメイン抗体フラグメント、好ましくは V H H 又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントは、ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する。この評価は、好ましくは、E L I S A、表面プラズモン共鳴又はバイオレイヤー干渉法を用いて行われる。

【0039】

本発明の単ドメイン抗体フラグメント、好ましくは V H H 又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントは、ヒト及び／又はマウス F A P のいくつかの天然に存在する又は合成のアナログ、バリエーション、突然変異体、対立遺伝子、部分及びフラグメントに結合することも予想される。

20

【0040】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメント、好ましくは V H H 又はそのフラグメントは、抗体フラグメントが結合する（天然／野生型）抗原のエピトープを（依然として）含有する、ヒト及び／又はマウス F A P の少なくともそれらのアナログ、バリエーション、突然変異体、対立遺伝子、天然に存在する合成アナログ、部分及びフラグメントに特異的に結合するであろう。

30

【0041】

本発明の抗体フラグメントのヒト F A P のエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸 26 ～ 760 の範囲内に含まれる。

【0042】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントのエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸 65 ～ 90 及び／又は 101 ～ 140 内に含まれる。

【0043】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントのエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び／若しくは 101 ～ 140 を含む。

【0044】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントのエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び 101 ～ 140 の組合せを含む。

40

【0045】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントのエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び 101 ～ 140 の組合せ内に含まれる。

【0046】

一実施形態では、配列番号 26 の以下のアミノ酸：I 62、S 63、G 64、Q 65、E 66、I 76、V 77、L 78、Y 79、N 80、I 81、E 82、T 83、G 84、Q 85、S 86、Y 87、T 88、I 89、L 90、S 91、L 105、S 106、P 107、D 108、R 109、Q 110、F 111、D 134、L 135、S 136、N 1

50

37、V158、G159、R175、D457及びY458の少なくとも1つは、抗体フラグメントと結合するか、又は接触するか、又は相互作用する。

【0047】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D134、L135、S136、N137から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V158及び／又はG159、及び／又は

6) R175、及び／又は

7) D457及び／又はY458

に特異的に結合する。

【0048】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

4) D134、L135、S136、N137から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

5) V158及び／又はG159、及び

6) R175、及び

7) D457及び／又はY458

に特異的に結合する。

【0049】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D134、L135、S136、N137から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V158及びG159、及び／又は

6) R175、及び／又は

7) D457及びY458

に特異的に結合する。

【0050】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6 から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

2) I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1 から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

3) L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1 から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7 から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

5) V 1 5 8 及び G 1 5 9、及び

6) R 1 7 5、及び

7) D 4 5 7 及び Y 4 5 8

に特異的に結合する。

【0051】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V 1 5 8 及び G 1 5 9、及び／又は

6) R 1 7 5、及び

7) D 4 5 7 及び Y 4 5 8

に特異的に結合する。

【0052】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び

2) I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び

3) L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7 から選択される少なくとも3つのアミノ酸、及び

5) V 1 5 8 及び G 1 5 9、及び

6) R 1 7 5、及び

7) D 4 5 7 及び Y 4 5 8

に特異的に結合する。

【0053】

一実施形態では、配列番号26の以下のアミノ酸：I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6、I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1、L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1、D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7、V 1 5 8、G 1 5 9、R 1 7 5、D 4 5 7 及び Y 4 5 8 は、抗体フラグメントと結合するか、又は接触するか、又は相互作用する。これに関連して、F A P のヒトのアミノ

10

20

30

40

50

酸は、前記アミノ酸が抗体フラグメントのエピトープに属する場合、本発明の抗体フラグメントによって結合され得る。

【0054】

本明細書に開示される単ドメイン抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントは、本明細書に開示される抗体フラグメントが第2の分子に結合する親和性よりも少なくとも5倍、例えば少なくとも10倍、例えば少なくとも100倍、好ましくは少なくとも1000倍高い親和性で第1の目的の標的抗原に結合する場合、第2の分子、例えばFAPの最近接ホモログの1つ（すなわちDPP IV、ジペプチジルアミノペプチダーゼIV、Juillerat-Jeanneret, L.ら（2017年）、「Expert Opinion on therapeutic targets」、第21巻：第977～991頁）などとは対照的に、目的の第1の標的抗原（すなわちヒト及び／又はマウスFAP）に「特異的」とであると言われる。DPP IVのアミノ酸配列は、FAPのアミノ酸配列と52%の同一性を有し（実施例4bを参照されたい）、それでもなお、本発明の抗体フラグメントは、2つの関連するプロリン特異的セリンプロテアーゼを区別することができる。したがって、特定の実施形態では、本明細書に開示されるような抗体フラグメントが、第2の分子とは対照的に、目的の第1の標的抗原に「特異的」とであると言われる場合、これは、目的の第1の標的抗原に（本明細書で定義されるように）特異的に結合し得るが、第2の分子に結合し得ない。本発明に関連して、抗体フラグメントは、ヒト及び／又はマウスFAPのエピトープに特異的に結合し、いずれもDPP IVには特異的に結合しない。これは、実施例4bで実証されている。

10

20

【0055】

本明細書で互換的に使用される「競合」、「クロスブロッキング」、「交差結合」及び「交差阻害」という用語は、一般に、好適なインビトロ又はインビボアッセイを用いて測定した場合、本明細書に開示される他の抗体、又は他の単ドメイン抗体フラグメント、又は他の分子のヒト及び／又はマウスFAPへの結合を妨害することができる、本明細書に開示されるVHHなどの抗体フラグメントを指す。ヒト及び／又はマウスFAPに対するインビトロ結合を試験するために使用される好ましい細胞は、ヒト及び／又はマウスFAPを発現する細胞である。好ましい細胞株は、本明細書で先に定義したGM05389、U-87MG又はトランスフェクトHEK293であり得る。いくつかの細胞を実験の部で使用した（実施例4cを参照されたい）。したがって、より具体的には、本明細書に開示されるような抗体フラグメントを用いる「競合」、「クロスブロッキング」、「交差結合」及び「交差阻害」は、本明細書に開示されるような別の抗体若しくは単ドメイン抗体フラグメントとヒトFAP及び／若しくはマウスFAPとの結合を妨害するか又はそれらと競合し、これにより、その結合を、本明細書に開示されるような「クロスブロッキング」単ドメイン抗体フラグメントを用いない、本明細書に開示されるような他の単ドメイン抗体フラグメントのヒト及び／又はマウスFAPとの結合と比較して、好適なインビトロ、細胞又はインビボアッセイを用いて測定される場合、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、例えば少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又はそれを超えて低下させることを意味し得る。一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、FAPのリガンドと、そのリガンドへの結合について競合しない。結果として、本発明の抗体フラグメントは、この受容体の天然の機能を妨害しないことも予想される。これは、一実施形態では、本発明の抗体フラグメントがヒト及び／又はマウスFAPの天然リガンドと競合せず、したがってインビトロ又はインビボ若しくはエクスピボ環境においてヒトFAP発現細胞及び／又はマウスFAP発現細胞への結合が阻害されないことを意味する。実験の部で具体的に例示される全ての抗体フラグメントは、本発明の抗体フラグメントがそのリガンドに結合している場合、実質的なFAP活性が依然として検出可能であるため、ヒト及び／又はマウスFAPの天然のリガンドと実質的に競合しない（実施例4dを参照されたい）。FAP活性は、好ましくは、これに関連して、FAPジペプチジルペプチダーゼ活性又は

30

40

50

ゼラチナーゼ活性である。本発明に関連して、「実質的」とは、抗体フラグメントが存在しない場合の同じFAP活性と比較して、FAP活性の少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は100%が依然として検出可能であることを意味し得る。したがって、一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、FAP活性を実質的に変化させず、これは、好ましくは、FAP活性を実質的に阻害しないことを意味する。本発明に関連して、FAP活性は、エキソペプチダーゼ活性及び／又はエンドペプチダーゼ活性であり得る。このエキソペプチダーゼ活性は、FAPジペプチジルペプチダーゼ活性であり得る。一実施形態では、抗体フラグメントは、FAPジペプチジルペプチダーゼ活性を実質的に阻害しない。このエンドペプチダーゼ活性は、ゼラチナーゼ及び／又はコラゲナーゼ活性であり得る。一実施形態では、抗体フラグメントは、FAPのFAPゼラチナーゼ活性及び／又はコラゲナーゼ活性を実質的に阻害しない。したがって、一実施形態では、抗体フラグメントは、ヒト及び／又はマウスFAPのモジュレータではない。一実施形態では、抗体フラグメントは、阻害剤ではなく、またヒト及び／又はマウスFAPの活性化剤ではない。FAP活性のいずれかは、Juillerat-Jeanneret L.ら(2017年)、「Expert Opinion on Therapeutic Targets」(<http://dx.doi.org/10.1080/14728222.2017.1370455>)に例示されるように評価され得る。FAPジペプチジルペプチダーゼ活性は、実施例4dで使用される技術など、当業者に知られている技術を用いて評価され得る。手短に言えば、ヒトFAP酵素活性は、蛍光発生基質であるベンジルオキシカルボニル-Gly-Pro-7-アミド-4-メチルクマリン(Z-Gly-Pro-AMC; Bachem)を用いて測定され得る。ヒトFAP組換えタンパク質(実施例4a)を、1µMのHA-His₆タグ付けVHHの非存在下又は存在下、黒色の96ウェル平底プレートにおいてアッセイ緩衝液(50mM Tris-HCl、1M NaCl、0.1% BSA、pH 7.5)で200ng/mLに希釈し得る。阻害剤対照として、抗体フラグメントの代わりに1µMのメシル酸タラボスタット(Apex Bio)を加えた。結合平衡に達するまで1時間インキュベートした後、Z-Gly-Pro-AMC基質を50µMの最終濃度で添加した。蛍光マイクロプレートリーダー(BioTek)を用いて、380nmで励起し、460nmで発光検出して、基質のZ-Gly-Pro及び7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)への酵素的変換を追跡した。蛍光を1分毎に1時間測定した。曲線の傾きは酵素活性の速度に対応する(例として図4を参照されたい)。阻害剤対照も使用することができる。好適な阻害剤は、タラボスタットメタンシン(Apex Bio)である。

【0056】

本明細書に開示されるVHH又はその機能的フラグメントなどの抗体フラグメントは、目的とする2つの異なる標的タンパク質の両方に(本明細書で定義されるように)特異的である場合、目的とするこれらの異なる標的タンパク質を示す「交差反応性」とであると言われる。一実施形態では、目的とする2つの異なる標的タンパク質は、ヒトFAP及びマウスFAPであり得る。

【0057】

以下では、本発明者らは、本発明の抗体フラグメントのいくつかの構造的特徴(すなわち第1、第2、第3、第4の構造的特徴)について記載する。本発明の抗体フラグメントは、これら4つの構造的特徴の少なくとも1つ又は全ての存在を特徴とし得る：

- 第3及び第4の構造的特徴、
- 第1及び第2の構造的特徴、
- 第1、第2及び第3の構造的特徴
- 第3及び第4の構造的特徴、
- 第3の構造的特徴、
- 第4の構造的特徴、
- 第1、第3及び第4の構造的特徴、

- － 第 2、第 3 及び第 4 の構造的特徴、
- － 第 1 及び第 3 の構造的特徴、
- － 第 1 及び第 4 の構造的特徴、
- － 第 2 及び第 3 の構造的特徴、
- － 第 2 及び第 4 の構造的特徴
- － 第 1、第 2、第 3 及び第 4 の構造的特徴。

【0058】

抗体フラグメントの第 1 の構造的特徴：FAP の接触領域に基づく

第 1 の構造的特徴とは、本発明の抗体フラグメントが、配列番号 26 のアミノ酸 26 ～ 760 の範囲内に含まれるヒト FAP の領域に接触するか、又は結合するか、又は特異的に結合するか、又は相互作用することである。本発明の抗体フラグメントによって特異的に結合又は標的される配列番号 26 のアミノ酸 26 ～ 760 内の領域は、前記一次アミノ酸配列内の線状領域（すなわち線状エピトープ又は連続エピトープ）であり得る。代わりに、前記領域は、線状でなくともよく、構造的エピトープに対応し得る。通常、線状エピトープは、5 ～ 30 アミノ酸長を有するアミノ酸の線状配列を含み、すなわち、これは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 アミノ酸長を有し得る。通常、構造的エピトープは、タンパク質の三次元三次構造において一緒になり、抗体フラグメントと接触する、配列番号 26 のアミノ酸 26 ～ 760 内のいくつかの非連続アミノ酸を特徴とする。

【0059】

抗体フラグメントの第 2 の構造的特徴に関する以下の段落では、抗体フラグメントの線状エピトープ及び構造的エピトープが定義される。

【0060】

抗体フラグメントの第 2 の構造的特徴：抗体フラグメントのエピトープに基づく

ヒト及び／又はマウス FAP のエピトープに特異的に結合する本発明の抗体フラグメントは、代替的に又は上記に定義された第 1 の構造的特徴と組み合わせて、以下に定義される第 2 の構造的特徴によっても更に定義され得る。

【0061】

第 2 の構造的特徴は、本発明の抗体フラグメントが配列番号 26 のアミノ酸 26 ～ 760 内のいくつかのアミノ酸に接触するか、又は結合するか、又は特異的に結合することである。配列番号 26 のアミノ酸 26 ～ 760 内のこれらの特定のアミノ酸は、以下で更に定義される。

【0062】

この第 2 の構造的特徴の第 1 の実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号 26 の 65 ～ 90 及び／又は 101 ～ 140 内に含まれるアミノ酸の少なくとも 1 つに接触するか、又は結合するか、又は特異的に結合する。したがって、同定された 66 アミノ酸からの 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65 又は 66 アミノ酸の各組合せは、本発明の抗体フラグメントが接触するために包含される。

【0063】

この第 2 の構造的特徴の第 2 の実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号 26 のアミノ酸 I 62、S 63、G 64、Q 65、E 66、I 76、V 77、L 78、Y 79、N 80、I 81、E 82、T 83、G 84、Q 85、S 86、Y 87、T 88、I 89、L 90、S 91、L 105、S 106、P 107、D 108、R 109、Q 110、F 111、D 134、L 135、S 136、N 137、V 158、G 159、R 175、D 457 及び Y 458 の少なくとも 1 つと接触するか、又はそれらに結合するか、又は

それらに特異的に結合する。したがって、同定された37アミノ酸からの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36又は37アミノ酸の各組合せは、本発明の抗体フラグメントが接触するために包含される。

【0064】

この第2の構造的特徴の第3の実施形態では、配列番号1のアミノ酸65～90のストレッチは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合するhFAPの第1の領域を定義する。このストレッチ又は領域内の各アミノ酸は、抗体フラグメントと接触していなくてもよい、結合していなくてもよい又は特異的に結合していなくてもよい。一実施形態では、このストレッチ又は領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20アミノ酸は、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。一実施形態では、この第1のストレッチ又は領域は、抗体フラグメントのエピトープである。一実施形態では、抗体フラグメントのエピトープは、この第1のストレッチ又は領域内に含まれる。

10

【0065】

好ましくは、この最初のストレッチ内において、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90の少なくとも1つは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

20

【0066】

より好ましくは、この最初のストレッチ内において、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90の少なくとも2つは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

【0067】

更により好ましくは、この最初のストレッチ内において、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89及びL90の少なくとも3つは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

30

【0068】

更により好ましくは、好ましくはこの最初のストレッチ内において、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90の全ては、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

【0069】

最も好ましくは、この最初のストレッチ内において、Q65、E66、I76、V77、L78、N80、I81、E82、T83、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90の全ては、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

【0070】

この第2の構造的特徴の第4の実施形態では、配列番号26のアミノ酸101～140のストレッチは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合するhFAPの第2の領域を定義する。このストレッチ又は領域内の各アミノ酸は、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する必要はない。一実施形態では、このストレッチ又は領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸は、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。一実施形態では、この第2のストレッチ又は領域は、抗体フラグメントのエピトープである。一実施形態では、抗体フラグメントのエピトープは、この第2のストレッチ又は領域内に含まれる。

40

50

【0071】

好ましくは、この第2のストレッチ内において、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137の少なくとも1つは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

【0072】

より好ましくは、この第2のストレッチ内において、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137の少なくとも2つは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

【0073】

更により好ましくは、この第2のストレッチ内において、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137の少なくとも3つは、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

10

【0074】

最も好ましくは、この第2のストレッチ内において、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137の全ては、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。

【0075】

この第2の構造的特徴の第5の実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26のI62、S63、G64、S91、V158、G159、R175、D457及び／又はY458などの追加のアミノ酸と更に接触する。

20

【0076】

この第2の構造的特徴の第6の実施形態では、上で定義された第1のストレッチ及び第2の伸長又は領域の各々は、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。一実施形態では、これらの2つのストレッチの組合せは、抗体フラグメントの構造的エピトープを定義する。一実施形態では、構造的エピトープは、これらの2つのストレッチの組合せ内に含まれる。これらのストレッチ又は領域の各々の中の各アミノ酸は、抗体フラグメントと接触していなくてもよいが、結合していなくてもよいが又は特異的に結合していなくてもよい。一実施形態では、ストレッチ又は領域の各々の1、2、3、4、5又は6アミノ酸（又は各ストレッチの長さに応じてそれを超える）は、抗体フラグメントと接触するか、結合するか又は特異的に結合する。一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26のI62、S63、G64、S91、V158、G159、R175、D457及び／又はY458などの追加のアミノ酸と更に接触する。

30

【0077】

一実施形態では、ヒトFAPのエピトープに特異的に結合する抗体フラグメントが提供され、ここで、エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／若しくは101～140内に含まれる。任意選択的に、抗体フラグメントは、配列番号26のI62、S63、G64、S91、V158、G159、R175、D457及び／又はY458などの追加のアミノ酸と更に接触する。

【0078】

一実施形態では、ヒトFAPのエピトープに特異的に結合する抗体フラグメントが提供され、ここで、エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び101～140の組合せ内に含まれる。任意選択的に、抗体フラグメントは、配列番号26のI62、S63、G64、S91、V158、G159、R175、D457及び／又はY458などの追加のアミノ酸と更に接触する。

40

【0079】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q

50

85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D134、L135、S136、N137から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V158及び／又はG159、及び／又は

6) R175、及び／又は

7) D457及び／又はY458

と接触するか、又はそれらに結合するか、又はそれらに特異的に結合する。

【0080】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

4) D134、L135、S136、N137から選択される少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

5) V158及び／又はG159、及び

6) R175、及び

7) D457及び／又はY458

と接触するか、又はそれらに結合するか、又はそれらに特異的に結合する。

【0081】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

4) D134、L135、S136、N137から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び／又は

5) V158及びG159、及び／又は

6) R175、及び／又は

7) D457及びY458

と接触するか、又はそれらに結合するか、又はそれらに特異的に結合する。

【0082】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号26の以下のアミノ酸：

1) I62、S63、G64、Q65、E66から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

2) I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

3) L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111から選択される少なくとも2つ又は少なくとも3つのアミノ酸、及び

10

20

30

40

50

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7 から選択される少なくとも 2 つ又は少なくとも 3 つのアミノ酸、及び

5) V 1 5 8 及び G 1 5 9、及び

6) R 1 7 5、及び

7) D 4 5 7 及び Y 4 5 8

と接触するか、又はそれらに結合するか、又はそれらに特異的に結合する。

【0083】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号 26 の以下のアミノ酸：

1) I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

2) I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

3) L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び／又は

5) V 1 5 8 及び G 1 5 9、及び／又は

6) R 1 7 5、及び／又は

7) D 4 5 7 及び Y 4 5 8

と接触するか、又はそれらに結合するか、又はそれらに特異的に結合する。

【0084】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号 26 の以下のアミノ酸：

1) I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び

2) I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び

3) L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び

4) D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7 から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸、及び

5) V 1 5 8 及び G 1 5 9、及び

6) R 1 7 5、及び

7) D 4 5 7 及び Y 4 5 8

と接触するか、又はそれらに結合するか、又はそれらに特異的に結合する。

【0085】

一実施形態では、配列番号 26 の以下のアミノ酸：I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6、I 7 6、V 7 7、L 7 8、Y 7 9、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、G 8 4、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1、L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1、D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7、V 1 5 8、G 1 5 9、R 1 7 5、D 4 5 7 及び Y 4 5 8 は、抗体フラグメントと結合するか、又は接触するか、又は相互作用する。

【0086】

一実施形態では、配列番号 26 の以下のアミノ酸：I 6 2、S 6 3、G 6 4、Q 6 5、E 6 6、I 7 6、V 7 7、L 7 8、N 8 0、I 8 1、E 8 2、T 8 3、Q 8 5、S 8 6、Y 8 7、T 8 8、I 8 9、L 9 0、S 9 1、L 1 0 5、S 1 0 6、P 1 0 7、D 1 0 8、R 1 0 9、Q 1 1 0、F 1 1 1、D 1 3 4、L 1 3 5、S 1 3 6、N 1 3 7、V 1 5 8、G 1 5 9、R 1 7 5、D 4 5 7 及び Y 4 5 8 は、抗体フラグメントと結合するか、又は接触するか、又は相互作用する。

【0087】

抗体フラグメントの第3の構造的特徴：全長配列に基づく

第3の構造的特徴とは、本発明の抗体フラグメントが、本発明の抗体フラグメントのファミリーを定義する方法を表す全長アミノ酸配列に関することである。本発明は、配列番号4又はその一部を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表される、構造的に密接に関連する抗体フラグメントのファミリーを開示する。抗体フラグメントB1は、配列番号4によって表される（以下の表2を参照されたい）。

【0088】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、上記で定義されるその第1の構造的特徴及び以下で更に定義されるその第3の構造的特徴によって定義され得る。

10

【0089】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、上記で定義されるその第2の構造的特徴及び以下で更に定義されるその第3の構造的特徴によって定義され得る。

【0090】

この第3の構造的特徴の第1の実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号4又はその一部と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表される。一実施形態では、この配列との配列同一性は、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。

20

【0091】

この第3の構造的特徴の一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号4又はその一部と少なくとも81%の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表される。一実施形態では、この配列との配列類似性は、少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。

【0092】

この第3の構造的特徴の第2の実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号4又はその一部と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表され、且つ配列番号4の正確な長さ又は配列番号4の正確な長さよりも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60アミノ酸だけ長い範囲にわたる長さを有する。

30

【0093】

この第3の構造的特徴の一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号4又はその一部と少なくとも81%の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表され、且つ配列番号4の正確な長さ又は配列番号4の正確な長さよりも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60アミノ酸だけ長い範囲にわたる長さを有する。

40

【0094】

例えば、Hisタグなどのタグを本発明の抗体フラグメントに付加することができる。通常、Hisタグは、4、5、6、7、8、9、10個のヒスチジンを含む。代替的なタグは、ヘマグルチニンタグ（HAタグ）：YPYDVPDYA（配列番号53）；YPYDVPDYG（配列番号54）又はシステインタグ（Cysタグ）であり得る。システインタグは、1つ又はいくつかのシステインを含むタグである。システインタグの非限定的な例は、C；GGC；SPSTPTPTSPSTPTPC（配列番号55）である。

【0095】

同一性及び類似性が評価される方法は、説明の最後の定義の目的のための部分で詳細に説明される。通常、同一性が配列番号の参照によって定義される場合、前記同一性は配列

50

番号全体にわたって評価される。しかしながら、同一性（又は類似性）が前記配列の一部（又はフラグメント）にわたって評価されることも本発明に包含される。これに関連して、部分とは、配列番号の長さの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%を意味し得る。包含される配列の長さは、同一性（又は類似性）を評価するために使用される配列番号の長さよりも依然として長くてよい（すなわち同一性（若しくは類似性）がこの配列番号の一部にわたって評価されたとしても配列番号のものと同じである、配列番号の長さの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%である長さ、又は配列番号の正確な長さよりも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60アミノ酸だけ長い長さ。

【0096】

この第3の構造的特徴の第3の実施形態では、抗体フラグメントの長さは、110～130アミノ酸又は110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129若しくは130アミノ酸である。この長さは、抗体フラグメントの配列に付加され得るHisタグなどのタグの長さを含まない。

【0097】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号4の正確な長さ又は配列番号4の正確な長さよりも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60アミノ酸だけ長い範囲にわたる長さを有する。

【0098】

一実施形態では、抗体フラグメントは、110～130アミノ酸又は110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129若しくは130アミノ酸の範囲にわたる長さを有し、且つ配列番号1、配列番号2及び配列番号3を含む。

【0099】

この第3の構造的特徴の第4の実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号4又はその一部の少なくとも1つと少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表され、抗体フラグメントの長さは、80～150アミノ酸又は90～140、若しくは100～130、若しくは105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129若しくは130アミノ酸である。一実施形態では、これらの配列の少なくとも1つとの配列同一性は、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。

【0100】

この第3の構造的特徴の一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号4又はその一部の少なくとも1つと少なくとも81%の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表され、抗体フラグメントの長さは、80～150アミノ酸又は90～140、若しくは100～130、若しくは105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129若しくは130アミノ酸である。一実施形態では、これらの配列の少なくとも1つとの配列類似性は、少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。

【0101】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、本明細書で前に定義された配列番号26のアミノ酸のストレッチ又は領域（すなわち配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／若しくは101～140）の少なくとも一方（好ましくは両方）に接

10

20

30

40

50

触するか、結合するか又は特異的に結合する。一実施形態では、前記抗体フラグメントのエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸のこれらのストレッチ又は領域内に含まれる。

【0102】

更に、一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、構造的エピトープについて、本明細書で前に定義された配列番号 26 のアミノ酸のストレッチ又は領域の組合せ（すなわち配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65～90 及び／若しくは 101～140）を有する。一実施形態では、前記抗体フラグメントの構造的エピトープは、配列番号 26 のアミノ酸のこれらのストレッチ又は領域内に含まれる。

【0103】

これらのエピトープは、抗体フラグメントのファミリーを定義する。抗体フラグメントのこのファミリーは、これらのエピトープ、線状エピトープ及び／又はこの構造的エピトープの少なくとも 1 つを共有する。

【0104】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、

－ 配列番号 4 又はその一部（第 3 の構造的特徴）と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表され、

－ これは、エピトープについて、配列番号 26（第 2 の構造的特徴）の 65～90 及び／又は 101～140 内に含まれるアミノ酸ストレッチ又は領域を有する。

【0105】

一実施形態では、この配列との配列同一性（又は類似性）は、少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % である。

【0106】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号 4 の正確な長さ又は配列番号 4 の正確な長さよりも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 アミノ酸だけ長い範囲にわたる長さを有する。

【0107】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、

－ 配列番号 4 又はその一部（第 3 の構造的特徴）と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表され、

－ 配列番号 26 のアミノ酸 I 62、S 63、G 64、Q 65、E 66、I 76、V 77、L 78、Y 79、N 80、I 81、E 82、T 83、G 84、Q 85、S 86、Y 87、T 88、I 89、L 90、S 91、L 105、S 106、P 107、D 108、R 109、Q 110、F 111、D 134、L 135、S 136、N 137、V 158、G 159、R 175、D 457 及び／又は Y 458 の少なくとも 1 つに接触するか、又は結合するか、又はそれらに特異的に結合する。（第 2 の構造的特徴）。

【0108】

一実施形態では、この配列との配列同一性（又は類似性）は、少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % である。

【0109】

一実施形態では、抗体フラグメントは、配列番号 4 の正確な長さ又は配列番号 4 の正確な長さよりも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 アミノ酸だけ長い範囲にわたる長さを有する。

【0110】

第 2 の構造的特徴の他の実施形態の各々は、第 3 の構造的特徴の各実施形態と組み合わ

10

20

30

40

50

され得る。

【0111】

第4の構造的特徴：CDR／CDR移植

第4の構造的特徴において、本発明の抗体フラグメント、好ましくは本明細書に開示されるVHHは、配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域と、配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域と、配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域とを含む群から選択されるCDR配列の少なくとも1つの組合せを含むアミノ酸配列によって表される。前記CDR1、CDR2及び／又はCDR3の1つ又は2つのアミノ酸は、得られた抗体フラグメントの活性を実質的に変化させることなく、別の1つのアミノ酸で置換され得る。抗体フラグメントのいずれのフレームワーク領域についても同様である。これらの抗体フラグメントバリエーションの各々も本発明に包含される。前記抗体フラグメントバリエーションの活性は、本明細書で先に定義した特異的結合活性である。本発明に関連して、「実質的」とは、初期CDR及び／又はFR領域を有する抗体フラグメントの活性と比較して、前記結合活性の少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は100%が依然として検出可能であることを意味し得る。

10

【0112】

したがって、特定の実施形態では、本発明は、（一般的な）構造を有するか、又はそれに由来する重鎖抗体を含む重鎖可変ドメインを提供する：

20

FR1－CDR1－FR2－CDR2－FR3－CDR3－FR4

（式中、FR1～FR4は、それぞれフレームワーク領域1～フレームワーク領域4を指し、CDR1～CDR3は、それぞれ相補性決定領域1～3を指し、これらは、本明細書で更に定義される通りである（ヒト及び／又はマウスFAPに対して惹起された重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を列挙する表2を参照されたい））。

【0113】

【表2】

表2: 抗体フラグメントB1のCDR及びFR(本発明の一般的な定義に特化した説明の一般部分において、本明細書の後に定義されるIMGT命名法を使用)

30

	アミノ酸配列
B1(配列番号4)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMAWYRQVPGKRREL VAGITGGGETNYADFGGRFTISRDNAGNGLYLQLNGLKPEDTAAYYC NFWPPLINYWGQGTQVTVSS
B1のCDR	
CDR1(配列番号1)	GRLSSSNS
CDR2(配列番号2)	ITGGGET
CDR3(配列番号3)	NFWPPLINY
B1のFR	
FR1(配列番号37)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS
FR2(配列番号38)	MAWYRQVPGKRRELVAG
FR3(配列番号39)	NYADFGGRFTISRDNAGNGLYLQLNGLKPEDTAAYYC
FR4(配列番号40)	WGQGTQVTVSS

40

【0114】

本発明は、本明細書に開示される抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグ

50

メント（又はそれらを発現するためのヌクレオチド配列）の起源に関して限定されず、抗体フラグメント、好ましくはV H H若しくはそのフラグメント又は本明細書に開示されるヌクレオチド配列が生成又は取得される（又は取得されている）方法に関しても限定されないことに留意されたい。したがって、本明細書に開示される抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントは、天然に存在するアミノ酸配列（任意の好適な種由来）又は合成若しくは半合成アミノ酸配列であり得る。抗体フラグメントを単離するための方法及び抗体フラグメントを生成するための方法並びに抗体フラグメント、これらの核酸分子を含む構築物及びこれらの構築物を含む細胞をコードする核酸分子は、説明の最後において定義部分で詳細に開示されている。

【0115】

本発明の具体的であるが、非限定的な態様では、抗体フラグメントのアミノ酸配列は、天然に存在する免疫グロブリン配列（任意の好適な種由来）又は合成若しくは半合成免疫グロブリン配列であり、「ヒト化」免疫グロブリン配列（例えば、部分的又は完全にヒト化されたマウス又はウサギ免疫グロブリン配列、特に部分的又は完全にヒト化されたV H H配列）、「ラクダ化」免疫グロブリン配列並びに（例えば、合成、ランダム又は天然に存在する免疫グロブリン配列から出発する）親和性成熟、C D R移植、ベニア化、異なる免疫グロブリン配列に由来するフラグメントの組合せ、重複プライマを用いたP C Rアセンブリ及び当業者に周知の免疫グロブリン配列を操作するための同様の技術などの技術によって得られた免疫グロブリン配列；又は前述のいずれかの任意の好適な組合せを含むが、これらに限定されない。本明細書に開示されるような抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントはまた、本発明の1つ以上の更なる（部分的又は完全な）ヒト化アミノ酸配列を提供するために、本明細書に更に記載されるように好適にヒト化され得る。

【0116】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、C D R移植を用いる上記の抗体フラグメントに由来する。

【0117】

好ましい抗体フラグメントは、以下を含む：

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 1領域、配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 2領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 3領域。F R領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、F R領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 1領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 3領域。F R領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、F R領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。C D R 2領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

－ 配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 2領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 3領域。F R領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、F R領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。C D R 1領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 1領域及び配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 2領域。F R領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、F R領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。C D R 3領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 1領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来のC D R 2及びC D R 3領域を含み、且つ表2で同定されるF Rを有し得る。代わりに、F R領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

。

－ 配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるC D R 2領域であ

り、これは、別の抗体フラグメント由来の C D R 1 及び C D R 3 領域を含み、且つ表 2 で同定される F R を有し得る。代わりに、F R 領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

ー 配列番号 3 を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる C D R 3 領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来の C D R 1 及び C D R 2 領域を含み、且つ表 2 で同定される F R を有し得る。代わりに、F R 領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

【 0 1 1 8 】

同様に、アミノ酸配列が合成又は半合成配列（部分的にヒト化された配列など）を含む場合、前記配列は、本明細書に開示される 1 つ以上の更なる（部分的又は完全に）ヒト化アミノ酸配列を提供するように、本明細書に再度記載される通りに任意選択的に更に好適にヒト化され得る。説明の最後に、「アゴニスト」、「アンタゴニスト」、「抗体フラグメントのバリエーション」、「抗体フラグメントの翻訳後構造特性評価」のより詳細な定義を提供する。

【 0 1 1 9 】

特に、ヒト化抗体フラグメント、好ましくは V H H は、ヒト化置換であり、且つ／又はヒト化置換に対応する、少なくとも 1 つのアミノ酸残基（特に少なくとも 1 つのフレームワーク残基における）が存在するアミノ酸配列によって表され得る。加えて又は代替的に、天然に存在する V H H 配列のフレームワーク領域の配列を、1 つ以上の密接に関連するヒト V H 配列の対応するフレームワーク配列と比較することにより、他の潜在的に有用なヒト化置換を確認することができ、その後、このように決定された潜在的に有用なヒト化置換の 1 つ以上（又はそれらの組合せ）を（本明細書で更に説明するようにそれ自体公知の任意の様式で）前記 V H H 配列に導入することができ、得られたヒト化 V H H 配列又はその機能的フラグメントは、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さ及びレベル並びに／又は他の所望の特性について試験することができる。このようにして、限られた程度の試行錯誤により、他の好適なヒト化置換（又はそれらの好適な組合せ）を当業者によって決定することができる。

【 0 1 2 0 】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、上記で定義されるその第 1 の構造的特徴及び本明細書で更に定義されるその第 4 の構造的特徴によって定義され得る。

【 0 1 2 1 】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、上記で定義されるその第 2 の構造的特徴及び本明細書で更に定義されるその第 4 の構造的特徴によって定義され得る。

【 0 1 2 2 】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、上記で定義されるその第 2 の構造的特徴並びに本明細書で更に定義されるその第 3 の構造的特徴及びその第 4 の構造的特徴によって定義され得る。

【 0 1 2 3 】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、本明細書で前に定義された配列番号 26 のアミノ酸のストレッチ又は領域（すなわち配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び／若しくは 101 ～ 140）の少なくとも一方（好ましくは両方）に接触するか、結合するか又は特異的に結合する。一実施形態では、前記抗体フラグメントのエピトープは、配列番号 26 のアミノ酸のこれらのストレッチ又は領域内に含まれる。

【 0 1 2 4 】

更に、本発明の抗体フラグメントは、構造的エピトープについて、本明細書で前に定義された配列番号 26 のアミノ酸のストレッチ又は領域の組合せ（すなわち配列番号 26 のアミノ酸ストレッチ又は領域 65 ～ 90 及び／若しくは 101 ～ 140）を有する。一実施形態では、前記抗体フラグメントの構造的エピトープは、配列番号 26 のアミノ酸のこれらのストレッチ又は領域の組合せ内に含まれる。

【 0 1 2 5 】

これらのエピトープは、抗体フラグメントのファミリーを定義する。抗体フラグメントのこのファミリーは、これらのエピトープ、線状エピトープ及び／又はこの構造的エピトープの少なくとも1つを共有する。

【0126】

好ましい抗体フラグメントは、以下を含む：

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域、配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域。FR領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

10

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域。FR領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。CDR2領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

－ 配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域。FR領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。CDR1領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域及び配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域。FR領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。CDR3領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

20

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来のCDR2及びCDR3領域を含み、且つ表2で同定されるFRを有し得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

－ 配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来のCDR1及びCDR3領域を含み、且つ表2で同定されるFRを有し得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

30

－ 配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来のCDR1及びCDR2領域を含み、且つ表2で同定されるFRを有し得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメント（第4の構造的特徴）に由来し得る。

また、好ましい抗体フラグメントは、

－ 配列番号26の65～90及び／又は101～140内に含まれるアミノ酸ストレッチ又は領域内に含まれるエピトープを有する（第2の構造的特徴）。

【0127】

好ましい抗体フラグメントは、以下を含む：

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域、配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域。FR領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

40

－ 配列番号1を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域。FR領域は、表2で同定される通りであり得る。代わりに、FR領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。CDR2領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

－ 配列番号2を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域及び配列番号3を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域。FR領域

50

は、表 2 で同定される通りであり得る。代わりに、F R 領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。C D R 1 領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

— 配列番号 1 を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる C D R 1 領域及び配列番号 2 を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる C D R 2 領域。F R 領域は、表 2 で同定される通りであり得る。代わりに、F R 領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。C D R 3 領域は、別の抗体フラグメントに由来する。

— 配列番号 1 を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる C D R 1 領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来の C D R 2 及び C D R 3 領域を含み、且つ表 2 で同定される F R を有し得る。代わりに、F R 領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

— 配列番号 2 を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる C D R 2 領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来の C D R 1 及び C D R 3 領域を含み、且つ表 2 で同定される F R を有し得る。代わりに、F R 領域は、別の抗体フラグメントに由来し得る。

— 配列番号 3 を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる C D R 3 領域であり、これは、別の抗体フラグメント由来の C D R 1 及び C D R 2 領域を含み、且つ表 2 で同定される F R を有し得る。代わりに、F R 領域は、別の抗体フラグメント（第 4 の構造的特徴）に由来し得る。

また、好ましい抗体フラグメントは、

— 配列番号 26 のアミノ酸 I 62、S 63、G 64、Q 65、E 66、I 76、V 77、L 78、Y 79、N 80、I 81、E 82、T 83、G 84、Q 85、S 86、Y 87、T 88、I 89、L 90、S 91、L 105、S 106、P 107、D 108、R 109、Q 110、F 111、D 134、L 135、S 136、N 137、V 158、G 159、R 175、D 457 及び／又は Y 458 の少なくとも 1 つに接触するか、又は結合するか、又はそれらに特異的に結合する（第 2 の構造的特徴）。

【0128】

第 2 の構造的特徴の他の実施形態の各々は、第 4 の構造的特徴の各実施形態と組み合わせられ得る。

【0129】

— 実施形態では、抗体フラグメント、好ましくは本発明の V H H（又はそのフラグメント）は、本明細書で同定される第 1 の構造的特徴、及び／又は第 2 の構造的特徴、及び／又は第 3 の構造的特徴、及び／又は第 4 の構造的特徴によって表される。代わりに又は前記構造的特徴と組み合わせ、前記抗体フラグメント、好ましくは本発明の V H H（又はそのフラグメント）は、以下の機能的特徴の少なくとも 1 つを特徴とする：

— ヒト及び／又はマウス F A P と特異的に結合し、好ましくはヒト F A P 及びマウス F A P と特異的に結合すること、及び

— F A P 活性を調節しないこと。

【0130】

特異的結合は、本明細書で先に記載されている。最も好ましくは、抗体フラグメントは、好ましくはバイオレイヤー干渉法を用いて評価される、 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ モル／リットルの範囲にわたる K_D 及び／又は $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 秒 $^{-1}$ の範囲にわたる k_{off} 、より好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-12}$ モル／リットルの範囲にわたる K_D 及び $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 秒 $^{-1}$ の範囲にわたる k_{off} でヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する。

【0131】

抗体フラグメントがモジュレータではない（すなわち阻害剤ではなく、ヒト及び／又はマウス F A P の活性化剤ではない）可能性があるという事実に関する第 2 の機能的特徴も本明細書で詳細に記載される。

【0132】

したがって、一実施形態では、本発明の抗体フラグメント、V H H 又は V H H のフラグメントは、少なくとも 1 つの構造的特徴及び／又は少なくとも 1 つの機能的特徴を満たす

10

20

30

40

50

べきである。

【0133】

追加の抗体フラグメント

更なる態様では、先に開示されたものと同様の構造的及び／又は機能的特徴を有する追加の抗体フラグメントが提供され、違いは、以下に定義されるそれらの全長配列、それらのCDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4配列である（表3及び更に本文を参照されたい）。

【0134】

単ドメイン抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグメントなどのこれらの追加の抗体フラグメントは、機能的特徴及び／又は構造的特徴によって特徴付けられ得る。構造的特徴の例は配列に関連し、機能的特徴の例は前記抗体フラグメントの活性（すなわち本明細書で先に定義されたような抗体フラグメントについて全て先に定義された、結合活性及びFAP活性の調節の非存在）に関連する。本明細書で上記に存在し、且つ「抗体フラグメント」、「その活性」、「その結合」、「交差結合」（すなわち競合）、「親和性」、「結合活性」及び／又は「特異性」の定義に関連する文言は、これらの追加の抗体フラグメントにも適用される。別段の指示がない限り、第1の態様の抗体フラグメントに関する全ての定義は、追加の抗体フラグメントにも適用される。同じことは、抗体フラグメントが使用される本発明の全てのその後の態様（抗体フラグメントを含む化合物、ターゲティング用途のための化合物、標識化合物、組成物、キット、抗体フラグメント及び標識化合物の診断的使用、標識化合物の治療的使用）に当てはまる。

10

20

【0135】

一実施形態では、本発明の追加的な抗体フラグメントは、本明細書で前に定義された配列番号26のアミノ酸のストレッチ又は領域（すなわち配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／若しくは101～140）の少なくとも一方（好ましくは両方）に接触するか、結合するか又は特異的に結合する。一実施形態では、前記抗体フラグメントのエピトープは、配列番号26のアミノ酸のこれらのストレッチ又は領域内に含まれる。

【0136】

更に、一実施形態では、本発明の追加的な抗体フラグメントは、構造的エピトープについて、本明細書で前に定義された配列番号26のアミノ酸のストレッチ又は領域の組合せ（すなわち配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／若しくは101～140）を有する。一実施形態では、前記抗体フラグメントの構造的エピトープは、配列番号26のアミノ酸のこれらのストレッチ又は領域の組合せ内に含まれる。

30

【0137】

これらのエピトープは、抗体フラグメントのファミリーを定義する。抗体フラグメントのこのファミリーは、これらのエピトープ、線状エピトープ及び／又はこの構造的エピトープの少なくとも1つを共有する。

【0138】

これらの追加の抗体フラグメントは、他のものと同じ方法で使用することができた。本明細書で前又は後に提供される全ての機能的定義は、この追加の抗体フラグメントにも適用される。本明細書で既に定義されている抗体フラグメントの第1の構造的特徴及び第2の構造的特徴は、これらの追加の抗体フラグメントにも適用される。

40

【0139】

以下では、本発明者らは、本発明の追加の抗体フラグメントのいくつかの更なる構造的特徴を記載する。本発明の抗体フラグメントは、これらの構造的特徴：第1、第2、第3及び第4の構造的特徴の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ又は全ての存在を特徴とし得る。

【0140】

ヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであり、前記抗体フラグメントは、配列番号8、5、6、7、12、9、10、11の少なくとも1つ又はそ

50

の一部と少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって表される。

【0141】

一実施形態では、この配列のいずれかとの配列同一性は、少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% である。

【0142】

ヒト及び／又はマウス FAP に特異的に結合する抗体フラグメントであり、前記抗体フラグメントは、配列番号 16、13、14、15 の少なくとも 1 つ又はその一部と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって表される。

10

【0143】

一実施形態では、この配列のいずれかとの配列同一性は、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% である。

【0144】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号 8、5、6、7 又はその一部と少なくとも 91% の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表される。一実施形態では、この配列との配列類似性は、少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% である。

20

【0145】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号 9、10、11、12 又はその一部と少なくとも 89% の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表される。一実施形態では、この配列との配列類似性は、少なくとも 89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% である。

【0146】

一実施形態では、本発明の抗体フラグメントは、配列番号 13、14、15、16 又はその一部と少なくとも 81% の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれから本質的になるアミノ酸配列によって表される。一実施形態では、この配列との配列類似性は、少なくとも 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% である。

30

【0147】

一実施形態では、追加の抗体フラグメントの長さは、110～130 アミノ酸又は 110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129 若しくは 130 アミノ酸である。この長さは、抗体フラグメントの配列に付加され得る His タグなどのタグの長さを含まない。いくつかの His タグは、本明細書で前に既に定義されている。

40

【0148】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメントは、

ー 配列番号 8、5、6、7、12、9、10、11 の少なくとも 1 つ又はその一部と少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

ー 配列番号 26 の 65～90 及び／又は 101～140 内に含まれるアミノ酸ストレッチ又は領域内に含まれるエピートプを有する（第 2 の構造的特徴）。

【0149】

一実施形態では、この配列との配列同一性（又は類似性）は、少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96

50

%、97%、98%、99%又は100%である。

【0150】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメントは、

－ 配列番号8、5、6、7、12、9、10、11の少なくとも1つ又はその一部と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

－ 配列番号26の65～90及び101～140内に含まれるアミノ酸ストレッチ又は領域の組合せ内に含まれる構造的エピトープを有する（第2の構造的特徴）。

【0151】

一実施形態では、この配列との配列同一性（又は類似性）は、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。

10

【0152】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメントは、

－ 配列番号8、5、6、7、12、9、10、11の少なくとも1つ又はその一部と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

－ 配列番号26のアミノ酸I62、S63、G64、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137、V158、G159、R175、D457及び／又はY458の少なくとも1つに接触するか、又は結合するか、又はそれらに特異的に結合する（第2の構造的特徴）。

20

【0153】

一実施形態では、この配列との配列同一性（又は類似性）は、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。

【0154】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメントは、CDR移植を用いて且つ表3のCDR配列を用いて、任意選択的に表2のCDRと組み合わせ、上記の抗体フラグメントに由来する。表2及び表3のFR領域との組合せも組み合わせることができる。

【0155】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメント、好ましくは本明細書に開示されるVHHは、配列番号5、9、13を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR1領域と、配列番号6、10、14を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR2領域と、配列番号7、11、15を含むか、それからなるか又はそれから本質的になるCDR3領域とを含む群から選択されるCDR配列の少なくとも1つの組合せを含むアミノ酸配列によって表される。前記CDR1、CDR2及び／又はCDR3の1つ又は2つのアミノ酸は、得られた抗体フラグメントの活性を実質的に変化させることなく、別の1つのアミノ酸で置換され得る。追加の抗体フラグメント（関連する追加の抗体フラグメントのFR領域の各々の配列番号については、表3を参照されたい）のフレームワーク領域のいずれについても、同じことが当てはまる。これらの抗体フラグメントバリエーションの各々も本発明に包含される。前記抗体フラグメントバリエーションの活性は、本明細書で先に定義した特異的結合活性である。本発明に関連して、「実質的」とは、初期CDR及び／又はFR領域を有する抗体フラグメントの活性と比較して、前記結合活性の少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は100%が依然として検出可能であることを意味し得る。

30

40

【0156】

第1の態様の抗体フラグメントのCDR領域及び／又はFR領域（表2を参照されたい）を追加の抗体フラグメントのCDR領域及び／又はFR領域（表3を参照されたい）と組み合わせることも包含される。

50

【0157】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメントは、上記で同定されたCDRを参照することによって定義され、これは、配列番号26の65～90及び／又は101～140内に含まれるアミノ酸ストレッチ又は領域内に含まれるエピトープを有する（第2の構造的特徴）。

【0158】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメントは、上記で同定されたCDRを参照することによって定義され、これは、配列番号26の65～90及び101～140内に含まれるアミノ酸ストレッチ又は領域の組合せ内に含まれる構造的エピトープを有する（第2の構造的特徴）。

10

【0159】

一実施形態では、本発明の追加の抗体フラグメントは、上記で同定されたCDRを参照することによって定義され、配列番号26のアミノ酸I62、S63、G64、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137、V158、G159、R175、D457及び／又はY458の少なくとも1つに接触するか、又は結合するか、又は特異的に結合する（第2の構造的特徴）。

【0160】

20

30

40

50

【表 3】

表 3: 抗体フラグメント B2、B3、及び B4 の CDR 及び FR(本発明の一般的な定義に特化した説明の一般部分において、本明細書の後に定義される IMGT 命名法を使用)

	アミノ酸配列	
B2(配列番号 8)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSISANS MGWYRQAPGKQRDVVAGLTTGGRSHYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLKAEDTAVYYCNLWPPVQGYWGQGT QVTVSS	10
B2 の CDR		
CDR1(配列番号 5)	GSISANS	
CDR2(配列番号 6)	LTTGGRS	
CDR3(配列番号 7)	NLWPPVQGY	
B2 の FR		
FR1(配列番号 41)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVS	
FR2(配列番号 42)	MGWYRQAPGKQRDVVAG	
FR3(配列番号 43)	HYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLKAEDTAVYYC	20
FR4(配列番号 44)	WGQGTQVTVSS	
B3(配列番号 12)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRLFSTNAMGW YRQAPGKQRELVAGITGGDRSNYADSVKGRFTISRDN GKNTLYLMNSLKPEDTAVYYCNFYPPIVGDYWGQGT QVTVSS	
B3 の CDR		
CDR1(配列番号 9)	GRLFSTNA	30
CDR2(配列番号 10)	ITGGDRS	

【0161】

【表 4】

CDR3(配列番号 11)	NFYPPIVGDY
B3 の FR	
FR1(配列番号 45)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVS
FR2(配列番号 46)	MGWYRQAPGKQRELVAG
FR3(配列番号 47)	NYADSVKGRFTISRDNKGKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC
FR4(配列番号 48)	WGQGTQVTVSS
B4(配列番号 16)	DVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCVASGFTFSSYYMSW VRQAPGKGLEWVASIYADGDMTTYADSVRGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPLPPYHVNQGT QVTVSS
B4 の CDR	
CDR1(配列番号 13)	GFTFSSYY
CDR2(配列番号 14)	IYADGDMT
CDR3(配列番号 15)	AKDPLPPYH
B4 の FR	
FR1(配列番号 49)	DVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCVAS
FR2(配列番号 50)	MSWVRQAPGKGLEWVAS
FR3(配列番号 51)	YYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYC
FR4(配列番号 52)	VNQGTVTVSS

10

20

30

【0162】

抗体フラグメントを含む化合物

更なる態様では、抗体フラグメント、好ましくは先の態様で定義されたVHH又はそのフラグメントが提供され、前記抗体フラグメント、好ましくは前記VHH又はそのフラグメントは、部分構造などのエンティティに連結又はカップリングされる。本発明に関連して、部分構造などのエンティティに連結した抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグメントは、化合物と呼ばれ得る。したがって、本出願に関連して、化合物は、本発明の抗体フラグメント及びエンティティを含むか、それから本質的になるか又はそれからなる。

40

【0163】

本明細書で先に開示されるように、本発明の抗体フラグメント、好ましくはVHH（又はそのフラグメント）は、本明細書で同定される構造的特徴（好ましくは第1及び／又は第2の構造的特徴）によって表される。代替的に又は前記構造的特徴との組合せにおいて、前記抗体フラグメント、好ましくは本発明のVHH（又はそのフラグメント）は、ヒト及び／又はマウスFAPと特異的に結合する機能的特徴によって特徴付けられ、好ましくは、これは、ヒトFAP及びマウスFAPと特異的に結合する機能的特徴によって特徴付けられる。一実施形態では、前記抗体フラグメント、好ましくは本発明のVHH（又はそのフラグメント）は、この抗体フラグメントがモジュレータ（すなわち阻害剤ではなく、ヒト及び／又はマウスFAPの活性化剤ではない）ではないという機能的特徴を特徴とする。したがって、本発明の抗体フラグメント、VHH又はVHHのフラグメントは、構造

50

的特徴及び／又は機能的特徴の少なくとも1つを満たすべきである。

【0164】

エンティティ及び抗体フラグメントは、互いに連結又はカップリングされ得る。エンティティは、本明細書で後述するように細胞であり得る。エンティティが細胞である場合、「エンティティに連結又はカップリングされた抗体フラグメント」という表現は、抗体フラグメントが前記細胞内又は前記細胞上で発現されることを意味する。本発明の抗体フラグメントをコードする核酸分子は、本明細書で後に開示される。

【0165】

部分構造の同一性及び／又は連結の種類は、抗体フラグメント、又は部分構造、又は化合物について想定される用途の種類に応じて異なり得る。部分構造は、本明細書で定義される分子又は標識であり得る。

【0166】

ターゲティング用途のための化合物

一実施形態では、抗体フラグメント（好ましくはVHH又はそのフラグメント）に連結される部分構造は、ヒト及び／又はマウスFAPを発現する細胞、組織、器官に送達される分子である。本発明に関連して、「化合物」は、抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグメント（全て本明細書で定義される）であるか、又はそれを含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからなり、前記抗体フラグメントは、前記細胞、組織、器官に送達される部分構造、好ましくは分子に連結されている。FAPを発現する細胞、組織、器官に作用することが知られている任意の部分構造、分子又は医薬品は、潜在的に本発明によって包含され、且つ本発明の抗体フラグメントに連結され得るであろう。分子は、ペプチド、小分子又は核酸であり得る。ペプチドは、サイトカインであり得る。小分子は、化学療法薬であり得る。エンティティは、CAR-T細胞、CAR-NK細胞、BITE又はLITEなどの細胞であり得る。

【0167】

一実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、AcTakine（標的上活性サイトカイン）又はAcTaferon（IFN α 系AcTakine）、好ましくは国際公開第2017077382A1号パンフレット、同第2017134301A1号パンフレット、同第2017194783A1号パンフレット、同第2017194782A2号パンフレット、同第2018077893A1号パンフレット、同第2018141964A1号パンフレット、同第2018144999A1号パンフレット、同第2019032661A1号パンフレット、同第2019032663A1号パンフレット、同第2019032662A1号パンフレット、同第2019148089A1号パンフレット、同第2019191519A1号パンフレット又は同第2020033646A1号パンフレットに記載のAcTakine又はAcTaferonである。この実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、好ましくは、癌用医薬品である。更に、抗体フラグメントに連結された部分構造を含む化合物は、好ましくは、癌のための医薬品である。

【0168】

一実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、ピロロベンゾジアゼピン、好ましくは国際公開第2014057074A1号パンフレット、同第2015052322A1号パンフレット、同第2014140174A1号パンフレット、同第2015052321A1号パンフレット、同第2017186894A1号パンフレット、同第2017137555A1号パンフレット、同第2017137553A1号パンフレット、同第2016038383A1号パンフレット又は同第2018192944A1号パンフレットに記載されるものなどのピロロベンゾジアゼピン二量体であり、本明細書において、より好ましくは、前記ピロロベンゾジアゼピン二量体は、以下からなる群から選択される：

— (11S, 11aS) — 4 — ((2R, 5R) — 37 — (2, 5 — ジオキソ — 2, 5 — ジヒドロ — 1H — ピロール — 1 — イル) — 5 — イソプロピル — 2 — メチル — 4, 7,

3 5-トリオキソ-10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31-オクタオキサ-3, 6, 34-トリアザヘプタトリアコンタナミド) ベンジル11-ヒドロキシ-8-(5-(11S, 11aS)-11-ヒドロキシ-10-(4-(10R, 13R)-10-イソプロピル-13-メチル-8, 11-ジオキソ-2, 5-ジオキサ-9, 12-ジアザテトラデカンアミド) ベンジル) オキシ) カルボニル)-7-メトキシ-2-メチル-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル) オキシ) ペンチル) オキシ)-7-メトキシ-2-メチル-5-オキソ-11, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート、

- (S)-3-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(8-メトキシ-2-(6-メトキシナフタレン-2-イル)-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-7-イル) オキシ) メチル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-1-イル) エトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) プロパンアミド、

- (S)-3-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(2-メチレン-5-オキソ-2, 3, 5, 11a-テトラヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-7-イル) オキシ) メチル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-1-イル) エトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) プロパンアミド、

- 1-(3-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) プロパンアミド)-N-(3-(S)-8-(5-(S)-7-メトキシ-2-メチル-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-8-イル) オキシ) ペンチル) オキシ)-2-メチル-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-7-イル) オキシ) プロピル)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-オクタオキサヘプタコサン-27-アミド、

- 3-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(S)-8-(5-(S)-7-メトキシ-2-メチル-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-8-イル) オキシ) ペンチル) オキシ)-2-メチル-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-7-イル) オキシ) メチル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-1-イル) エトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) プロパンアミド、

- 1-(3-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) プロパンアミド)-N-(S)-1-(S)-1-(4-(S)-7-メトキシ-8-(5-(S)-7-メトキシ-2-(4-(4-メチルピペラジン-1-イル) フェニル)-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-8-イル) オキシ) ペンチル) オキシ)-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン-2-イル) フェニル) アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル) アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-オクタオキサヘプタコサン-27-アミド、

- 6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-(S)-1-(S)-1-(4-(S)-8-(3-(S)-2-(3-フルオロ-4-メトキシフェニル)-7-メトキシ-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[エルピロロ[1, 2-a][1, 4]1ジアゼピン-8-イル) オキシ) プロボキシ)-7-メトキシ-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ベンゾ[エルピロロ[1, 2-a][1, 4]1H, 4]1ジアゼピン-2-イル) フェニル) アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル) アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル) ヘキサナミド、

10

20

30

40

50

－ (R)－2－((3－ニトロピリジン－2－イル)ジスルファニル)プロピル(11S, 11aS)－11－ヒドロキシ－7－メトキシ－8－(3－((S)－7－メトキシ－2－メチレン－5－オキソ－2, 3, 5, 11a－テトラヒドロ－1H－ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン－8－イル)オキシ)プロポキシ)－2－メチレン－5－オキソ－2, 3, 11, 11a－テトラヒドロ－1Hピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン－10(5H)－カルボキシレート、

－ 4－((2S, 5S)－37－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1H－ピロール－1イル)－5－イソプロピル－2－メチル－4, 7, 35－トリオキソ－10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31－オクタオキサ－3, 6, 34－トリアザヘプタトリアコンタナミド)ベンジル(11S, 11aS)－11－ヒドロキシ－7－メトキシ－8－(3－((S)－7－メトキシ－2－メチレン－5－オキソ－2, 3, 511a－テトラヒドロ－1H－ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン－8－イル)オキシ)プロポキシ)－2－メチレン－5－オキソ－2, 3, 11, 11a－テトラヒドロ－1H－ベンゾ[e]ピロロ[1, 2-a][1, 4]ジアゼピン－10(5H)－カルボキシレート、及び

10

－ 4－((2S, 5S)－37－(2, 5－ジオキソ－2, 5－ジヒドロ－1H－ピロール－1イル)－5－イソプロピル－2－メチル－4, 7, 35－トリオキソ－10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31－オクタオキサ－3, 6, 34－トリアザヘプタトリアコンタナミド)ベンジル(11S, 11aS)－11－ヒドロキシ－8－(3－((11S, 11aS)－11－ヒドロキシ－10－((4－(10S, 13S)－10－イソプロピル－13－メチル－8, 11－ジオキソ－2, 5－ジオキサ－9, 12－ジアザテトラデカン－14－アミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)－7－メトキシ－2－メチレン－5－オキソ－2, 3, 5, 10, 11, 11a－ヘキサヒドロ－1H－ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン－8－イル)オキシ)プロポキシ)－7－メトキシ－2－メチレン－5－オキソ－2, 3, 11, 11a－テトラヒドロ－1H－ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン－10(5H)－カルボキシレート。

20

【0169】

上記の実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、好ましくは、癌用医薬品である。更に、抗体フラグメントに連結された部分構造を含む化合物は、好ましくは、癌のための医薬品である。

30

【0170】

一実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、国際公開第2017211809A1号パンフレットに記載されるものなどの八配位トリウムキレート剤である。この実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、好ましくは、癌用医薬品である。更に、抗体フラグメントに連結された部分構造を含む化合物は、好ましくは、癌のための医薬品である。

【0171】

一実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、国際公開第2015162293A1号パンフレットに記載のドラスタチン又はアウリスタチンである。この実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、好ましくは、癌用医薬品である。更に、抗体フラグメントに連結された部分構造を含む化合物は、好ましくは、癌のための医薬品である。

40

【0172】

一実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、国際公開第2015118030A2号パンフレットに記載されるものなどの細胞溶解素又はNigrin-bA鎖である。この実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、好ましくは、癌用医薬品である。更に、抗体フラグメントに連結された部分構造を含む化合物は、好ましくは、癌のための医薬品である。

【0173】

50

一実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、国際公開第2015103990A1号パンフレットに記載されるものなど、2-プロピルトリアゾロ[4, 5-c]キノリン-4-アミン、1-(2-メチルプロピル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-4-アミン、4-アミノ-2-(エトキシメチル)-a, a-ジメチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-エタノール、1-(4-アミノ-2-エチルアミノメチルイミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)-2-メチルプロパン-2-オール、N-[4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)ブチル]メタンスルホンアミド、4-アミノ-2-エトキシメチル-a, a-ジメチル-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-1h-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-エタノール、4-アミノ-a, a-ジメチル-2-メトキシエチル-1h-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-エタノール、1-{2-[3-(ベンジルオキシ)プロポキシ]エチル}-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-4-アミン、N-[4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4, 5-c][1, 5]ナフチリジン-1-イル)ブチル]-n'-ブチル尿素、N1-[2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4, 5-c][1, 5]ナフチリジン-1-イル)エチル]-2-アミノ-4-メチルペンタンアミド、N-(2-{2-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]エトキシ}エチル)-n'-フェニル尿素、1-(2-アミノ-2-メチルプロピル)-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-4-アミン、1-{4-[3, 5-ジクロロフェニル]スルホニル]ブチル}-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-4-アミン、N-(2-{2-[4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]エトキシ}エチル)-N'-シクロヘキシル尿素、N-{3-[4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]プロピル}-n'-(3-シアノフェニル)チオ尿素、N-[3-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)-2, 2-ジメチルプロピル]ベンズアミド、2-ブチル-1-[3-(メチルスルホニル)プロピル]-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-4-アミン、N-{2-[4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]-1, 1-ジメチルエチル}-2-エトキシアセトアミド、1-[4-アミノ-2-エトキシメチル-7-(ピリジン-4-イル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]-2-メチルプロパン-2-オール、1-[4-アミノ-2-(エトキシメチル)-7-(ピリジン-3-イル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]-2-メチルプロパン-2-オール、N-{3-[4-アミノ-1-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-2-(メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-7-イル]フェニル}メタンスルホンアミド、1-[4-アミノ-7-(5-ヒドロキシメチルピリジン-3-イル)-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]-2-メチルプロパン-2-オール、3-[4-アミノ-2-(エトキシメチル)-7-(ピリジン-3-イル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]プロパン-1, 2-ジオール、1-[2-(4-アミノ-2-エトキシメチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)-1, 1-ジメチルエチル]-3-プロピル尿素、1-[2-(4-アミノ-2-エトキシメチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)-1, 1-ジメチルエチル]-3-シクロペンチル尿素、1-[(2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキサラン-4-イル)メチル]-2-(エトキシメチル)-7-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-4-アミン、4-[4-アミノ-2-エトキシメチル-1-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-7-イル]-N-メトキシ-N-メチルベンズアミド、2-エトキシメチル-N1-イソプロピル-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1, 4-ジアミン、1-[4-アミノ-2-エチル-7-(ピリジン-4-イル)-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル]-2-メチルプロパン-2-オール、

N-〔4-（4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ〔4,5-c〕キノリン-1-イル）ブチル〕メタンスルホンアミド又はN-〔4-（4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ〔4,5-c〕〔1,5〕ナフチリジン-1-イル）ブチル〕-N'-シクロヘキシル尿素である。この実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、好ましくは、癌用医薬品である。更に、抗体フラグメントに連結された部分構造を含む化合物は、好ましくは、癌のための医薬品である。

【0174】

一実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、国際公開第2015051199A2号パンフレットに記載されるものなどのシュドモナス外毒素である。この実施形態では、抗体フラグメントに連結された部分構造は、好ましくは、癌用医薬品である。更に、抗体フラグメントに連結された部分構造を含む化合物は、好ましくは、癌のための医薬品である。

10

【0175】

国際公開第2017137553A1号パンフレット、同第2016038383A1号パンフレット、同第2018192944A1号パンフレット、同第2015051199A2号パンフレット、同第2017211809A1号パンフレット、同第2014057074A1号パンフレット、同第2015052322A1号パンフレット、同第2014140174A1号パンフレット、同第2015052321A1号パンフレット、同第2017186894A1号パンフレット、同第2017137555A1号パンフレット、同第2015162293A1号パンフレット、同第2015118030A2号パンフレット、同第2015103990A1号パンフレット、同第2017077382A1号パンフレット、同第2017134301A1号パンフレット、同第2017194783A1号パンフレット、同第2017194782A2号パンフレット、同第2018077893A1号パンフレット、同第2018141964A1号パンフレット、同第2018144999A1号パンフレット、同第2019032661A1号パンフレット、同第2019032663A1号パンフレット、同第2019032662A1号パンフレット、同第2019148089A1号パンフレット、同第2019191519A1号パンフレット及び同第2020033646A1号パンフレットは、これらの全体が組み込まれ、これらに開示されている全ての化合物は、本出願に関連して、抗体フラグメントに連結される部分構造であり得る。

20

30

【0176】

標識化合物

更なる態様では、先の態様の1つで定義された抗体フラグメント、好ましくはヒト及び／若しくはマウスFAPに特異的に結合する重鎖抗体（VHH）又はそのフラグメントを含むか、又はそれからなるか、又はそれから本質的になる標識化合物が提供され、ここで、前記抗体フラグメントは、標識である部分構造に連結される。

【0177】

一実施形態では、標識は、放射性核種（すなわち放射性標識）である。抗体フラグメントを放射性核種に標識するプロセスは、説明の最後の定義部分で詳細に開示されている。好ましい実施形態では、ヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメント、好ましくは重鎖抗体（VHH）又はそのフラグメントは、部分構造に連結され、その部分構造は、放射性核種である。

40

【0178】

この態様では、放射性核種にカップリングした抗体フラグメント、好ましくは重鎖抗体（VHH）又はそのフラグメントは、標識又は放射性標識化合物と呼ばれ得る。

【0179】

一実施形態では、そのような標識化合物は、本明細書で先に定義された構造的特徴（第1の構造的特徴及び／若しくは第2の構造的特徴並びに／又は本明細書で定義された機能的特徴（すなわちヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合し、好ましくはヒトFAP及びマウスFAPに特異的に結合し、且つ／又はFAPのモジュレータではない）の少な

50

くとも1つ)の少なくとも1つを満たす。

【0180】

特に治療用途のために本発明の抗体フラグメントに連結することができる好適な放射性核種、好ましくは本明細書に開示されるVHHの例は、例えば、限定されないが、アクチニウム-225、アスタチン-211、ビスマス-212、ビスマス-213、セシウム-137、クロム-51、コバルト-60、銅-67、ジスプロシウム-165、エルビウム-169、フェルミウム-255、金-198、ホルミウム-166、ヨウ素-125、ヨウ素-131、イリジウム-192、鉄-59、鉛-212、ルテチウム-177、モリブデン-99、パラジウム-103、リン-32、カリウム-42、レニウム-186、レニウム-188、サマリウム-153、ラジウム-223、ラジウム-224、ルテニウム-106、スカンジウム-47、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テルビウム-149、テルビウム-161、テルビウム-149、トリウム-227、キセノン-133、イッテルビウム-169、イッテルビウム-177及びイットリウム-90からなる群から選択されるが、これらに限定されない放射性同位体を含む、 α 線放出放射性核種及び β -線放出放射性核種からなる群から非限定的に選択することができる。

10

【0181】

なお更なる特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物中に存在する放射性核種は、ヨウ素-131である。

【0182】

なお更なる特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物中に存在する放射性核種は、アクチニウム-225である。

20

【0183】

なお更なる特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物中に存在する放射性核種は、ルテチウム-177である。

【0184】

特に診断用途のために本発明の抗体フラグメントに連結することができる好適な放射性核種、好ましくは本明細書に開示されるVHHの例は、例えば、ヨウ素-131、イットリウム-90、ヨウ素-125、ルテチウム-177、レニウム-186、レニウム-188、スカンジウム-43、スカンジウム-44、テクネチウム-99m、テルビウム-161、インジウム-111、キセノン-133、タリウム-201、フッ素-18、ガリウム-68、ガリウム-67、銅-67、ヨウ素-123、ヨウ素-124、ジルコニウム-89及び銅-64からなる群から選択されるものを含む、陽電子放出放射性同位体(PET)又は γ 線放出放射性同位体(SPECT)からなる群から非限定的に選択することができる。

30

【0185】

なお更なる特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物中に存在する放射性核種は、ヨウ素-131である。

【0186】

なお更なる特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物中に存在する放射性核種は、アクチニウム-225である。

40

【0187】

なお更なる特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物中に存在する放射性核種は、ルテチウム-177である。

【0188】

特にセラノスティック(すなわち診断的及び治療的)用途のために本発明の抗体フラグメントに連結することができる好適な放射性核種、好ましくは本明細書に開示されるVHHの例は、例えば、限定されないが、アクチニウム-225、ビスマス-213、ヨウ素-125、ヨウ素-131、ルテチウム-177、イットリウム-90、銅-67、レニウム-186、レニウム-188及びテルビウム-161からなる群から非限定的に選択することができる。

50

【0189】

一実施形態では、抗体フラグメント、好ましくは重鎖抗体（VHH）又はそのフラグメントを分離するリンカーは、ベンゾエートリンカーである。好ましくは、このベンゾエートリンカーは、N-スクシンイミジル-4-グアニジノメチル-3-[I-131]ヨードベンゾエート（SGMIB）又はその好適な誘導体を含む。代わりに、2-[ビス[2-[ビス（カルボキシメチル）アミノ]エチル]アミノ]酢酸（DTPA）、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10四酢酸（DOTA）若しくはN, N'-ビス[(6-カルボキシ-2-ピリジル)メチル]-4, 13ジアザ-18-クラウン-6（MACROPA）又はこれらの誘導体を使用し得る。

【0190】

一実施形態では、標識化合物は、

— SGMIBを介してヨウ素-131に連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント、

— DTPA又はDOTAを介してルテチウム-177に連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント、

— DOTAを介してアクチニウム-225に連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント、又は

— テクネチウム-99mに連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント

である。

【0191】

これらの標識化合物の各々を合成し、実験の部で試験した。

【0192】

好ましい実施形態では、標識化合物は、

— ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／又は101～140内に含まれ、前記抗体フラグメントは、SGMIBを介してヨウ素-131に連結されている、抗体フラグメント、

— ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／又は101～140内に含まれ、前記抗体フラグメントは、DOTA又はDTPAを介してルテチウム-177に連結されている、抗体フラグメント、

— ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／又は101～140内に含まれ、抗体フラグメントは、DOTAを介してアクチニウム-225に連結されている、前記抗体フラグメント、又は

— ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び／又は101～140内に含まれ、前記抗体フラグメントは、テクネチウム-99mに連結されている、抗体フラグメント

である。

【0193】

好ましい実施形態では、標識化合物は、

— ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、構造的エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び101～140の組合せ内に含まれ、前記抗体フラグメントは、SGMIBを介してヨウ素-131に連結されている、抗体フラグメント、

— ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、構造的エピトープは、配列番号26のアミノ酸ストレッチ又は領域65～90及び101～140の組合せ内に含まれ、前記抗体フラグメントは、DOTA又はDTPAを介し

10

20

30

40

50

てルテチウム－１７７に連結されている、抗体フラグメント、

－ ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、構造的エピトープは、配列番号２６のアミノ酸ストレッチ又は領域６５～９０及び１０１～１４０の組合せ内に含まれ、抗体フラグメントは、DOTAを介してアクチニウム－２２５に連結されている、前記抗体フラグメント、又は

－ ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、構造的エピトープは、配列番号２６のアミノ酸ストレッチ又は領域６５～９０及び１０１～１４０の組合せ内に含まれ、前記抗体フラグメントは、テクネチウム－９９mに連結されている、抗体フラグメント

である。

10

【０１９４】

好ましい実施形態では、標識化合物は、

－ ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号２６のアミノ酸I62、S63、G64、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137、V158、G159、R175、D457及び／又はY458の少なくとも１つは、前記抗体フラグメントと相互作用し、前記抗体フラグメントは、SGMIBを介してヨウ素－１３１に連結されている、抗体フラグメント、

20

－ ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号２６のアミノ酸I62、S63、G64、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137、V158、G159、R175、D457及び／又はY458の少なくとも１つは、前記抗体フラグメントと相互作用し、前記抗体フラグメントは、DOTA又はDTPAを介してルテチウム－１７７に連結されている、抗体フラグメント、

－ ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号２６のアミノ酸I62、S63、G64、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137、V158、G159、R175、D457及び／又はY458の少なくとも１つは、前記抗体フラグメントと相互作用し、前記抗体フラグメントは、DOTAを介してアクチニウム－２２５に連結されている、抗体フラグメント、又は

30

－ ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号２６のアミノ酸I62、S63、G64、Q65、E66、I76、V77、L78、Y79、N80、I81、E82、T83、G84、Q85、S86、Y87、T88、I89、L90、S91、L105、S106、P107、D108、R109、Q110、F111、D134、L135、S136、N137、V158、G159、R175、D457及び／又はY458の少なくとも１つは、前記抗体フラグメントと相互作用し、前記抗体フラグメントは、テクネチウム－９９mに連結されている、抗体フラグメント

40

である。

【０１９５】

好ましい実施形態では、標識化合物は、

－ ヒトFAP及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号１、２、３、４と少なくとも８０％の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列又はその一部によって表され、SGMIBを介してヨウ素－１３１に連結されて

50

いる抗体フラグメント、

－ ヒト F A P 及び／又はマウス F A P に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 1、2、3、4 と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列又はその一部によって表され、D O T A 又は D T P A を介してルテチウム－177 に連結されている抗体フラグメント、

－ ヒト F A P 及び／又はマウス F A P に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 1、2、3、4 と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列又はその一部によって表され、D O T A を介してアクチニウム－225 に連結されている抗体フラグメント、又は

－ ヒト F A P 及び／又はマウス F A P に特異的に結合する抗体フラグメントであって、配列番号 1、2、3、4 と少なくとも 80 % の配列同一性（又は類似性）を有するアミノ酸配列又はその一部によって表され、テクネチウム－99m に連結されている抗体フラグメント

である。

【0196】

－実施形態では、この配列との配列同一性（又は類似性）は、少なくとも 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % である。その一部は、本明細書で既に定義されている。

【0197】

第 1、第 2、第 3 又は第 4 の構造的特徴及び／又は機能的特徴（すなわちヒト及び／又はマウス F A P と特異的に結合し、好ましくはヒト F A P 及びマウス F A P と特異的に結合し、且つ F A P 活性を調節しない）に関する他の実施形態の各々を組み合わせ、本発明の標識化合物を更に定義することができる。

【0198】

標識化合物は、癌抗原と見なされるヒト及び／又はマウス F A P に対して特異的に向けられる。標識化合物は、診断分子及び／又は治療分子として使用することができる。一実施形態では、診断又は治療される疾患は、癌である。

【0199】

本明細書で使用される場合、ヒト F A P とは、「癌細胞特異的抗原」、「癌特異的抗原」、「癌抗原」、「～上に存在する標的タンパク質」、「～に発現される標的タンパク質」及び／又は「癌細胞に特異的」、「癌細胞特異的標的（タンパク質）」、「癌（細胞）関連抗原」と見なされ、これらは、本明細書で互換的に使用され、且つヒト F A P が主に癌細胞上並びに腫瘍の近傍及び／又は転移の近傍に存在する（又は主にそこで発現する）という事実を指す。F A P は、腫瘍形成機能を有する癌関連線維芽細胞（C A F）で特異的に発現、より特異的には過剰発現される。これは、一部の癌細胞（例えば、白血病、骨、子宮、脾臓、皮膚、筋肉、脳、乳房、結腸直腸、食道、胃、肝臓、肺、卵巣、副甲状腺、腎臓の癌など）でも発現される（P u r e ら（2018 年）「O n c o g e n e A u g」；第 37 巻（第 32 号）：第 4343～4357 頁、本明細書で後に開示）。F A P は、健康な細胞ではほとんど発現されない。したがって、ヒト F A P は、腫瘍抗原又は癌細胞抗原と見なされ得、したがって診断標的及び／又は治療標的として使用され得る。

【0200】

例えば、ヒト F A P は、癌関連線維芽細胞で発現される。本明細書で使用される場合、用語「F A P 陽性」、又は「F A P を発現すること」、又は「F A P を過剰発現すること」とは、F A P タンパク質の過剰発現によって特徴付けられる癌性若しくは悪性のヒト細胞及び／又は癌関連線維芽細胞若しくは組織を指し得、したがって、これは、正常な健康な細胞と比較して異常に高いレベルの F A P 遺伝子及び／又は F A P タンパク質を有する。これに関連して、「過剰発現」とは、発現が対照細胞株における発現の少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 % 又はそれを超えることを意味し得る。対照細胞株は、健常細胞又は非疾患細胞であり得る。

【0201】

別の実施形態では、標識化合物中に存在する標識は、非放射性標識である。一実施形態では、そのような非放射性標識は、蛍光標識である。この非放射性標識化合物は、本明細書で定義される診断用途に使用することができる。代替的な用途には、画像誘導手術又は光線力学療法が含まれる。診断用途に適した蛍光標識の例としては、Alexa fluor 変形、Cy3、Cy5、FITC（フルオレセイン）、クマリン、テキサスレッド、オレゴングリーン、パシフィックブルー、パシフィックグリーン、パシフィックオレンジ、PE-Cyanine7、PerCP-Cyanine5.5、TRITC（テトラメチルローダミン）が挙げられる。画像誘導手術に適した蛍光標識の例としては、IRDye800CW、IRDye680-RD、ZW800-1、FNIR（例えば、Piet 10
erjan Debieら、「Front Pharmacology」（2019年）
；第10巻：第510号、doi:10.3389/fphar.2019.00510
、PMCID:PMC6527780 PMID:31139085）が挙げられる。光
線力学的療法に適した蛍光標識の例としては、IRDye700DXが挙げられる。ほと
んどの標識はThermoFisher又はLicorから入手することができる。

【0202】

組成物

更なる態様では、VHH又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントを含むか又はそれから本質的になる組成物が提供される。更なる態様では、前記抗体フラグメントが部分構造などのエンティティに連結されている場合、化合物を含むか又はそれから本質的になる組成物も提供される。組成物は、賦形剤を含む。賦形剤は、診断及び／又は治療目的に許容されるべきである。一実施形態では、組成物は、医薬組成物である。別の実施形態では、組成物は、診断用組成物である。組成物が医薬組成物及び診断用組成物であることも本発明に包含される。本発明の好適な製剤は、本明細書の最後の定義部に開示される。

【0203】

本明細書で定義される診断用組成物は、スクリーニング用量又は層別用量を含み得、したがってスクリーニング組成物又は層別組成物と称され得る。

【0204】

本明細書で想定されるような医薬組成物は、ヒトFAPに関連する疾患及び障害の予防及び／又は処置で使用され得る。一実施形態では、疾患は、ヒトFAPの発現又は過剰発現に関連する癌である。特に、本出願は、温血動物、特に哺乳動物、より具体的にはヒトにおける予防的及び／又は治療的使用に適した医薬組成物を提供する。

【0205】

キット

更なる態様では、キットも提供される。そのようなキットは、本明細書に記載の診断及び治療用途に適している。そのような用途には、本発明の抗体フラグメントの使用、部分構造などのエンティティに連結された抗体フラグメントを含む本発明の化合物の使用が含まれ、前記部分構造は、放射性標識又は非放射性標識である。キットのより詳細な定義は、説明の最後の定義の目的のための部分で詳細に説明される。

【0206】

抗体フラグメント及び標識化合物の診断的使用

更なる態様では、抗体フラグメント若しくは標識化合物又はこれらを含む組成物が、対象又は前記対象の単離された試料におけるヒトFAPの発現を評価するために使用される方法が提供される。この方法は、以下の工程を含み得る：

- (a) 本明細書で同定される抗体フラグメント又は標識化合物を提供すること、
- (b) それを対象に投与するか、又はそれを対象の単離された試料と接触させること、
- (c) 前記対象又は前記対象の前記単離された試料におけるヒトFAPの発現を評価すること。

【0207】

この方法は、診断法と称され得る。この方法は、インビトロ又はインビボ方法であり得

10

20

30

40

50

る。この方法は、対象又は前記対象の単離された試料におけるヒト F A P の発現の局在化を可能にし得、且つ前記対象における特定の疾患、及び／又は障害、及び／又は状態の予想及び／又は予後診断を可能にし得る。一実施形態では、この方法は、癌治療又は創傷治療又は線維症治療などの特定の治療に応答する可能性が高い患者を同定するための層別化法であり得る。したがって、更なる態様では、抗体フラグメント若しくは標識化合物又はこれらを含む組成物を使用して対象を層別化し、且つ対象が癌治療又は創傷治療又は線維症治療などの特定の治療に応答する可能性があるかどうかを評価する方法が提供される。この方法は、以下の工程を含み得る：

- (a) 本明細書で同定される抗体フラグメント又は標識化合物を提供すること、
- (b) 対象又は対象の単離された試料にそれを投与すること、
- (c) 前記対象又は前記対象の前記単離試料におけるヒト F A P の発現を評価すること、及び
- (d) 対象が、本発明の標識化合物を含むものなどの医学的治療に応答性である可能性が高いかどうかを決定すること。

10

【0208】

本発明の抗体フラグメントは、このような診断法で使用され得る。本発明の抗体フラグメントは、それ自体、そのような方法で使用するために、標識にカップリングする必要はない。そのような方法は、E L I S A であり得る。

【0209】

任意選択的に、上で定義された方法が放射性標識化合物を用いて実施される場合、治療に適した放射性標識化合物又はそのバージョンは、治療として対象に投与される。対象は、好ましくは、ヒトである。本明細書で先に定義したようなあらゆる放射性標識化合物がこの方法に好適である。詳細な情報は、本明細書で同定される標識化合物を生成／提供及び投与するために、説明の最後の定義部に開示されている。診断目的及び治療目的のための標識化合物の投与は、同様である。この態様にかかる方法は、インビトロ法、エクスピボ法であり得る。

20

【0210】

一実施形態では、スクリーニング用量又はバイオマーカ用量が対象又は前記対象の単離された試料に投与される。詳細な定義は、特に、治療用量の定義と比較することによって後に提供される。

30

【0211】

診断方法の一実施形態では、標識化合物は、

- － S G M I B を介してヨウ素－131に連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント、
 - － D T P A 又は D O T A を介してルテチウム－177に連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント、又は
 - － テクネチウム－99mに連結されている、本明細書で先に定義された抗体フラグメント
- である。

【0212】

これらの標識化合物の各々を合成し、実験の部で試験した。

40

【0213】

対象におけるヒト F A P の発現の評価は、好ましくは、説明の最後の定義の目的のための部分に開示されるようなイメージングを用いて行われる。代わりに、対象におけるヒト F A P の発現の評価は、好ましくは、対象の単離された試料を用いて行われる。本発明に関連して、対象の単離された試料は、前記対象からの組織又は液体試料であり得る。液体は、血清であり得る。患者から単離された試料は、生検又は腫瘍生検と呼ばれ得る。

【0214】

(標識) 化合物の治療的使用

更なる態様では、医薬品として使用するための抗体フラグメント、好ましくは V H H 若

50

しくはそのフラグメント、又は化合物若しくは標識化合物、又は組成物（全て本明細書で定義される通り）が提供される。

【0215】

一実施形態では、化合物は、抗体フラグメント（好ましくはVHH又はそのフラグメント）に連結される部分構造などのエンティティを含み、前記部分構造は、FAPを発現又は過剰発現する細胞、組織、器官に送達されるべき分子である。分子は、ペプチド又は小分子、核酸であり得る。ペプチドは、サイトカインであり得る。小分子は、化学療法薬であり得る。エンティティは、CAR-T細胞、CAR-NK細胞、BITE又はLITEなどの細胞であり得る。この化合物又はそれを含む組成物は、FAPの発現又は過剰発現に関連する疾患又は状態を処置するための医薬品であり得る。

10

【0216】

FAPを発現する細胞、組織、器官に作用することが知られている任意の部分構造、分子又は医薬品は、潜在的に本発明によって包含され、且つ本発明の抗体フラグメントに連結され得るであろう。

【0217】

別の実施形態では、化合物は、標識化合物であり、前記標識化合物又はそれを含む組成物は、癌を治療するための医薬品である。一実施形態では、前記癌は、癌又は腫瘍細胞又は転移した病変部におけるヒトFAPの発現に関連する。治療される癌は、転移性であり得、好ましくは、転移性細胞は、脳、骨、肝臓、肺に見られる。FAPの発現に関連する癌は、白血病、骨、子宮、膵臓、GEP-NET（胃腸膵臓神経内分泌腫瘍）、皮膚、筋肉、脳、乳房、結腸直腸、食道、胃、肝臓、肺、NSCLC（非小細胞肺癌）、卵巣、副甲状腺、腎臓の癌細胞、CUP（原発性が不明な癌）、前立腺、小腸、CCC（胆管細胞癌）、肉腫のいずれかであり得る（Pureら（2018年）「Oncogene」、8月；第37巻（第32号）；第4343～4357頁及びFrederik Gieseら、「J Nucl Med」、2019年5月1日、第60巻補足1、概要289）。

20

【0218】

しかしながら、本発明は、これらのタイプの癌に限定されない。対象が、ヒトFAPを発現又は過剰発現する癌細胞を有することが疑われると直ちに、標識化合物又はそれを含む組成物が使用され得る。

【0219】

一実施形態では、対象は、本発明の標識化合物を用いて最初に診断された後、同じ又は異なる標識化合物で治療される。核種の同一性は、診断及び治療用途において同じではない場合がある。

30

【0220】

この治療方法又は使用の一実施形態では、標識化合物は、

— SGMIBを介してヨウ素-131に連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント、

— DTPA又はDOTAを介してルテチウム-177に連結されている、本明細書で先に定義されたような抗体フラグメント、又は

— DOTAを介してアクチニウム-225に連結されている、本明細書で先に定義された抗体フラグメント

40

である。

【0221】

これらの標識化合物の各々を合成し、実験の部で試験した。

【0222】

本発明に関連して、疾患又は病態又は障害は、それぞれ標識化合物の投与が行われた場合、予防又は治療され、且つ

— 前記疾患若しくは病態若しくは障害に関連する少なくとも1つの症状の改善、及び／又は

— 前記疾患若しくは病態若しくは障害に関連する少なくとも1つのパラメータの改善

50

において得られた。

【0223】

改善は、化合物、それぞれの標識化合物を投与した少なくとも1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、1週間後に観察され得る。代わりに、化合物、それぞれ標識化合物の投与の少なくとも1ヶ月後、6ヶ月後に改善が観察され得る。想定される用量及び投与様式は、本明細書の最後の定義部で更に開示される。

【0224】

標識化合物又はそれを含む組成物は、以下の少なくとも1つが満たされる場合に抗癌活性を呈する：

(処置されていないもの若しくは対照で処置されたもの又は処置開始時の対象と比較して)

- － ヒトFAPを発現する腫瘍細胞、癌細胞及び／又はCAFを死滅させることができる、
- － そのような腫瘍細胞又は癌細胞の成長及び／又は増殖を低減又は遅延させることができる。
- － 原発腫瘍又は転移巣のサイズを縮小することができる、
- － 転移及び／又は腫瘍細胞遊走の発生を遅延させることができる、
- － 腫瘍重量又は成長の増加を遅延させることができる、
- － 少なくとも1ヶ月、数ヶ月又はそれを超えて患者の生存期間を延ばすことができる。

【0225】

標識化合物の投与後の生存癌細胞及び／又は生存腫瘍細胞の数が初期の生存癌細胞及び／又は初期の生存腫瘍細胞の数の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満である場合、抗癌活性が同定又は決定され得る。

【0226】

標識化合物の投与後の原発腫瘍のサイズ及び／又は転移巣のサイズが前記原発腫瘍のサイズ及び／又は前記転移巣のサイズの90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満である場合、抗癌活性が同定又は決定されている可能性がある。

【0227】

腫瘍細胞死は、細胞死をインビトロで測定するための分子イメージング剤である放射性標識アネキシンA5の測定及びICHなどの癌患者における非侵襲的な測定によって評価され得る (Schutters K. ら、「Apoptosis」(2010年) ; de Saint-Hubert M. ら、「Methods」第48巻：第178頁、2009年)。ICHは、説明の最後の定義部で定義されている。

【0228】

腫瘍成長は、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%若しくは75%又はそれを超えて阻害され得る。腫瘍成長は、当業者に公知の技術を用いて評価することができる。腫瘍成長は、MRI (磁気共鳴画像法) 又はCT (コンピュータ断層イメージング法) を用いて評価することができる。

【0229】

特定の実施形態では、腫瘍重量増加又は腫瘍成長は、少なくとも20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%若しくは75%又はそれを超えて阻害され得る。腫瘍重量又は腫瘍成長は、当業者に公知の技術を用いて評価することができる。腫瘍成長の検出又は腫瘍細胞の増殖の検出は、グルコース類似体2-[18F]-フルオロ-2-デオキシ-D-グルコース (FDG-PET) 又は[18F]-3-フルオロ-3-デオキシ-L-チミジン (FLT-PET) を用いた陽電子放射断層撮影でグルコース利用の変化を測定することにより、インビボで評価され得る。エクスピボ代替物は、Ki67による腫瘍生検の染色であり得る。

【0230】

10

20

30

40

50

転移の発生及び／又は腫瘍細胞遊走の遅延は、少なくとも1週間、1ヶ月、数ヶ月、1年以上の遅延であり得る。転移の存在は、MRI、CT若しくはエコー検査又は循環腫瘍細胞（CTC）の検出を可能にする技術を用いて評価することができる。後者の試験の例は、末梢血からのCTCのEpCamベースの磁気選別である、CellSearch CTC試験（Veridex）である。

【0231】

特定の実施形態では、腫瘍成長は、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日若しくは1週間、2週間、3週間、1ヶ月、2ヶ月又はそれを超えて遅延又は阻害され得る。特定の実施形態では、転移の発生は、少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月又はそれを超えて遅延する。

10

【0232】

本発明の標識化合物は、ヒトFAPを発現する癌、又は腫瘍細胞、又は転移巣、又はCAFに結合すると、放射線毒性の機序によってその抗癌活性を発揮する。

【0233】

腫瘍細胞、癌細胞、病変、転移巣及び標識化合物の用量は、定義と題したセクションで定義されている。

【0234】

更なる態様では、疾患、及び／又は障害、及び／又は病態の予防及び／又は治療のための方法であって、それを必要とする対象に、抗体フラグメント、好ましくはVHH若しくはそのフラグメント又は本明細書で想定される化合物若しくは標識化合物若しくは組成物を投与することを含む方法が提供される。この方法の全ての特徴は、本明細書で先に定義されている。

20

【0235】

非ヒト哺乳動物

更なる態様では、ヒトFAPを発現を可能にする核酸構築物を含む非ヒト動物が提供される。非ヒト動物は、哺乳動物であり得る。好ましい哺乳動物には、マウス、ラット、ウサギが含まれる。そのような動物は、当業者に公知の一般的な知識技術を用いて得ることができる。一実施形態では、そのような非ヒト動物は、その内因性FAPをもはや発現しないように改変され得る。一実施形態では、非ヒト動物の内因性FAPは、ヒトFAP遺伝子によって置き換えられている。ヒトFAPコード核酸は、配列番号25によって表される。この遺伝子の置き換えは、当業者に公知の相同組換えによって行うことができる。一実施形態では、使用されるターゲティングベクターは、配列番号27を含む。好ましい実施形態では、非ヒト動物は、マウスであり、配列番号27を含むターゲティングベクターは、当業者に公知の技術を用いて導入されている。得られたマウスは、もはやマウスFAPを発現せず、代わりにヒトFAPを発現する。一実施形態では、マウスは、実施例2に記載されるように得られている。一実施形態では、ヒトFAPの発現は、本発明の標識化合物によって前記非ヒト動物において評価される。代わりに、それは、ヒトFAPに特異的であることが知られている他の抗体又は抗体フラグメント、例えば市販のマウス抗ヒト線維芽細胞活性化タンパク質アルファAPCコンジュゲート化抗体など（R&D Systems、FAB3715A）を用いて評価することができる。ヒトFAPの発現がこの非ヒト動物において検証されたら、この発現を使用して、本発明の抗体フラグメント、化合物又は標識化合物の機能性を評価することができる。したがって、この非ヒト動物は、ヒトFAPに特異的に結合する分子をスクリーニングするための方法において、好ましくは本発明の新規な抗体フラグメント又は化合物で使用され得る。

30

40

【0236】

定義

以下の用語又は定義は、単に本発明の理解を促進するために提供される。本明細書で具体的に定義されない限り、本明細書で使われる全ての用語は、本発明の当業者にとって同じ意味を有する。専門家は、当技術分野の定義及び用語について、特にSambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual

50

l」第2版、Cold Spring Harbor Press、Plainview、New York (1989年)；及びAusubelら「Current Protocols in Molecular Biology」(補足47)、John Wiley & Sons、New York (1999年)を参照されたい。本明細書で提供される定義は、当業者によって理解される範囲よりも小さい範囲を有すると解釈されるべきではない。

【0237】

特に示されていない限り、具体的に詳細に記載されていない全ての方法、工程、技術及び操作は、当業者に明らかであるように、それ自体が公知の様式で実行することができ、且つ実行されている。例えば、標準的なハンドブック、上記で参照された一般的な背景技術及びそこに引用されている更なる参考文献が再び参照される。

10

【0238】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(a)」及び「その」は、文脈上他に明確に指示されない限り、単数及び複数の指示対象の両方を含む。

【0239】

本明細書で使用される「含んでいる」、「含む」及び「構成される」という用語は、「包含している」、「包含する」又は「含有している」、「含有する」と同義であり、且つ包括的又は非限定的であり、追加の列举されていない部材、要素又は方法工程を除外しない。生成物又は組成物(「から本質的になる生成物」又は「から本質的になる組成物」)に関連して使用される「から本質的になる」という表現は、追加の分子が存在し得るが、そのような分子が前記製品又は組成物の特徴/活性/機能性を、変化/改変させないことを意味する。例えば、組成物自体が抗体フラグメントの1つと同様の特徴/活性/機能性を呈する場合、組成物は、抗体フラグメントから本質的になり得る。

20

【0240】

端点による数値範囲の列举は、それぞれの範囲内に包含される全ての数及び分数並びに列举された端点を含む。

【0241】

パラメータ、量、持続時間などの測定可能な値に言及する場合に本明細書で使用される「約」という用語は、特定の値の+/-10%以下、好ましくは+/-5%以下、より好ましくは+/-1%以下、更により好ましくは+/-0.1%以下の変動を包含することを意味し、そのような変動は、開示された発明において実行するのに好適である場合に限る。修飾語「約」が指す値自体も具体的に且つ好ましくは開示されていることを理解されたい。

30

【0242】

ポリペプチド/核酸分子及び同一性/類似性

本明細書で使用される場合、アミノ酸残基は、それらの完全名によって又は標準的な3文字若しくは1文字のアミノ酸コードに従ってのいずれかで示される。

【0243】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」又は「タンパク質」という用語は、互換的に使用され、且つコードされたアミノ酸及びコードされていないアミノ酸、化学的又は生化学的に修飾又は誘導体化されたアミノ酸並びに改変ペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。「ペプチド」は、通常、最大50アミノ酸の長さを有するアミノ酸のポリマーでもある。ポリペプチド又はペプチドは、アミノ酸配列によって表される。

40

【0244】

本明細書で使用される場合、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、「核酸」という用語は、互換的に使用され、且つデオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド又はそれらのアナログのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。核酸分子は、主にその塩基配列を特徴とする核酸配列によって表される。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有し得、且つ既知又は未知の任意の機能を果たし得る

50

。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子、遺伝子フラグメント、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、制御領域、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ及びプライマが挙げられる。核酸分子は、直鎖状又は環状であり得る。

【0245】

本明細書で使用される場合、「相同性」という用語は、同じ又は異なるタクソンに由来する2つの高分子間、特に2つのポリペプチド又はポリヌクレオチド間の少なくとも二次的な構造的同一性又は類似性を意味し、ここで、前記類似性は、共通の祖先に起因するものである。したがって、「ホモログ」という用語は、前記二次構造類似性及び任意選択的に三次構造類似性を有するそのような関連高分子を示す。2つ以上のヌクレオチド配列を比較するために、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間の「配列同一性（のパーセンテージ）」は、当業者に公知の方法を用いて、例えば第2のヌクレオチド配列の対応する位置のヌクレオチドと同一である第1のヌクレオチド配列のヌクレオチドの数を第1のヌクレオチド配列のヌクレオチドの総数で除算し、100%を乗じるか、又はNCBI Blastなどの配列アラインメントのための公知のコンピュータアルゴリズムを使用することによって計算することができる。2つのアミノ酸配列間の配列類似性の程度を決定する際、当業者は、アミノ酸残基が類似の化学構造の別のアミノ酸残基で置換され、且つポリペプチドの機能、活性又は他の生物学的特性にほとんど又は本質的に影響を及ぼさないアミノ酸置換として一般に記載することができる、いわゆる「保存剤」アミノ酸置換を考慮し得る。可能な保存的アミノ酸置換は、当業者に明らかであろう。アミノ酸配列及び核酸配列は、それらの全長にわたって100%の配列同一性を有する場合、「全く同じ」とであると言われる。

【0246】

本出願を通して、特定のアミノ酸配列の配列番号（例として、配列番号Yをとる）を指すたびに、これは、配列番号Yのアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性又は類似性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドによって置き換え得る。

【0247】

本明細書に記載の各アミノ酸配列は、所与のアミノ酸配列とのその同一性パーセンテージ（少なくとも80%）により、更なる好ましい実施形態では、それぞれ所与のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又はそれを超える同一性を有する。好ましい実施形態では、配列同一性は、本明細書で同定される配列の全長を比較することによって決定される。本明細書に記載の各アミノ酸配列は、所与のアミノ酸配列とのその類似性パーセンテージ（少なくとも81%）により、更なる好ましい実施形態では、それぞれ所与のアミノ酸配列と少なくとも81%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又はそれを超える類似性を有する。好ましい実施形態では、配列類似性は、本明細書で同定される配列の全長を比較することによって決定される。本明細書で別段示されない限り、所与の配列番号との同一性又は類似性は、前記配列の全長（すなわちその全長にわたって又は全体として）に基づく同一性又は類似性を意味する。

【0248】

「配列同一性」は、本明細書では、配列を比較することによって決定される、2つ以上のアミノ酸（ポリペプチド又はタンパク質）配列又は2つ以上の核酸（ポリヌクレオチド）配列間の関係として定義される。2つのアミノ酸配列間の同一性は、好ましくは、本明細書で同定される配列番号全体又はその一部内のそれらの同一性を評価することによって定義される。その一部は、配列番号の長さの少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%を意味し得る。

【0249】

当技術分野では、「同一性」は、そのような配列のストリング間の一致によって決定され得るように、アミノ酸配列間の配列関連性の程度も意味する。2つのアミノ酸配列間の

「類似性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列及びその保存されたアミノ酸置換を第2のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。「同一性」及び「類似性」は、限定するものではないが、「Computational Molecular Biology」、Lesk, A. M. 編、Oxford University Press、New York、1988年；「Biocomputing: Informatics and Genome Projects」、Smith, D. W. 編、Academic Press、New York、1993年；「Computer Analysis of Sequence Data」、第I分、Griffin, A. M. 及びGriffin, H. G. 編、Humana Press、New Jersey、1994年；「Sequence Analysis in Molecular Biology」、von Heine, G.、Academic Press、1987年；及び「Sequence Analysis Primer」、Gribskov, M. 及びDevereux, J. 編、M Stockton Press、New York、1991年；及びCarillo, H. 及びLipman, D.、「SIAM J. Applied Math.」、第48巻：第1073頁（1988年）を含む、公知の方法によって容易に計算することができる。

10

20

30

40

50

【0250】

同一性を決定するための好ましい方法は、試験した配列間で最大のマッチを与えるように設計される。同一性及び類似性を決定する方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムに体系化されている。2つの配列間の同一性及び類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、例えば、GCGプログラムパッケージ（Devereux, J. ら、「Nucleic Acids Research」第12巻（第1号）：第387頁（1984年））、BestFit、FASTA、BLASTN及びBLASTP（Altschul, S. F. ら、「J. Mol. Biol.」第215巻：第403～410頁（1990年））、EMBOSS Needle（Madeira, F. ら、「Nucleic Acids Research」第47巻（第W1号）：第W636～W641頁（2019年））が挙げられる。BLASTプログラムは、NCBI及び他の供給源から公的に入手可能である（「BLAST Manual」、Altschul, S. ら、NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894；Altschul, S. ら、「J. Mol. Biol.」第215巻：第403～410頁（1990年））。EMBOSSプログラムはEMBL-EBIから公的に入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムを使用して同一性を決定することもできる。使用される好ましいプログラムはEMBOSS Needleプログラムである。

【0251】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータには、以下が含まれる：アルゴリズム：Needleman and Wunsch、「J. Mol. Biol.」第48巻（第3号）：第443～453頁（1970年）；比較マトリックス：Henikoff及びHenikoffからのBLOSUM62、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA.」第89巻：第10915～10919頁（1992年）；ギャップ開始ペナルティ（Gap Open Penalty）：10；及びギャップ延長ペナルティ（Gap Extend Penalty）：0.5。これらのパラメータに有用なプログラムは、EMBL-EBIからEMBOSS Needleプログラムとして公開されている。前述のパラメータは、タンパク質のGlobal Pairwise Sequenceアラインメントのデフォルトパラメータである（末端ギャップに対するペナルティなし）。

【0252】

核酸比較のための好ましいパラメータには、以下が含まれる：アルゴリズム：Needleman and Wunsch、「J. Mol. Biol.」第48巻：第443～453頁（1970年）；比較マトリックス：DNAfull；ギャップ開始ペナルティ

：10；ギャップ延長ペナルティ：0.5。これらのパラメータに有用なプログラムは、EMBL-EBIからEMBOSS Needleプログラムとして公開されている。前述のパラメータは、ヌクレオチド配列のGlobal Pairwise Sequenceアラインメントのデフォルトパラメータである（末端ギャップに対するペナルティなし）。

【0253】

任意選択的に、アミノ酸類似性の程度を決定する際、当業者に明らかなように、当業者は、いわゆる「保存剤」アミノ酸置換も考慮し得る。保存的アミノ酸置換は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンである。脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリン及びスレオニンである。アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン及びグルタミンである。芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンである。塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン及びヒスチジンである。酸性側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン酸及びグルタミン酸である。硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システイン及びメチオニンである。天然に存在するアミノ酸の各々に対する好ましい保存的置換は、以下の通りである：Ala~Ser；Arg~Lys又はGln；Asn~Asp、His又はSer；Asp~Glu又はAsn；Gln~Glu、Lys又はArg；Glu~Lys、Asp、Gln；His~Tyr又はAsn；Ile~Leu、Val又はMet；Leu~Ile、Met又はVal；Lys~Arg、Gln又はGlu；Met~Val、Leu又はIle；Phe~Trp又はTyr；Ser~Thr、Ala又はAsn；Thr~Ser；Trp~Tyr又はPhe；Tyr~His、Trp又はPhe；及びVal~Ile、Leu又はMet。本明細書に開示されるアミノ酸配列の置換バリエーションは、開示される配列中の少なくとも1つの残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されたものである。好ましくは、アミノ酸変化は、保存的である。

【0254】

ヒトFAPに対する好適な抗体フラグメントの単離方法

特定の実施形態では、本明細書に開示される抗体フラグメント（好ましくはVHH）又はそのフラグメントは、固形腫瘍及び／又は癌細胞上に存在し、且つ／又は固形腫瘍及び／又は癌細胞に特異的である、ヒト及び／又はマウスFAPに対する親和性選択によって得られる。特定の固形腫瘍抗原又は癌細胞に対する親和性選択によって好適なポリペプチドを得ることは、例えば、抗体フラグメント、好ましくはVHHをその表面（例えば、バクテリオファージ）に発現する細胞のセット、集合体又はライブラリを、腫瘍特異的抗原及び／又は癌細胞特異的抗原に対する結合についてスクリーニングすることによって行われ得る。それらの全ては、本質的に以下の非限定的な工程を含む、それ自体が公知の様式で行われ得る：（a）分枝が潜在的な癌薬物の標的であることが公知である、腫瘍特異的又は癌細胞特異的タンパク質標的分子の単離された溶液又は懸濁液を得ること；（b）前記タンパク質標的分子に対するVHHライブラリからのバイオパンニングファージ又は他の細胞；（c）腫瘍特異的又は癌細胞特異的タンパク質標的分子に結合するファージ又は他の細胞を単離すること；（d）個々の結合ファージ又は他の細胞からVHHインサートをコードするヌクレオチド配列を決定すること；（e）組換えタンパク質発現を用いて、この配列に従った量のVHHを生成すること；（f）前記腫瘍特異的又は癌細胞特異的タンパク質標的分子に対する前記VHHドメインの親和性を決定すること；及び任意選択的は、（g）バイオアッセイにおいて前記VHHドメインの殺腫瘍活性又は抗癌活性を試験すること。VHHドメインと腫瘍特異的又は癌細胞特異的タンパク質標的分子との間の親和性を決定するために、例えばSambrookら（2001年）「Molecular Cloning, A Laboratory Manual.」第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NYに記載されるように、当技術分野で一般的な慣行である酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）又は表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイを含む様々な方

法を使用し得る。平衡解離定数は、ポリペプチドとその標的分子との間の親和性を記述するために一般的に使用される。典型的には、平衡解離定数は、 10^{-7} M未満である。好ましくは、平衡解離定数は、 10^{-8} M未満若しくは 10^{-9} M未満又はより好ましくは 10^{-9} M～ 10^{-12} Mの範囲にわたる。

【0255】

抗体

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体及びそれらのフラグメント、例えばFabF(ab')₂、scFv、VHH及び親抗体の抗原結合機能を保持する他のフラグメントなどを指す。したがって、抗体は、免疫グロブリン若しくは糖タンパク質又はそのフラグメント若しくは部分又は改変免疫グロブリン様フレームワーク内に含まれる抗原結合部分を含む構築物又は非免疫グロブリン様フレームワーク若しくは足場を含む構築物内に含まれる抗原結合部分を指し得る。

10

【0256】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、均一な抗体集団を有する抗体組成物を指す。この用語は、抗体の種又は供給源に関して限定されず、作製される様式によって限定されることも意図されない。この用語は、全免疫グロブリン並びに抗体の抗原結合機能を保持するフラグメント及び他のものを包含する。任意の哺乳動物種のモノクローナル抗体を本発明で使用する事ができる。しかしながら、実際には、モノクローナル抗体を生成するために必要とされるハイブリッド細胞株又はハイブリドーマを作製する際に使用するためのラット又はマウス細胞株の利用可能性のために、抗体は、典型的にはラット又はマウス起源のものである。

20

【0257】

本明細書で使用される場合、「ポリクローナル抗体」という用語は、不均一な抗体集団を有する抗体組成物を指す。ポリクローナル抗体は、免疫化動物又は選択されたヒト由来のプール血清に由来することが多い。

【0258】

本明細書で使用される場合、「抗体又はそのフラグメントの重鎖可変ドメイン」は、(i)ラクダ科動物又はサメ類の重鎖抗体の重鎖の可変ドメインを含むが、これらに限定されない、天然で軽鎖を欠いている重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン（以下でVHHとも示される）、又は(ii)従来の4本鎖抗体の重鎖のラクダ化（本明細書で更に定義）可変ドメイン（以下でラクダ化V_Hとも示される）を含むが、これに限定されない、従来の4本鎖抗体の重鎖の可変ドメイン（以下でV_Hとも示される）若しくは限定されないが、腫瘍抗原若しくは癌細胞上に存在する抗原に結合するのに特に適しており、且つ及び本明細書に開示されるVHH（若しくは本明細書に開示されるVHHのCDR配列に基づく及び／若しくは由来し得る）に存在し、且つ／若しくはこれに組み込まれ得るアミノ酸残基（すなわち小ペプチド）の1つ以上のストレッチなど、その任意のフラグメントを意味する。一実施形態では、VHHのフラグメントは、機能的フラグメントである。

30

【0259】

本明細書で以下に更に記載されるように、抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列及び構造は、それに限定されるものではないが、当技術分野及び本明細書において以下でそれぞれ「フレームワーク領域1」若しくは「FR1」；「フレームワーク領域2」若しくは「FR2」；「フレームワーク領域3」若しくは「FR3」；及び「フレームワーク領域4」若しくは「FR4」と称される4つのフレームワーク領域又は「FR」から構成されることができ、これらのフレームワーク領域は、当技術分野においてそれぞれ「相補性決定領域1」若しくは「CDR1」；「相補性決定領域2」若しくは「CDR2」；及び「相補性決定領域3」若しくは「CDR3」と称される3つの相補性決定領域又は「CDR」によって中断されている。

40

【0260】

本明細書で使用される場合、抗体に関連して、「相補性決定領域」又は「CDR」とい

50

う用語は、H（重）鎖又はL（軽）鎖（それぞれV_H及びV_Lとも略される）のいずれかの可変領域を指し、且つ抗原標的に特異的に結合することができるアミノ酸配列を含む。これらのCDR領域は、特定の抗原決定基構造に対する抗体の基本的な特異性を説明する。このような領域は、「超可変領域」とも称される。CDRは、可変領域内のアミノ酸の不連続なストレッチを表すが、種にかかわらず、可変重鎖及び可変軽鎖領域内のこれらの重要なアミノ酸配列の位置配置は、可変鎖のアミノ酸配列内に同様の配置を有することが分かっている。全てのモノクローナルな抗体の可変重鎖及び可変軽鎖は、各3つのCDR領域を有し、それぞれの軽鎖（L）及び重鎖（H）について、各々が他のCDR領域と不連続である（L₁、L₂、L₃、H₁、H₂、H₃と称される）。

【0261】

本明細書において以下で更に記載されるように、抗体の重鎖可変ドメイン（V_HH又はV_Hを含む）におけるアミノ酸残基の総数は、110～130の領域でもあり得る。しかしながら、抗体の重鎖可変ドメインの部分、フラグメント又はアナログは、そのような部分、フラグメント又はアナログが、これらの部分、フラグメント若しくはアナログが由来する抗体の元の重鎖可変ドメインの機能的活性（の少なくとも一部）を保持し、且つ／又は結合特異性（の少なくとも一部）を保持する限り、それらの長さ及び／又はサイズに関して特に限定されないことに留意すべきである。これらの部分、フラグメント若しくはアナログが由来する抗体の元の重鎖可変ドメインの機能的活性（の少なくとも一部）を保持し、且つ／又は結合特異性（の少なくとも一部）を保持する部分、フラグメント又はアナログは、本明細書では、重鎖可変ドメインの「機能的フラグメント」とも更に称される。

【0262】

抗体の可変ドメイン（V_HH又はV_Hを含む）のアミノ酸残基は、好ましくは、記載のIMGT命名法によって与えられるVドメイン（免疫グロブリン及びT細胞受容体）のIMGT固有の番号付けに従って番号付けされる（Lefranc M. P. ら、1997年「Immunology today」第18巻：第509頁、PMID：9386342；Lefranc, M. - P.、1999年「The Immunologist」第7巻：第132～136頁及びLefranc M. P. ら、2003年、「Dev. Comp. Immunol.」第27巻：第55～77頁、PMID：12477501）。この番号付けによれば（例えば、Lefranc（2003年）の表1を参照されたい）、保存されたアミノ酸、例として、システイン23（1st-CYS）、トリプトファン41（CONSERVED-TRP）、疎水性アミノ酸89、システイン104（2nd-CYS）、フェニルアラニン又はトリプトファン118（J-PHE又はJ-TRP）は、常に同じ位置を有する。IMGTの固有の番号付けは、フレームワーク領域（FR1-IMGT：1～26位、FR2-IMGT：39～55位、FR3-IMGT：66～104位及びFR4-IMGT：118～128位）並びに相補性決定領域：CDR1-IMGT：27～38、CDR2-IMGT：56～65及びCDR3-IMGT：105～117の標準化された区切りを提供する。ギャップは非占有位置を表す。CDR1-IMGT及びCDR2-IMGT（それぞれ12及び10アミノ酸長未満）のギャップを、CDR-IMGTループの最上部に置く。再編成されたCDR3-IMGTの塩基長は13アミノ酸（105～117位）であり、これは、15アミノ酸のJUNCTION（J-TRP又はJ-PHE118に対する2nd-CYS104）に対応する。CDR3-IMGTの長さが13アミノ酸未満である場合、ループの上部から、次の順序111、112、110、113、109、114などでギャップが作製される。CDR3-IMGTの長さが13アミノ酸を超える場合、CDR3-IMGTループの上部の111～112位に以下の順序112.1、111.1、112.2、111.2、112.3、111.3などで追加の位置が作製される。

【0263】

これに関して、V_HHドメインについて当技術分野で周知であるように、CDRの各々におけるアミノ酸残基の総数は、変動し得、且つIMGT番号付けによって示されるアミノ酸残基の総数に対応しなくてもよい（すなわちIMGT番号付けによる1つ以上の位置

10

20

30

40

50

が実際の配列に占有されていなくてもよい、又は実際の配列が I M G T 番号付けによって許容される数よりも多くのアミノ酸残基を含み得る）ことに留意すべきである。これは、一般に、I M G T による番号付けが実際の配列中のアミノ酸残基の実際の番号付けに対応しても又はしなくてもよいことを意味する。

【0264】

代わりに、抗体の可変ドメインのアミノ酸残基（V H H 又は V H を含む）は、K a b a t 番号付け（K a b a t ら、1987年、アメリカ国立衛生研究所；1987年、第804頁、発行番号165～462）に従って番号付けすることができる。免疫グロブリン V 領域の I M G T と K a b a t の番号付けの対応は、例えば、L e f r a n c ら（2003年）の表2に見出すことができる。

【0265】

重鎖抗体及びその可変ドメインの一般的な説明については、とりわけ、一般的な背景技術として、M u y l d e r m a n s S. ら（2013年）「Annual Review of Biochemistry」第82巻：第775～797頁を参照されたい。

【0266】

一般に、本明細書で使用される「重鎖可変ドメイン」という用語は、その最も広い意味で、特定の生物学的供給源又は特定の調製方法に限定されないことに留意されたい。例えば、以下により詳細に考察されるように、本明細書に開示されるような重鎖抗体（すなわち V H H ）に由来する重鎖可変ドメインは、（1）天然に存在する重鎖抗体の V H H ドメインを単離することにより；（2）天然に存在する V H H ドメインをコードするヌクレオチド配列の発現により；（3）任意の動物種、特にヒトなどの哺乳動物の種由来の天然に存在する V_H ドメインの「ラクダ化」（以下に記載）若しくはそのようなラクダ化 V_H ドメインをコードする核酸の発現により；（4）W e i z a o C. ら、「Methods Mol Biol」（2009年）第525巻：第81～99頁）に記載の「ドメイン抗体」若しくは「dAb」の「ラクダ化」若しくはそのようなラクダ化 V_H ドメインをコードする核酸の発現により、（5）タンパク質、ポリペプチド若しくは他のアミノ酸配列を調製するための合成若しくは半合成技術を用いて；（6）核酸合成のための技術を用いて V H H をコードする核酸を調製し、続いて、このようにして得られた核酸を発現させることにより；及び／又は（7）上記の任意の組合せにより得ることができる。上記を実行するための好適な方法及び技術は、本明細書の開示に基づいて当業者に明らかであり、例えば本明細書で以下により詳細に説明する方法及び技術を含む。

【0267】

本明細書に開示される単一ドメイン抗体フラグメントなどの抗体フラグメントは、それが生成される宿主細胞及び／又は培地から抽出又は精製されている場合、本明細書で使用される「（～において）本質的に単離された（形態）」と見なされる。

【0268】

抗体フラグメントのバリエーション

本発明は、本発明の抗体フラグメント、好ましくは V H H 配列又はそのフラグメント（又はそれらを発現するために使用される本発明のヌクレオチド配列）の起源に関して限定されないことに留意すべきである。更に、本発明は、本明細書に開示される抗体フラグメント、好ましくは V H H 配列又はヌクレオチド配列が産生又は取得された方法に関しても限定されない。したがって、本明細書に開示されるアミノ酸配列は、合成又は半合成のアミノ酸配列、ポリペプチド又はタンパク質であり得る。

【0269】

本発明は、抗体フラグメントの部分、フラグメント、アナログ、突然変異体、バリエーション及び／若しくは誘導体、好ましくは本明細書に開示されるようなヒト F A P 及び／若しくはマウス F A P に特異的に結合する V H H 並びに／又はそのような部分、フラグメント、アナログ、突然変異体、バリエーション及び／若しくは誘導体の1つ以上を含むか若しくはこれらから本質的になるポリペプチドも、これらの部分、フラグメント、アナログ、突然変異体、バリエーション及び／又は誘導体が本明細書で想定される目的のために好適である限

り（FAPを発現する細胞、組織又は器官、それに連結され、且つ放射性核種に連結される場合には診断用途及び治療用途で利用されるために好適である分子を送達する限り）包含する。本発明にかかるそのような部分、フラグメント、アナログ、突然変異体、バリエーション及び／又は誘導体は、

- － ヒト及び／又はマウスFAP、好ましくは両方のFAPに特異的に結合し、
- － 好ましくはFAPのモジュレータではなく、好ましくはFAPの阻害剤ではない。

【0270】

例えば、本発明は、本明細書でCDR配列又は抗体フラグメントの一部とも称され、且つ配列番号1、2、3として同定される、アミノ酸残基（すなわち小ペプチド）のいくつかのストレッチ、例えばヒト及び／又はマウスFAPへの結合に特に適している抗体フラグメント又はその一部の配列、好ましくは本明細書に開示されるようなVHHの配列を表す配列番号4と少なくとも80%の同一性を有する配列などを提供する。

10

【0271】

例えば、本発明は、本明細書でCDR配列又は抗体フラグメントの一部とも称され、且つ配列番号5、6、7として同定される、アミノ酸残基（すなわち小ペプチド）のいくつかのストレッチ、例えばヒト及び／又はマウスFAPへの結合に特に適している抗体フラグメント又はその一部の配列、好ましくは本明細書に開示されるようなVHHの配列を表す配列番号8と少なくとも80%の同一性を有する配列などを提供する。

【0272】

例えば、本発明は、本明細書でCDR配列又は抗体フラグメントの一部とも称され、且つ配列番号9、10、11として同定される、アミノ酸残基（すなわち小ペプチド）のいくつかのストレッチ、例えばヒト及び／又はマウスFAPへの結合に特に適している抗体フラグメント又はその一部の配列、好ましくは本明細書に開示されるようなVHHの配列を表す配列番号12と少なくとも80%の同一性を有する配列などを提供する。

20

【0273】

例えば、本発明は、本明細書でCDR配列又は抗体フラグメントの一部とも称され、且つ配列番号13、14、15として同定される、アミノ酸残基（すなわち小ペプチド）のいくつかのストレッチ、例えばヒト及び／又はマウスFAPへの結合に特に適している抗体フラグメント又はその一部の配列、好ましくは本明細書に開示されるようなVHHの配列を表す配列番号16と少なくとも80%の同一性を有する配列などを提供する。

30

【0274】

これらのストレッチは、抗体フラグメント、好ましくは本明細書に開示されるVHHの機能的フラグメントであると思われ、且つ本明細書に開示されるVHH若しくは化合物若しくは標識化合物などであるが、これらに限定されない任意の好適な足場（タンパク質）中に存在し、且つ／又はそれらに組み込まれ得、特にそれらがその好適な足場又はVHHの抗原結合部位（の一部）を形成するようにする。しかしながら、本発明は、その最も広い意味において、これらのアミノ酸残基のストレッチが、本明細書に開示されるようなこれらの足場又は抗体フラグメント（好ましくはVHH）がヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合することを可能にする限り、これらのアミノ酸残基のストレッチが、本明細書に開示されるような足場又は抗体フラグメント（好ましくはVHH）において有し得る特定の構造的役割又は機能に限定されないことが注目されるべきである。

40

【0275】

抗体フラグメントの更なる翻訳後構造特性評価

特定の態様では、本明細書に開示されるようなヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメント、好ましくはVHHドメイン又はそのフラグメントは、任意選択的に、1つ以上の更なる基、部分構造又は残基に1つ以上のリンカーを介して連結され得る。これらの1つ以上の更なる基、部分構造又は残基は、目的の他の標的への結合に役立ち得る。そのような更なる基、残基、部分構造及び／又は結合部位は、本明細書に開示される抗体フラグメントに更なる機能性を提供しても又はしなくてもよく、且つ本明細書に開示される抗体フラグメントの特性を改変しても又はしなくてもよいことが明らかな

50

ずである。そのような基、残基、部分構造又は結合単位は、例えば、生物学的に活性であり得る化学基でもあり得る。

【0276】

これらの基、部分構造又は残基は、特定の実施形態では、重鎖可変ドメインにN末端又はC末端に連結されており、特にC末端に連結されている。

【0277】

特定の実施形態では、抗体フラグメント、好ましくは本明細書に開示されるようなヒトFAP抗原及び／又はマウスFAP抗原に特異的に結合するVHHドメイン又はフラグメントも化学的に改変され得る。例えば、そのような改変は、抗体フラグメント、好ましくはVHHドメインへの又はその上への、1つ以上の官能基、残基又は部分構造の導入又は連結を含み得る。これらの基、残基又は部分構造は、抗体フラグメント、好ましくはVHHドメインに1つ以上の所望の特性又は官能性を付与し得る。そのような官能基の例は、当業者に明らかであろう。

10

【0278】

例えば、そのような官能基の抗体フラグメント、好ましくはVHHドメイン又はそのフラグメントへの導入又は連結は、それらの溶解性及び／若しくは安定性の増加、それらの毒性の低減又は任意の望ましくない副作用の排除若しくは減弱並びに／又は他の有利な特性をもたらし得る。

【0279】

特定の実施形態では、1つ以上の基、残基又は部分構造は、1つ以上の好適なリンカー又はスペーサを介して、抗体フラグメント、好ましくはVHHドメイン又はそのフラグメントに連結される。

20

【0280】

本明細書に開示される、VHH又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントの2つ以上の結合部位の全てがヒト及び／又はマウスFAPのアミノ酸残基の同じ部位、決定基、部分構造、エピトープ、ドメイン又はストレッチに対して向けられるか又はそれらに特異的に結合する場合、本明細書に開示されるような抗体フラグメントは、「二価」（単ドメイン抗体フラグメントにおける2つの結合部位の場合）又は多価（単ドメイン抗体フラグメントにおける2つを超える結合部位の場合）、例えば三価などであると言われる。

【0281】

一実施形態では、抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグメントは、一価形式で存在する。

30

【0282】

本明細書で使用される場合、VHH又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントを指す場合の「一価」という用語は、モノマー形態の抗体フラグメントを示す。一価抗体フラグメントは、1つの結合部位のみを含有する。これに関連して、VHH又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントの結合部位は、ヒト及び／又はマウスFAPのアミノ酸残基の特定の部位、決定基、部分構造、エピトープ、ドメイン又はストレッチに対して向けられるか又はそれらに特異的に結合する、抗体フラグメントの配列番号1、2及び／若しくは3によって表される1つ以上の「相補性決定領域」又は「CDR」並びに／又は抗配列番号4と少なくとも80%の同一性を有するとして本明細書で同定される1つ以上の領域を包含する。

40

【0283】

特に好ましい実施形態では、本発明は、抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのモノマー形態のフラグメント、すなわち1つのVHHドメインのみを含む抗体フラグメントを提供する。このような分子の小さいサイズは、治療／診断用途にとって魅力的である。特定の用途では、最適な治療効果に達するために高い組織浸透が必要な場合、そのような小さいサイズも魅力的であり得る。

【0284】

しかしながら、代替的な実施形態では、本発明は、二価（又は多価）又は二重特異性又

50

は（多重特異性）ポリペプチドをもたらす抗体フラグメント、好ましくはV H H又は2つ以上の同一又は異なるV H Hドメインを含むフラグメントも提供する。

【0285】

抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントは、そのモノマー形態、特に代替の実施形態で存在し得るが、抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントの2つ以上は、互いに連結されるか又は相互接続され得る。特定の実施形態では、2つ以上の抗体フラグメント、好ましくは2つ以上のV H H又はそのフラグメントは、1つ以上の好適なリンカー又はスペーサを介して互いに連結される。本明細書に開示されるようなそのような抗体フラグメントのカップリングに使用するための好適なスペーサ又はリンカーは、当業者に明らかであり、一般にペプチド及び／又はタンパク質を連結するために当技術分野で使用される任意のリンカー又はスペーサであり得る。

10

【0286】

いくつかの特に好適なリンカー又はスペーサとしては、例えば、ポリペプチドリンカー、例えばグリシンリンカー、セリンリンカー、混合グリシン／セリンリンカー、グリシン及びセリンに富むリンカーなど、又は大部分が極性のポリペプチドフラグメントから構成されるリンカー又はホモ若しくはヘテロ二官能性の化学架橋化合物、例えばグルタルアルデヒド又は任意選択的にP E G間隔のマレイミド若しくはN H Sエステルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0287】

例えば、ポリペプチドリンカー又はスペーサは、1～50アミノ酸、例えば1～30、特に1～10アミノ酸残基などの長さを有する好適なアミノ酸配列であり得る。リンカーの長さ、可撓性の程度及び／又は他の特性は、抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントの特性（腫瘍標的又は癌細胞上の標的に対する親和性、特異性又は結合活性が含まれるが、これらに限定されない）又は薬理学的挙動に何らかの影響を及ぼし得ることが明らかなはずである。2つ以上のリンカーを使用する場合、これらのリンカーは、同じであるか又は異なり得ることが明らかである。本発明に関連して及びその開示において、当業者は、一切の過度の実験的負担なしに、本明細書に開示される抗体フラグメント、好ましくはV H H又はそのフラグメントをカップリングする目的のための最適なリンカーを決定することができるであろう。

20

【0288】

本明細書で使用される場合、V H H又はその機能的フラグメントなどの抗体フラグメントを指す場合の「非タグ付け」という用語は、外来性ポリペプチド配列を含まない（例えば、抗体フラグメント、好ましくはV H H配列又は好ましくは医薬品に連結された及び／若しくは本明細書に記載の放射性同位体で標識されたそのフラグメントのみを含有）抗体フラグメントを示す。例示的な外来性ポリペプチド配列には、カルボキシ末端ポリペプチドタグ、例えばH i sタグ、システイン含有タグ（例えば、P r u s z y n s k iら（2013年）「N u c l M e d B i o l」第40巻：第52～59頁）及び／又はM y cタグが含まれる。H i sタグは、4、5、6、7、8、9、10個のヒスチジンを含有し得る。一実施形態では、6個のヒスチジンが存在する。

30

【0289】

一実施形態では、存在し得る1つ以上の基、残基又は部分構造はまた、本明細書に開示される抗体フラグメント、好ましくはV H H又はその機能的フラグメントの二量体化などの多量体化を誘導しない。

40

【0290】

したがって、一実施形態では、V H H又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントは、二量体化などの多量体化を誘導するタグを欠いており、好ましくはシステイン含有タグ、好ましくはG G Cタグを欠いている。

【0291】

したがって、一実施形態では、V H Hなどの抗体フラグメント又はそのフラグメントは、カルボキシ末端ポリペプチドタグを欠いており、好ましくはタグ付けされていない。

50

【0292】

有利には、Hisタグ付け及びMyc-Hisタグ付け抗体フラグメントなどのポリペプチドタグ付けと比較して、カルボキシ末端ポリペプチドタグのない抗体フラグメントを用いた場合、腎臓保持が有意に減少することが示された（D' Hu y v e t t e rら（2014年）、「Ther an o s t i c s .」第4巻（第7号）：第708～20頁）。

【0293】

本明細書に開示されるVHHなどの抗体フラグメントに言及する場合の「二重特異性」という用語は、（a）本明細書に開示されるような抗体フラグメントの2つ以上の結合部位が、ヒトFAP及び／若しくはマウスFAPに対して向けられるものであるか若しくはヒトFAP及び／若しくはマウスFAPに特異的に結合するが、ヒトFAP及び／若しくはマウスFAPの同じ部位、決定基、部分、エピトープ、ドメイン若しくはアミノ酸残基のストレッチに対するものではなく（すなわち異なる）、本明細書で開示された抗体フラグメントは、「二重特異性」（抗体フラグメント上の2つの結合部位の場合若しくは多重特異性（抗体フラグメント上の3つ以上の結合部位の場合）と言われること、又は（b）本明細書に開示されている抗体フラグメントの2つ以上の結合部位は、目的の異なる標的分子に対して向けられるか若しくはこれに特異的に結合することのいずれかを暗示する。

「多重特異性」という用語は、本明細書に開示される抗体フラグメント上に3つ以上の結合部位が存在する場合に使用される。

【0294】

したがって、本明細書で使用される「二重特異性」VHHなどの「二重特異性」抗体フラグメント又は「多重特異性」VHHなどの「多重特異性」抗体フラグメントは、それぞれ2つ又は少なくとも2つの結合部位を含む本明細書に開示されるVHHなどの抗体フラグメントの意味を有するものとし、これらの2つ以上の結合部位は、異なる結合特異性を有する。したがって、本明細書に開示されるVHHなどの抗体フラグメントは、それぞれ2つ又は3つ以上の異なる結合領域が同じモノマー抗体フラグメントに存在する場合、「二重特異性」又は「多重特異性」と見なされる。

【0295】

本明細書に開示される抗体フラグメント（特にVHH又はそのフラグメントなど）の「半減期」は、一般に、本明細書に開示される抗体フラグメントのインビボ血清濃度が50%低下するのに必要な時間と定義することができる。本明細書に開示される抗体フラグメントのインビボ半減期は、薬物動態分析などの当業者に公知の任意の様式で決定することができる。当業者に明らかなように、半減期は、 $t_{1/2}$ -アルファ、 $t_{1/2}$ -ベータ及び曲線下面積（AUC）などのパラメータを用いて表すことができる。インビボでの半減期の増加は、一般に、パラメータ $t_{1/2}$ -アルファ、 $t_{1/2}$ -ベータ及び曲線下面積（AUC）の1つ以上、好ましくは3つ全ての増加を特徴とする。

【0296】

本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなどの抗体フラグメントに言及する場合の「寿命延長」という用語は、抗体フラグメントの半減期を延長するように抗体フラグメントが改変されていることを示すために使用される。抗体及び抗体フラグメントの半減期を延長するための戦略は当技術分野で周知であり、例えばポリエチレングリコール（PEG）又はウシ血清アルブミン（BSA）若しくはヒト血清アルブミン（HSA）などの半減期を延長する1つ以上の基又は部分構造、抗体Fcフラグメント又は血清アルブミンなどの血清タンパク質を標的とする抗原結合抗体フラグメントへの（化学的又はその他の）連結が含まれるが、これらに限定されない。

【0297】

したがって、一実施形態では、VHHなどの抗体フラグメント又はその機能的フラグメントは、非寿命延長である。

【0298】

抗体フラグメントをコードする核酸分子

更なる態様では、本発明は、本明細書で定義される抗体フラグメント、好ましくはVH

H又はその好適なフラグメントをコードする核酸配列によって表される核酸分子を提供する。

【0299】

一実施形態では、この核酸分子は、配列番号33～36のいずれかと少なくとも80%の同一性を有する核酸配列を含むか、それからなるか又はそれから本質的になる核酸配列によって表される。好ましくは、同一性は、少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%である。同一性は、通常、前記配列番号の全長にわたって評価される。しかしながら、本明細書で定義される前記配列番号の一部にわたって同一性が評価されることは排除されない。

10

【0300】

これらの核酸配列は、ベクター又は遺伝子構築物又はポリヌクレオチドの形態でもあり得る。本明細書に開示される核酸配列は、合成若しくは半合成配列、ライブラリ（特に発現ライブラリ）から単離されたヌクレオチド配列、重複プライマを用いてPCRによって調製されたヌクレオチド配列又はそれ自体が公知であるDNA合成のための技術を用いて調製されたヌクレオチド配列であり得る。

【0301】

20

30

40

50

【表 5】

表 4: 抗体フラグメントをコードする核酸分子

VHH	配列番号	DNA 配列	配列番号への変換:
B1	33	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCA GCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTG GAAGGCTCTCCAGTAGCAATTCCATGGCCTGGTATCGC CAGGTTCCAGGGAAGCGTCGCGAGTTGGTCGCGGGAAT TACTGGTGGTGGTGGAGACAACTATGCAGACTTCGTGG GTGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC GGGCTGTATCTGCAATTGAACGGCCTGAAACCTGAGGA CACGGCCGCTATTATTGTAATTCTGGCCCCCACTTAT CAACTACTGGGGCCAAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCT CA	4
B2	34	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCA GGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTTCTG GAAGCATCTCCAGTGCCAATAGCATGGGCTGGTACCGC CAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGACGTGGTCGCAGGTC TTACTACTGGTGGTAGGAGTCACTATGCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC ACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAGCAGAGGA CACGGCCGTCTATTACTGTAATTTGTGGCCGCCGGTTCA GGGCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCC TCA	8
B3	35	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCA GGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTG GAAGACTCTTCAGTACCAATGCCATGGGCTGGTACCGC CAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGGCA TTACTGGTGGTGATAGATCAAATATGCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGGCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGAC ACGGCCGTCTATTACTGTAATTTCTACCCGCCTATTGTG GGTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTC CTCA	12
B4	36	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GGTTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTG GATTCACCTTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGTAT TTATGCTGACGGTGATATGACATACTATGCAGACTCCGT GAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGATCCCCTCCCC CCTATCATGTAAACCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCT CA	16

10

20

30

40

【0302】

構築物、ベクター、宿主細胞

本明細書に開示される遺伝子構築物は、DNA又はRNAであり得、好ましくは二本鎖DNAである。本発明の遺伝子構築物は、意図された宿主細胞又は宿主生物の形質転換に好適な形態、意図された宿主細胞のゲノムDNAへの組込みに好適な形態又は意図された宿主生物における独立した複製、維持及び／若しくは遺伝に好適な形態でもあり得る。例としては、本発明の遺伝子構築物は、例えば、プラスミド、コスミド、YAC、ウイルスベクター又はトランスポゾンなどのベクターの形態であり得る。特に、ベクターは、発現ベクター、すなわちインビトロ及び／又はインビボ（例えば、好適な宿主細胞、宿主生物

50

及び／又は発現系における）の発現を提供することができるベクターであり得る。

【0303】

したがって、別の更なる態様では、本発明は、本明細書に開示される1つ以上の核酸配列を含むベクターも提供する。

【0304】

なお更なる態様では、本発明は、本明細書に開示される1つ以上の核酸配列、したがって1つ以上のアミノ酸配列を含み、且つ好ましくは発現するか又は発現することができる宿主、又は宿主細胞、又は細胞を提供する。宿主又は宿主細胞の好適な例は、当業者に明らかであろう。

【0305】

抗体フラグメントの生成方法及び製造方法

本発明は更に、抗体フラグメント（特にVHH又はそのフラグメントなど）並びにこれら及び宿主細胞をコードする核酸、これらの抗体フラグメント、特にVHH又はそのフラグメントなどを含む生成物及び組成物を、調製又は産生する方法を提供する。そのような方法のいくつかの好ましいが、非限定的な例は、本明細書の更なる説明から明らかになるであろう。

【0306】

当業者に明らかのように、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）を調製するための1つの特に有用な方法は、一般に、以下の工程を含む：

（a）抗体フラグメント、特に本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなどをコードするヌクレオチド配列を発現させること、及び

（b）任意選択的に、前記抗体フラグメントを単離及び／又は精製すること。

【0307】

抗体フラグメントをコードする核酸はベクター又は遺伝子構築物に含まれ得る。

【0308】

本明細書で想定される特定の実施形態では、抗体フラグメント（特にVHH又はそのフラグメントなど）は、VHH配列のランダムなライブラリを産生することと、ヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合することができるVHH配列についてこのライブラリをスクリーニングすることとを伴う方法によって得ることができる。

【0309】

したがって、特定の実施形態では、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）を調製するための方法は、以下の工程を含む：

（a）VHHドメインのアミノ酸配列のセット、集合体又はライブラリを提供すること；及び

（b）ヒトFAP及び／若しくはマウスFAPに結合することができるアミノ酸配列及び／又はヒトFAP及び／若しくはマウスFAPに対する親和性を有することができるアミノ酸配列について、アミノ酸配列の前記セット、集合体又はライブラリをスクリーニングすること、及び

（c）ヒト及び／又はマウスFAPに結合し得、且つ／又はヒトFAP及び／若しくはマウスFAPに対する親和性を有し得るアミノ酸配列を単離すること。

【0310】

そのような方法では、VHH配列のセット、集合体又はライブラリは、アミノ酸配列の任意の好適なセット、集合体又はライブラリであり得る。例えば、アミノ酸配列のセット、集合体又はライブラリは、免疫グロブリンフラグメント配列（本明細書に記載）のセット、集合体又はライブラリ、例えば免疫グロブリンフラグメント配列のナイーブセット、集合体又はライブラリ（免疫グロブリンフラグメント配列の合成若しくは半合成セット、集合体若しくはライブラリ；及び／又は親和性成熟に供された免疫グロブリンフラグメント配列のセット、集合体若しくはライブラリ）などであり得る。

【0311】

10

20

30

40

50

この方法の特定の実施形態では、V H H 配列のセット、集合体又はライブラリは、免疫グロブリンフラグメント配列の免疫セット、集合体又はライブラリであり得、例えばヒト F A P 及び／若しくはマウス F A P 又はそれらに基づく若しくはそれらに由来する好適な抗原決定基（例えば、その抗原性部分、フラグメント、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープなど）で好適に免疫化された哺乳動物に由来する免疫グロブリンフラグメント配列の免疫セット、集合体又はライブラリであり得る。特定の一態様では、前記抗原決定基は、細胞外部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープであり得る。

【0312】

上記の方法において、V H H 配列のセット、集合体又はライブラリは、例えば、スクリーニングを容易にするために、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物（酵母など）上に提示され得る。（集合、集合体又はライブラリ）アミノ酸配列を表示及びスクリーニングするための好適な方法、技術及び宿主生物は、例えば、本明細書の更なる開示に基づいて当業者に明らかであろう。「H o o g e n b o o m i n N a t u r e B i o t e c h n o l o g y」第23巻第9号第1105～1116頁（2005年）による総説も参照されたい。

10

【0313】

他の実施形態では、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるV H H 又はそのフラグメントなど）を産生する方法は、少なくとも以下の工程を含む：

（a）V H H ドメインアミノ酸配列を発現する細胞の集合体又は試料を提供すること；
（b）ヒト F A P 及び／若しくはマウス F A P に結合し得、且つ／又はこれらに対する親和性を有し得るアミノ酸配列を発現する細胞について、細胞の前記集合体又は試料をスクリーニングすること；及び

20

（c）（i）前記アミノ酸配列を単離すること；又は（i i）前記細胞から前記アミノ酸配列をコードする核酸配列を単離し、続いて前記アミノ酸配列を発現させることのいずれか。

【0314】

細胞の集合体又は試料は、例えば、B細胞の集合体又は試料であり得る。この方法において、細胞の試料は、ヒト F A P 及び／若しくはマウス F A P 又はそれらに基づく若しくはそれらに由来する好適な抗原決定基（例えば、その抗原性部分、フラグメント、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープなど）で好適に免疫化された哺乳動物にも由来し得る。特定の一実施形態では、抗原決定基は、細胞外部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープであり得る。

30

【0315】

他の実施形態では、抗体フラグメント（特にヒト及び／又はマウス F A P に対する、本明細書に開示されるようなV H H 又はそのフラグメントなど）を産生するための方法は、少なくとも以下の工程を含み得る：

（a）V H H ドメインアミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、集合体又はライブラリを提供すること；

（b）ヒト F A P 及び／若しくはマウス F A P に結合することができる並びに／又はこれらに対する親和性を有し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列について、核酸配列の前記セット、集合体又はライブラリをスクリーニングすること；及び

40

（c）前記核酸配列を単離し、続いて前記アミノ酸配列を発現させること。

【0316】

上記の方法において、アミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、集合体又はライブラリは、例えば、免疫グロブリンフラグメント配列のナイーブセット、集合体又はライブラリをコードする核酸配列のセット、集合体又はライブラリ（免疫グロブリンフラグメント配列の合成若しくは半合成のセット、集合体若しくはライブラリをコードする核酸配列のセット、集合体又はライブラリ；及び／又は親和性成熟に供された免疫グロブリンフラグメント配列のセット、集合体若しくはライブラリをコードする核酸配列のセット、集合体若しくはライブラリ）であり得る。

50

【0317】

特に、そのような方法において、核酸配列のセット、集合体又はライブラリは、抗体フラグメント（特にヒト及び／又はマウスFAP（本明細書で定義）に対する本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなど）の抗体フラグメントのセット、集合体又はライブラリをコードする。

【0318】

上記の方法において、ヌクレオチド配列のセット、集合体又はライブラリは、例えば、スクリーニングを容易にするために、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物（酵母など）上に提示され得る。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を表示及びスクリーニングする（セット、集合体又はライブラリ）ための好適な方法、技術並びに宿主生物は、例えば、本明細書の更なる開示に基づいて当業者に明らかであろう。「Hooogenboom in Nature Biotechnology」第23巻第9号第1105～1116頁（2005年）による総説も参照されたい。

【0319】

本発明は、上記の方法又は代替的には上記の方法の1つを含む方法及び前記抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を決定する追加の少なくとも工程によって得ることができる又は得られる抗体フラグメント、特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）と、前記抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなど）を、それ自体が公知の様式において、例えば好適な宿主細胞若しくは宿主生物における発現などによって又は化学合成によって発現又は合成することに関する。

【0320】

いくつかの場合、本明細書で想定されるようなヒト及び／又はマウスFAPに特異的に結合する抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなど）を生成するための方法は、ヒトFAP及び／若しくはマウスFAPに対する検出可能な結合親和性又はこれらに対する検出可能なインビトロ効果を有する、少なくとも1つの抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなど）を、アミノ酸配列ライブラリから単離する工程を更に含む場合がある。

【0321】

これらの方法は、少なくとも1つの抗体フラグメント（特にヒト及び／又はマウスFAPの活性に対する検出可能な結合親和性を又はこれらの活性に対する検出可能なインビトロ効果を有する、本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなど）をコードする配列を増幅する工程を更に含む場合がある。例えば、本明細書に記載の方法の選択工程から得られる特定のアミノ酸配列を示すファージクローンは、宿主細菌の再感染及び成長培地中におけるインキュベーションによって増幅され得る。

【0322】

特定の実施形態では、これらの方法は、ヒト及び／又はマウスFAPに結合することができる、1つ以上のアミノ酸配列の配列を決定することを包含し得る。

【0323】

アミノ酸配列のセット、集合体又はライブラリに含まれる、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）が好適な細胞又はファージ又は粒子に提示される場合、前記細胞又はファージ又は粒子から、そのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を単離することが可能である。このようにして、選択されたアミノ酸配列ライブラリメンバーのヌクレオチド配列を、日常的な配列決定方法によって決定することができる。

【0324】

更なる特定の実施形態では、本明細書で想定される抗体フラグメント（特にVHH又はそのフラグメントなど）を生成する方法は、実際の所望のアミノ酸配列を得るために、好適な条件下における宿主生物中で前記ヌクレオチド配列を発現させる工程を含む。この工程は、当業者に公知の方法によって行うことができる。

【0325】

加えて、得られた抗体フラグメント（特にヒトFAP及び／若しくはマウスFAPの活性についての検出可能な結合親和性を有し、且つ／又はこれらの活性に対する検出可能なインビトロ効果を何ら有しない、本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなど）は、任意選択的にそれらの配列が同定された後、可溶性タンパク質構築物として合成され得る。

【0326】

例としては、上記の方法によって得られるか、得ることができるか又は選択される、本明細書に開示される抗体フラグメント（特にVHH又はそのフラグメントなど）は、当技術分野で公知の組換え又は化学合成方法を用いて合成することができる。上記の方法によって得られるか、得ることができるか又は選択されるアミノ酸配列は、遺伝子工学技術によって生成することもできる。したがって、上記の方法によって得られるか、得ることができるか又は選択される、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるようなVHH又はそのフラグメントなど）を合成するための方法は、宿主細胞を、ヒトFAP及び／若しくはマウスFAPの活性に対する検出可能な結合親和性を有し、且つ／又はこれらの活性に対する検出可能なインビトロ効果を何ら有しないアミノ酸配列をコードする核酸又はベクターで形質転換すること又は感染させることを含む場合がある。したがって、ヒトFAP及び／若しくはマウスFAPの不活性に対して検出可能な結合親和性を有し、且つ／又はこれらの不活性に対して検出可能なインビトロ効果を何ら有しない、本明細書に開示されるような抗体フラグメント（特にVHHなど）又はそのフラグメントを、組換えDNA法によって作製することができる。アミノ酸配列をコードするDNAは、従来の手順を用いて容易に合成することができる。調製されると、DNAは発現ベクターに導入することができ、これは次いで、組換え宿主細胞及び／又はこれらの組換え宿主細胞が存在する培地中のアミノ酸配列の発現を得るために、大腸菌（E. coli）などの宿主細胞又は任意の好適な発現系に形質転換又はトランスフェクトすることができる。

【0327】

タンパク質発現及び精製の当業者に知られているように、好適な発現系を用いて発現ベクターから生成された抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）は、容易な精製のために、例えばHisタグ又は他の配列タグで（典型的には、アミノ酸配列のN末端又はC末端で）タグ付けされ得ることを理解されたい。

【0328】

核酸又はベクターの宿主細胞への形質転換又はトランスフェクションは、リン酸カルシウム-DNA共沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム融合、リポフェクション、プロトプラスト融合、レトロウイルス感染及び生物学を含む、当業者に公知の様々な手段によって達成され得る。

【0329】

所望の重鎖可変ドメイン配列の発現に好適な宿主細胞は、インビトロ又はインビボに位置するかどうかにかかわらず、任意の真核細胞又は原核細胞（例えば、大腸菌（E. coli）、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞及び昆虫細胞などの細菌細胞）であり得る。例えば、宿主細胞はトランスジェニック植物に位置し得る。

【0330】

したがって、本出願は、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）をコードし、且つ好適な条件下においてそれらのアミノ酸配列を発現する核酸配列又はベクターを宿主細胞に形質転換、トランスフェクト又は感染させることを含む、ヒトFAP及び／若しくはマウスFAPの活性に対する検出可能な結合親和性又はこれらの活性に対する検出可能なインビトロ効果を有する、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるVHH又はそのフラグメントなど）を生成するための方法も提供する。

【0331】

更に別の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される医薬組成物を製造する（「又はその生成」は、均等な表現である）方法を更に提供する。

【0332】

特定の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される医薬組成物を生成する方法であって、以下の工程：

- － ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する、少なくとも1つの抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるような V H H 又はそのフラグメントなど）を得ることと、
 - － 前記抗体フラグメント、特に V H H 又はそのフラグメントなどを医薬組成物に製剤化することと
- を少なくとも含む方法を提供する。

【0333】

これらの方法の特定の実施形態では、ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する、少なくとも1つの抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるような V H H 又はそのフラグメントなど）を得る工程は、以下を含む：

- （a）ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する、抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるような V H H 又はそのフラグメントなど）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、及び任意選択的に、
- （b）抗体フラグメント（特に本明細書に開示される V H H 又はそのフラグメントなど）を単離及び／又は精製すること。

【0334】

これらの方法の他の特定の実施形態では、ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する、少なくとも1つの抗体フラグメント（特に本明細書に開示されるような V H H 又はそのフラグメントなど）を得る工程は、以下を含む：

- （a）V H H ドメイン配列又は V H H 配列のフラグメントのセット、集合体又はライブラリを提供すること、
- （b）ヒト F A P 及び／若しくはマウス F A P に特異的に結合する並びに／又はこれらに対する親和性を有する配列について、V H H ドメイン配列又はそのフラグメントの配列の前記セット、集合体又はライブラリをスクリーニングすること、及び任意選択的に、
- （c）ヒト及び／又はマウス F A P に特異的に結合する並びに／又はこれらに対する親和性を有する、V H H 配列又はそのフラグメントの配列を単離すること。

【0335】

抗体フラグメントを標識するためのプロセス

放射性核種をタンパク質に組み込むために利用可能な様々な放射性標識戦略が存在する。放射化学者のための技術の選択は、主に使用される放射性核種に依存する。ヨウ素の放射性同位体は、求電子置換によって分子に直接組み込まれるか、又はコンジュゲーションを介して間接的に組み込まれる能力を有する。他方で、放射性金属は、キレート剤との錯体形成を介して標識される。多くの金属放射性核種は、キレート剤と安定な錯体を形成する能力を有し、したがってタンパク質とのコンジュゲーションを可能にする。ヨウ素核種による放射性標識分子は、薬学的な放射化学において非常に重要である。30を超える異なる同定されたヨウ素同位体があるが、放射性ヨウ素化学で一般的に使用されているのは、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 及び ^{131}I の4つのみである。

【0336】

タンパク質の直接放射性ヨウ素標識は、腫瘍ターゲティング又は癌細胞ターゲティング放射性医薬品の合成のための重要な方法である。一般に、タンパク質放射性ヨウ素標識の2つの基本的なアプローチがある。最も直接的なアプローチは、チロシン残基及びヒスチジン残基における求電子置換を用いた、直接的なタンパク質標識である。放射性ヨウ化物（radioiodide）をその場で酸化して求電子剤 I^+ を作製する。これは、クロロミン T、ヨードゲン（登録商標）及び N-ハロスクシンイミドのような酸化剤を用い

て行われる。産生された求電子剤は、アミノ酸チロシンの電子に富む芳香環を攻撃し、 σ 錯体を形成する。この置換は、 σ 錯体を安定化する電子供与性ヒドロキシル基に起因して、チロシン残基において行われる。タンパク質の標識化は温和な条件下で行わなければならないため、チロシンへのヨウ素の付着は非常に適している。

【0337】

この方法は温和な条件下で行われ、タンパク質の標識化に最適である。しかしながら、これは、タンパク質が接近可能なチロシン又はヒスチジン残基を含有する場合にのみ可能である。

【0338】

コンジュゲーションを介するタンパク質の間接ヨウ素化は、頻繁に使用される代替方法である。このアプローチでは、放射性ヨウ素標識とタンパク質への取り込みの両方を可能にするために、2つの官能基を含有する補欠分子族の適用によってヨウ素が組み込まれる。放射性ヨウ素標識に使用される様々な補欠分子族があるが、最も頻繁に使用されるのは、N-スクシンイミジル-5-[*I]ヨード-3-ピリジンカルボキシル([¹³¹I]SIPC)及びN-スクシンイミジル-3-[*I]-ヨードベンゾエート([*I]SIB)である。両方の活性エステルは、タンパク質のアミノ基にコンジュゲートされ、高いインビボ安定性を呈する。

【0339】

芳香族基のアシル化のための別の補欠分子族は、N-スクシンイミジル-4-グアニジノメチル-3-[I-131]ヨードベンゾエート([I-131]SGMIB)である。

【0340】

本発明の特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物は、N-スクシンイミジル-4-グアニジノメチル-3-[I-131]ヨードベンゾエート([I-131]SGMIB)又はその好適な誘導体若しくはバリエーションを用いて、ヨウ素-131で標識される。

【0341】

放射線療法の詳細なプロトコルは、専門家に容易に利用可能である(「Cancer Radiotherapy: Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine)」、Huddart RA編、Human Press(2002年))。当業者は、疾患の性質及び患者の構成に応じて、好適な投与及び適用スケジュールを決定する方法を知っている。特に、当業者は、用量制限毒性(DLT)をどのように評価するか、及びそれに応じて最大耐量(MTD)をどのように決定するかを知っている。

【0342】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるその標識化合物は、約800mCi未満、例として約150mCi未満など、例として約30mCi未満など、例えば約15mCi未満などの放射線量で投与される。

【0343】

特定の実施形態では、放射性免疫複合体は、放射性核種に応じて、約0.5mCi/mg~約8000mCi/mgなど、例として1mCi/mg~約1500mCi/mgなど、例として1mCi/mg~約300mCi/mgなど、例として1mCi/mg~約150mCi/mgなどの比活性を有し、静脈内、腹腔内又は髄腔内経路などの他の経路を介して投与され得る。治療の所望の期間及び有効性に応じて、本明細書に開示される標識化合物は、他の治療薬又は放射線増感剤と組み合わせて、1回又は数回投与され得る。適用される標識化合物の量は、癌腫の正確な性質に依存する。投与当たりの放射能の用量は、有効であるように充分高くなければならないが、用量制限毒性(DLT)未満でなければならない。

【0344】

製剤化／治療／診断における使用

10

20

30

40

50

より更なる態様では、1つ以上の抗体フラグメント、好ましくは本明細書に開示されるVHH若しくはそのフラグメント及び／又は本明細書で想定される核酸配列と、任意選択的に少なくとも1つの許容される担体とを含む組成物が提供される。

【0345】

特定の具体的な実施形態によれば、本明細書で想定される組成物は、少なくとも1つの他の化合物を更に任意選択的に含み得る。

【0346】

本明細書で使用される場合、「スクリーニング用量」又は「バイオマーカ用量」は、治療のための対象を選択するのに充分である本明細書に記載の標識化合物などの薬剤の用量であって、例えば対象の癌細胞又は固形腫瘍に結合し、その後、例えばプラナーガンマカメライメージング、単一光子放射形コンピュータ断層撮影法又は陽電子放射断層撮影法などのガンマカメライメージングを用いて対象をイメージングすることにより、任意選択的にX線イメージング、コンピュータ断層撮影法及び／又は磁気共鳴イメージングなどの非核イメージング技術と組み合わせて、癌細胞又は固形腫瘍の位置で検出され得る用量などである。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量は、治療上有効ではない用量である。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量は、本明細書に記載の治療用量とは異なる（例えば、これより低い）。

【0347】

本明細書で使用される場合、「治療用量」とは、そのような治療を必要とする対象（例えば、癌を有する対象）の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又は少なくとも50%において、治療上有効である、本明細書に記載の標識化合物などの薬剤の用量である。いくつかの実施形態では、治療用量は、本明細書に記載のスクリーニング用量よりも高い。

【0348】

本明細書で使用される場合、「対象のイメージング」とは、本明細書に記載の標識化合物を検出することができる装置を用いて、対象の1つ以上の画像を捕捉することを指す。1つ以上の画像は、画像を（例えば、1つ以上の画像のコントラスト又は輝度を調整することによって）強化するために、コンピュータプログラム及び／又は当業者によって更に変更され得る。本明細書に記載の標識化合物を検出することができる任意の装置、例えばプラナーガンマカメライメージングなどのガンマカメライメージング、単一光子放射形コンピュータ断層撮影若しくは陽電子放射断層撮影のための装置又は核撮像技術をX線撮像、コンピュータ断層撮影法及び／若しくは磁気共鳴撮像などの解剖学的撮像技術と組み合わせることができる装置を使用することが考えられる。例えば、そのような装置は、単一光子放射形コンピュータ断層撮影法／コンピュータ断層撮影法（SPECT／CT）又は陽電子放射形コンピュータ断層撮影／コンピュータ断層撮影（PET／CT）イメージングのための装置であり得る。そのような装置は当技術分野で公知であり、市販されている。

【0349】

いくつかの実施形態では、スクリーニング用量の投与とイメージングによる検出とは、少なくとも約1分、少なくとも約5分、少なくとも約10分、少なくとも約20分、少なくとも約30分、少なくとも約40分、少なくとも約50分、少なくとも約1時間、少なくとも約1.5時間、少なくとも約2時間、少なくとも約3時間、少なくとも約4時間、少なくとも約5時間、少なくとも約6時間、少なくとも約7時間、少なくとも約8時間、少なくとも約9時間、少なくとも約10時間、少なくとも約11時間、少なくとも約12時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日間又は少なくとも約7日間だけ離れている。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量の投与及び検出は、約1時間～約24時間だけ離される。

【0350】

いくつかの実施形態では、スクリーニング用量及び治療用量は、少なくとも約1日、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約4日、少なくとも約5日、少なくとも

約 6 日、少なくとも約 1 週間、少なくとも約 2 週間、少なくとも約 3 週間、少なくとも 1 ヶ月、少なくとも約 2 ヶ月又は少なくとも約 6 ヶ月離れて投与される。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量及び治療用量は、約 1 日～約 6 ヶ月間空けて（例えば、約 1 日～約 2 ヶ月間、約 1 日～約 1 ヶ月間又は約 1 日～約 1 週間空けて）投与される。

【0351】

スクリーニング用量及び治療用量は、各々独立して、全身的、局在的又は局所的などの任意の好適な経路によって投与され得る。例示的な経路には、静脈内、腹腔内及び髄腔内投与が含まれる。利用される特定の経路は、いくつかの実施形態では、疾患の性質（例えば、腫瘍又は癌細胞のタイプ、グレード、位置及びステージなど）及び対象の種類（例えば、種、構成、年齢、性別、体重など）に依存し得る。

10

【0352】

全ての診断及び治療用途のために本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、一般に、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ又はヒツジなどの哺乳動物を指す。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト対象である。いくつかの実施形態では、対象は、癌を有する対象（例えば、癌を有するヒト対象）である。癌を有する対象を同定するための方法には、腫瘍抗原又は他の腫瘍バイオマーカの検出、遺伝子検査、MRI、X線、PET又はSPECTスキャン、生検及びそれらの組合せが含まれる。

【0353】

本明細書で使用される場合、本明細書で使用される「診断」、「予測」及び／又は「予後診断」という用語は、特定の疾患及び／又は障害及び／又は状態を診断、予測及び／又は予後診断することを含み、それにより特定の疾患及び／若しくは障害及び／若しくは病態の発症及び／若しくは存在を予測し、且つ／又は特定の疾患及び／若しくは障害及び／若しくは病態の進行及び／若しくは持続期間を予測し、且つ／又は特定の疾患及び／又は若しくは障害及び／若しくは病態に罹患している患者の治療に対する応答を予測することを含む。

20

【0354】

標識化合物、標識化合物を含む組成物又は提供される診断若しくは治療用途のいずれか 1 つのいくつかの実施形態では、スクリーニング用量（すなわち診断方法で使用）は、治療上有効ではない用量である。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量は、本明細書に記載の治療用量よりも低い（例えば、本明細書に記載の治療用量よりも少なくとも約 10 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 200 倍、少なくとも約 300 倍、少なくとも約 400 倍、少なくとも約 500 倍若しくは少なくとも約 1000 倍低い、又は本明細書に記載の治療用量よりも少なくとも約 10、少なくとも約 20、少なくとも約 30、少なくとも約 40、少なくとも約 50、少なくとも約 60、少なくとも約 70、少なくとも約 80、少なくとも約 90、少なくとも約 100、少なくとも約 120、少なくとも約 130、少なくとも約 140、少なくとも約 150、少なくとも約 160、少なくとも約 170、少なくとも約 180、少なくとも約 190、少なくとも約 200、少なくとも約 210、少なくとも約 220、少なくとも約 230、少なくとも約 240、少なくとも約 250、少なくとも約 260、少なくとも約 270、少なくとも約 280、少なくとも約 290、少なくとも約 300、少なくとも約 320、少なくとも約 340、少なくとも約 360、少なくとも約 380、少なくとも約 400、少なくとも約 450、少なくとも約 500、少なくとも約 1000、少なくとも約 5000、少なくとも約 10000、少なくとも約 13000、少なくとも約 15000、少なくとも約 18000 又は少なくとも約 20000 MBq 低い）。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量は、約 10 MBq～約 400 MBq、約 20 MBq～約 400 MBq、約 30 MBq～約 400 MBq、約 40 MBq～約 400 MBq、約 50 MBq～約 400 MBq、約 100 MBq～約 400 MBq、約 200 MBq～約 400 MBq、約 300 MBq～約 400 MBq、約 10 MBq～約 300 MBq、約 20 MBq～約 300 MBq、約 30 MBq～約 30

30

40

50

0 MB q、約 40 MB q～約 300 MB q、約 50 MB q～約 300 MB q、約 100 MB q～約 300 MB q 又は約 200 MB q～約 300 MB q である。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量は、3、約 7 MB q～約 370 MB q である。本明細書に記載の任意のスクリーニング用量は、本明細書に記載の任意の治療用量と組み合わせられ得ることを理解されたい。

【0355】

いくつかの実施形態では、治療用量は、本明細書に記載の治療用量よりも高い（例えば、本明細書に記載のスクリーニング用量よりも少なくとも約 10 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 200 倍、少なくとも約 300 倍、少なくとも約 400 倍、少なくとも約 500 倍若しくは少なくとも約 1000 倍高いか、又は本明細書に記載のスクリーニング用量よりも少なくとも約 10、少なくとも約 20、少なくとも約 30、少なくとも約 40、少なくとも約 50、少なくとも約 60、少なくとも約 70、少なくとも約 80、少なくとも約 90、少なくとも約 100、少なくとも約 120、少なくとも約 130、少なくとも約 140、少なくとも約 150、少なくとも約 160、少なくとも約 170、少なくとも約 180、少なくとも約 190、少なくとも約 200、少なくとも約 210、少なくとも約 220、少なくとも約 230、少なくとも約 240、少なくとも約 250、少なくとも約 260、少なくとも約 270、少なくとも約 280、少なくとも約 290、少なくとも約 300、少なくとも約 320、少なくとも約 340、少なくとも約 360、少なくとも約 380、少なくとも約 400、少なくとも約 450、少なくとも約 500、少なくとも約 1000、少なくとも約 5000、少なくとも約 10000、少なくとも約 13000、少なくとも約 15000、少なくとも約 18000 又は少なくとも約 20000 MB q 高い）。いくつかの実施形態では、治療用量は、約 300 MB q～約 20000 MB q、約 400 MB q～約 20000 MB q、約 500 MB q～約 20000 MB q、約 1000 MB q～約 20000 MB q、約 2000 MB q～約 20000 MB q、約 3000 MB q～約 20000 MB q、約 4000 MB q～約 20000 MB q、約 5000 MB q～約 20000 MB q、約 10000 MB q～約 20000 MB q、約 5000 MB q～約 20000 MB q、約 10000 MB q～約 20000 MB q、約 300 MB q～約 10000 MB q、約 400 MB q～約 10000 MB q、約 500 MB q～約 10000 MB q、約 1000 MB q～約 10000 MB q、約 2000 MB q～約 10000 MB q、約 3000 MB q～約 10000 MB q、約 4000 MB q～約 10000 MB q 又は約 5000 MB q～約 10000 MB q である。提供される方法のいずれか一つのいくつかの実施形態では、治療用量は、約 370 MB q～約 18500 MB q である。

【0356】

スクリーニング用量及び／又は治療用量は、好都合には、単回用量において又は好適な間隔で投与される分割用量（これも下位用量であり得る）として提示され得る。治療用量の投与レジメンは、長期（例えば、少なくとも 2 週間、例えば数ヶ月又は数年）又は毎日の治療を含み得る。いくつかの実施形態では、治療用量の投与レジメンは、1 日 1 回～1 ヶ月に 1 回、例えば 1 日 1 回～2 週間に 1 回など、例えば限定するものではないが、週に 1 回で変動し得る。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、1 回又は数回、また断続的に、例として数日間、数週間又は数ヶ月間にわたって毎日投与され得る。

【0357】

利用される特定のスクリーニング用量及び治療用量は、いくつかの実施形態では、疾患の性質（例えば、癌だけでなく、また腫瘍若しくは癌細胞のタイプ、グレード及びステージなど、又は本明細書で同定される他の疾患のいずれかなど）及び対象のタイプ（例えば、種、構成、年齢、性別、体重など）に依存し得る。

【0358】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の診断及び治療用途のためのキットなどのキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の標識化合

10

20

30

40

50

物のスクリーニング用量及び同じ化合物の治療用量を含む。スクリーニング用量及び治療用量は、本明細書に記載される。

【0359】

キットのいずれか1つのいくつかの実施形態では、キットは、スクリーニング用量及び治療用量を注射するための1つ以上の手段を更に含む。いくつかの実施形態では、スクリーニング用量及び治療用量は、各々、注射手段で個別に収容される。いくつかの実施形態では、注射手段はシリンジである。キットのいずれか1つのいくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の方法（例えば、本明細書に記載されるような対象を層別化及び処置する方法）を実施するための説明書を更に含む。説明書は、任意の好適な形態、例えば印刷形態（例えば、紙又は積層インサート又はラベルとして）又は電子形態（例えば、ディスク又はUSBスティック上）であり得る。

10

【0360】

用量、投与経路、適用スキーム、反復及び治療期間は、一般に、疾患（腫瘍若しくは癌細胞のタイプ、グレード及び病期又は本明細書で更に定義される疾患若しくは病態のタイプ、グレード及び病期）及び患者（構成、年齢、性別など）の性質に依存し、治療に関与する熟練した医療専門家によって決定される。上記の開示された組合せの成分の可能な用量に関して、処置を担当する医療専門家は、用量制限毒性又は他の重篤な副作用が発生するかどうかを慎重に監視し、それらを管理するために必要な工程を行うことが明らかである。

【0361】

一般に、薬学的（診断的及び治療的）使用のために、本明細書で想定される抗体フラグメント、好ましくはVHH又はそのフラグメントを含む（標識された）化合物は、本明細書で想定される（標識された）化合物と、少なくとも1つの薬学的に許容される担体、希釈剤若しくは賦形剤及び／又はアジュバントと、任意選択的に1つ以上の更なる薬学的に活性なポリペプチド及び／若しくは化合物とを含む医薬製剤又は医薬組成物として製剤化され得る。そのような標識化合物又はそれを含む組成物は、腹腔内、静脈内又は髄腔内投与などの他の投与に好適であり得る。したがって、（標識された）化合物及び／又はそれを含む組成物は、例えば、使用される特定の医薬製剤又は組成物に応じて、腫瘍又は癌細胞の位置、種類及び起源に応じて、対象となる組織又は器官に全身的、局在的又は局所的に、好ましくは腹腔内、静脈内又は髄腔内に投与することができる。臨床医は、好適な投与経路及びそのような投与に使用される好適な医薬製剤又は組成物を選択することができる。同じことは、FAPを発現又は過剰発現する細胞、組織又は器官へ医薬品を送達することになる化合物についても当てはまる。

20

30

【0362】

注射又は注入に好適な医薬剤形は、任意選択的にリポソームにカプセル化された滅菌注射液又は注入可能な溶液若しくは分散液の、即時調製に適合した活性成分を含む、滅菌水溶液、又は分散液、又は滅菌粉末を含むことができる。全ての場合において、最終的な剤形は、製造及び貯蔵の条件下で滅菌され、流動性であり、且つ安定でなければならない。液体担体又はビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル及びそれらの好適な混合物を含む溶媒又は液体分散媒であり得る。

40

【0363】

予防及び／又は治療に使用するために本明細書で想定される（標識された）化合物の量は、特定の抗体フラグメント、好ましくはVHH又はその機能的フラグメントだけでなく、投与経路、治療される症状の性質並びに患者の年齢及び症状によっても変化し得、最終的に主治医又は臨床医の裁量による。本明細書で想定される（標識）化合物の投薬量は、標的細胞、腫瘍、組織、移植片又は器官に応じて変化し得る。

【0364】

特に、本明細書で想定される（標識された）化合物は、とりわけ、処置される病態及び患者の重症度に基づいて、医師によって決定される量で投与される。典型的には、各疾患

50

適応症について、連続的に（例えば、注入によって）、1日1回の用量として又は1日中に複数回に分割された投薬量としてのいずれかで、1日当たり体重1kg当たりで投与される量を指定して、最適な用量が決定される。臨床医は、一般に、本明細書で言及される因子に応じて、好適な1日用量を決定することができる。特定の場合、臨床医は、例えば、上記の要因及び彼の専門家の判断に基づいて、これらの量から逸脱することを選択し得ることも明らかであろう。

【0365】

本明細書で想定されるその（標識）化合物の有用な投薬量は、動物モデルにおけるそれらのインビトロ活性及び／又はインビボ活性を決定することによって決定することができる。本発明の非ヒト動物は、この目的のために使用され得る（実施例2を参照されたい）。

10

【0366】

特定の実施形態では、本発明は、 $10\mu\text{g}\sim 10\text{mg}$ 、又は $10\mu\text{g}\sim 7\text{mg}$ 、又は $10\mu\text{g}\sim 5\text{mg}$ 、又は $10\mu\text{g}\sim 2\text{mg}$ 、又は $10\mu\text{g}\sim 1.5\text{mg}$ 、又は $10\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ の範囲にわたる用量のVHHで、それを必要とする対象へ標識化合物を投与することにより、癌（好ましくは癌細胞上及び／又はCAF上でのヒトFAPの発現に関連する癌）の予防及び／又は処置で使用するための本明細書に開示されるような標識化合物を提供する。更なる特定の実施形態では、本発明は、それを必要とする対象に、 $10\mu\text{g}\sim 2\text{mg}$ の範囲にわたる用量、特に $10\mu\text{g}\sim 1.5\text{mg}$ の範囲又は $100\mu\text{g}\sim 1\text{mg}$ の範囲にわたる用量の標識化合物などの標識化合物を投与することにより、癌の予防及び／又は治療に使用するための本明細書に開示される標識化合物を提供する。

20

【0367】

したがって、投与当たりに患者に適用される放射能の用量は、有効であるのに充分に高くなければならないが、用量制限毒性（DLT）未満でなければならない。例えば ^{131}I -ヨウ素を有する放射性標識抗体を含む医薬組成物の場合、最大耐量（MTD）を決定しなければならず、これは、治療状況において超えてはならない。

【0368】

本明細書で想定される化合物及び標識化合物並びに／又はそれらを含む組成物は、予防又は治療される疾患又は障害を予防及び／又は治療するのに好適な治療のレジメンに従って投与される。臨床医は、一般に、好適な治療レジメンを決定することができる。一般に、治療レジメンは、標識化合物又はそれを含む1つ以上の組成物を、1つ以上の薬学的有効量又は用量で投与することを含む。

30

【0369】

所望の用量は、好都合には、単回用量において又は好適な間隔で投与される分割用量（これも位用量であり得る）として提示され得る。投与レジメンは、長期（すなわち少なくとも2週間、例えば数ヶ月又は数年）又は毎日の治療を含み得る。特に、投与レジメンは、1日1回～1ヶ月に1回、例えば1日1回～2週間に1回など、例えば限定されないが、週に1回などで変化し得る。したがって、治療の所望の期間及び有効性に応じて、本明細書に開示される標識化合物又はそれを含む組成物は、1回又は数回、また断続的に、例として数日間、数週間又は数ヶ月間にわたって毎日及び異なる投薬量で投与され得る。本明細書に開示される標識化合物又は組成物の適用量は、特定の癌疾患の性質に依存する。複数回投与が好ましい。しかしながら、放射性標識材料は、典型的には、1週間～20週間間隔、又は2週間～10週間間隔、又は2週間～8週間間隔、又は3週間～6週間間隔、又は3週間～5週間間隔、又は4週間ごとに投与される。しかしながら、当業者は、投与を2つ以上の適用に分割することを選択する方法を知っており、これは、互いに直後に又は例えば1日～4週間の範囲の他の所定の間隔で適用され得る。

40

【0370】

特に、本明細書で想定される標識化合物は、本明細書で引用される疾患及び障害の予防並びに／若しくは治療に使用されるか、又は使用され得る他の薬学的に活性な化合物若しくは原理と組み合わせて使用され得、その結果、相乗効果が得られても又は得られなくて

50

もよい。そのような化合物及び原理の例並びにそれらを投与するための経路、方法及び医薬製剤又は組成物は、臨床医に明らかであろう。

【0371】

本発明に関連して、「～と組み合わせる」、「併用療法において」又は「併用治療において」とは、本明細書に開示される標識化合物又は本明細書に開示されるこれらの標識化合物を含む組成物が、1つ以上の他の薬学的に活性な化合物又は原理と共に、患者がそのような組合せの有益な効果から利益を得ることができるレジメンで患者に適用されることを意味するものとする。特に、両方の治療は、時間的に近接して患者に適用される。好ましい実施形態では、両方の治療は、4週間（28日間）以内に患者に適用される。より好ましくは、両方の処置は、2週間（14日間）以内、より好ましくは1週間（7日間）以内に適用される。好ましい実施形態では、2つの治療は、2日又は3日以内に適用される。別の好ましい実施形態では、2つの治療を、同じ日に、すなわち24時間以内に適用する。別の実施形態では、2つの治療は、4時間以内、又は2時間以内、又は1時間以内に適用される。別の実施形態では、2つの治療を、並行して、すなわち同時に適用するか、又は2つの投与を時間的に重複させる。

10

【0372】

特定の非限定的な実施形態では、本明細書に開示されるこれらの標識化合物を含む標識化合物又は組成物は、それを含む分子又は組成物と共に適用され、それを含む前記分子又は組成物は、標識化合物の腎臓保持を最適化し、したがって減少させることができる。本発明に関連して、「一緒に適用される」は、広く解釈されるべきである。これは、1つ又は2つの異なる組成物への同時の適用を包含することを意味する。これは、2つの異なる組成物への連続的な適用も包含する。

20

【0373】

そのような分子は改質ゼラチンなどの血漿又は代用血液であり得る。これに関連して使用され得る改質ゼラチンの例は、Gelofusine（商標）である。そのような血漿又は代用血液の使用は、腎臓における標識化合物の保持を最適化し、したがって減少させ、したがって望ましくない副作用を最適化すると予想される。そのような血漿又は代用血液を本発明の化合物と共に用いる利点は、実施例8及び実施例9で実証されている。

【0374】

そのような分子の別の例は、正に荷電されたアミノ酸又は少なくとも1つの正に荷電されたアミノ酸を含む組成物であり得る。好適な正荷電アミノ酸の例は、アルギニン、リジン及び／又はヒスチジンである。そのような組成物の例はAminomedix（商標）である。正荷電アミノ酸使用は、参照により明示的に組み込まれる、国際公開第2014/204854号パンフレットに広く記載されている。

30

【0375】

特定の非限定的な実施形態では、本明細書に開示されるこれらの標識化合物を含む標識化合物又は組成物は、免疫療法と共に適用される。一実施形態では、1つ以上の治療用抗体又は治療用抗体フラグメントを用いる。したがって、これらの特定の非限定的な実施形態では、本明細書に開示される標識化合物又はこれらの標識化合物を含む組成物を用いた放射免疫療法は、1つ以上の治療用抗体又は治療用抗体フラグメントを用いた通常の免疫療法と組み合わせられる。更なる特定の実施形態では、本明細書に開示される標識化合物又は本明細書に開示されるこれらの標識化合物を含む組成物は、1つ以上の治療用抗体又は治療用抗体フラグメントとの併用療法又は組合せ治療法で使用される。

40

【0376】

一実施形態では、本明細書で定義される標識化合物及び追加の抗体又は抗体フラグメントを含む併用療法が提供される。

【0377】

例えば、本明細書に開示される標識化合物又はこれらの標識化合物及び1つ以上の治療用抗体又は治療用抗体フラグメントを含む組成物は、同時に注入され得るか、又は注入は、時間的に重複し得る。2つの薬物が同時に投与される場合、これらは、1つの単一の医

50

薬製剤と一緒に製剤化され得るか、又は2つの異なる医薬製剤からの投与の直前に、例えば1つの単一の注入溶液に溶解若しくは希釈することによって一緒に混合され得る。別の実施形態では、2つの薬物は、別々に、すなわち2つの独立した医薬組成物として投与される。好ましい一実施形態では、2つの治療の投与は、患者の体内の腫瘍細胞が有効量の細胞傷害性薬物及び放射線に同時に曝露される方法である。別の好ましい実施形態では、有効量である、本明細書に開示される標識化合物又は本明細書に開示されるこれらの標識化合物を含む組成物と、1つ以上の治療用抗体又は治療用抗体フラグメントとの両方が同時に腫瘍の部位に存在する。本発明は、定義される組合せに加えて投与される更なる薬剤の使用も包含する。これは、例えば、1つ以上の更なる化学療法剤であり得る。これは、投与される他の薬物のいずれかの望ましくない副作用を予防、抑制又は改善するために適用される1つ以上の薬剤でもあり得る。例えば、白血球の増殖を刺激するサイトカインを適用して、白血球減少症又は好中球減少症の影響を改善することができる。

10

【0378】

本明細書に記載の化合物又は標識化合物及びこれらを含む組成物の有効性は、関与する特定の疾患又は障害に応じて、任意の好適なインビトロアッセイ、細胞ベースのアッセイ、インビボアッセイ及び／若しくはそれ自体公知の動物モデル又はそれらの任意の組合せを用いて試験することができる。好適なアッセイ及び動物モデルは、当業者に明らかであろう。好適な動物モデルは、本発明の一態様として実施例2に開示され、ヒトFAPを発現する非ヒト動物である。

【0379】

当業者は一般に、ヒト及び／又はマウスFAPへの結合並びに1つ以上の癌関連疾患及び線維性障害に関するそれらの治療効果及び／又は予防効果について、抗体フラグメント、好ましくはVHH若しくはそのフラグメント又は化合物若しくは標識化合物或いはそれらを含む組成物（全て本明細書で定義）を試験するための、好適なインビトロ若しくはインビボアッセイ、細胞アッセイ又は動物モデルを選択することができるであろう。そのようなアッセイは、本明細書に開示されるイメージングアッセイであり得る。

20

【0380】

「有効量」という用語は、本明細書で使用される場合、所望の1つ又は複数の結果を達成するために必要な量を意味する。

【0381】

本明細書で使用される場合、「決定すること」、「測定すること」、「評価すること」、「モニタすること」及び「アッセイすること」という用語は、互換的に使用され、定量的及び定性的判定の両方を含む。

30

【0382】

本明細書で使用される場合、「予防及び／又は治療」という用語は、特定の疾患、及び／又は障害、及び／又は病態を予防及び／又は治療すること、特定の疾患、及び／又は障害、及び／又は病態の発症を予防すること、特定の疾患、及び／又は障害、及び／又は病態の進行を減速又は逆転させること、特定の疾患、及び／又は障害、及び／又は病態に関連する1つ以上の症状の発症を予防又は減速させること、特定の疾患、及び／又は障害、及び／又は病態に関連する1つ以上の症状を軽減及び／又は緩和すること、特定の疾患、及び／又は障害、及び／又は病態の重症度及び／又は持続期間を減少させること並びに概して治療されている対象又は患者にとって有益である本明細書に開示される抗体フラグメントの任意の予防又は治療効果を含む。

40

【0383】

癌／腫瘍／転移細胞

本明細書で使用される場合、「腫瘍細胞」という用語は、原発性又は転移性腫瘍病変に存在する細胞を指す。これに関連して、腫瘍は癌細胞からなるだけでなく、形質転換細胞と非形質転換細胞との間に複雑な双方向相互作用が存在する、器官様構造と見なされるべきである。形質転換細胞の悪性度は、線維芽細胞、脂肪細胞、血液及びリンパ管からなり得るが、広範囲の免疫細胞によってもかなり浸潤され得る、間質からの好適な支持構造を

50

必要とする。本発明に関連して、腫瘍細胞は、線維芽細胞、好ましくはCAFでもあり得る。

【0384】

「固形腫瘍」又は「腫瘍」とは、原発腫瘍及び／又は転移（どこに位置するかにかかわらず）を意味する。

【0385】

本明細書で使用される場合、「癌細胞」という用語は、制御されない成長で異常且つ無制限に分裂して再生し、分裂して身体他の部分に移動し、転移と呼ばれる別の部位を形成することができる細胞を指す。

【0386】

本明細書で使用される「病変」とは、損傷又は疾患に起因する、身体組織又は器官の任意の異常な変化を指すことができる。癌の用語において、病変とは、典型的には腫瘍を指す。

【0387】

本明細書で使用される「原発腫瘍」という用語は、腫瘍の進行が開始し、進行して癌性塊を生じた、解剖学的部位で成長する腫瘍である。

【0388】

本明細書で使用される「転移巣」という用語は、それらの元の位置から身体他の部分に広がった悪性又は癌性の腫瘍を指す。互換的に使用され得る関連する医学用語には、末期癌、進行癌又は転移性疾患が含まれる。一般に、転移巣は不治であると考えられるが、癌細胞の広がりを制御し、個体の平均余命を潜在的に延長するために、治療が利用可能であることが多い。

【0389】

転移は、体内のその起源部位を越えた癌の広がり用語である。したがって、転移巣とは、原発腫瘍の元の開始点から離れた位置に見られる癌性腫瘍である。転移性腫瘍は、原発腫瘍からの細胞が分離し、リンパ系及び血流を介して身体遠位部分に移動するとき場合に生じる。代わりに、元の腫瘍からの細胞は、隣接する器官又は組織で新しい腫瘍に播種され得る。本明細書で使用される「転移性疾患」とは、末期癌を指し、癌細胞が元の腫瘍の近くのリンパ節に見られる場合にはステージIII又は癌細胞が原発腫瘍部位をはるかに超えて身体離れた部分まで移動した場合にはステージIVであるとする、癌の医学的分類を指す。転移巣は、脳、肺、肝臓又は骨で最も一般的に見られる。転移性癌を有する個体は、任意の症状を経験することも又はしないこともあり、症状は、転移した細胞が移動した領域に関連し得る。転移巣が体内に存在すると、個体の癌は、ほとんどの癌型で不治であると考えられる。これは、利用可能な処置で全ての既存の癌細胞を根絶することが過度に困難であることを意味する。この場合、治療の目標は、可能な限り最高の生活の質を維持し、潜在的に個人の平均余命を延ばすために腫瘍の成長を遅らせることになる。場合によっては、転移巣を有する人々は、症状管理のための好適な治療で数年間生存することができる。

【0390】

放射性標識／標識／放射性核種／用量

本明細書で使用される場合、「標識化合物」のような「標識された」という用語は、その抗体フラグメント又はVHH若しくはそのフラグメントの放射性同位体標識を指し、抗体フラグメント又はVHH若しくはそのフラグメントは、放射性核種をそのアミノ酸配列構造に含めるか、カップリングするか又は化学的に連結することによって標識される。

【0391】

本明細書で使用される場合、「放射性核種 (radionuclide)」、「放射性核種 (radioactive nuclide)」、「放射性同位体 (radioisotope)」又は「放射性同位体 (radioactive isotope)」という用語は、本明細書では互換的に使用され、核内又は内部変換を介してのいずれかで新たに作製された放射線粒子に付与されるために利用可能な過剰エネルギーを特徴とする、不

10

20

30

40

50

安定な核を有する原子を指す。このプロセス中、放射性核種は放射性崩壊を受け、ガンマ線及び／又はアルファ粒子若しくはベータ粒子などの亜原子粒子の放射をもたらすと言われている。これらの放射は、電離放射線を構成する。放射性核種は、天然に存在するか又は人工的に生成され得る。

【0392】

IHC技術

本明細書で使用される「免疫組織化学（IHC）」という用語は、生体組織の切片中の抗原に特異的に結合する抗体の原理を利用することにより、組織切片の細胞中の抗原（例えば、タンパク質）を検出するプロセスを指す。免疫組織化学染色は、癌性腫瘍に見られるようなものなどの異常細胞の診断に広く使用されている。IHCは、生物学的組織の異なる部分におけるバイオマーカー及び示差的発現タンパク質の分布及び局在化を理解するための基礎研究でも広く使用されている。

【0393】

【表6】

表5: 配列表

配列番号	アミノ酸/核酸	配列の特性評価
1	アミノ酸	B1のCDR1
2	アミノ酸	B1のCDR2
3	アミノ酸	B1のCDR3
4	アミノ酸	B1
5	アミノ酸	B2のCDR1
6	アミノ酸	B2のCDR2
7	アミノ酸	B2のCDR3
8	アミノ酸	B2
9	アミノ酸	B3のCDR1
10	アミノ酸	B3のCDR2
11	アミノ酸	B3のCDR3
12	アミノ酸	B3
13	アミノ酸	B4のCDR1
14	アミノ酸	B4のCDR2
15	アミノ酸	B4のCDR3
16	アミノ酸	B4
17	アミノ酸	HA-His6タグを有するB1
18	アミノ酸	HA-His6タグを有するB2
19	アミノ酸	HA-His6タグを有するB3
20	アミノ酸	HA-His6タグを有するB4
21	アミノ酸	His6タグを有するB1
22	アミノ酸	His6タグを有するB2
23	アミノ酸	His6タグを有するB3
24	アミノ酸	His6タグを有するB4
25	核酸	ヒト線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(FAP)をコードする核酸、転写バリエーション1

【0394】

10

20

30

40

50

【表 7】

26	アミノ酸	ヒト線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (FAP)、転写バリエーション 1
27	核酸	ターゲティングベクター
28	アミノ酸	ヒト FAP 組換えタンパク質
29	アミノ酸	マウス FAP 組換えタンパク質
30	アミノ酸	マウス線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (FAP)
31	アミノ酸	ヒトシスタチン-S シグナルペプチド
32	アミノ酸	非ターゲティング対照 VHH R3B23
33	核酸	B1 をコードする核酸
34	核酸	B2 をコードする核酸
35	核酸	B3 をコードする核酸
36	核酸	B4 をコードする核酸
37	アミノ酸	B1 の FR1
38	アミノ酸	B1 の FR2
39	アミノ酸	B1 の FR3
40	アミノ酸	B1 の FR4
41	アミノ酸	B2 の FR1
42	アミノ酸	B2 の FR2
43	アミノ酸	B2 の FR3
44	アミノ酸	B2 の FR4
45	アミノ酸	B3 の FR1
46	アミノ酸	B3 の FR2
47	アミノ酸	B3 の FR3
48	アミノ酸	B3 の FR4
49	アミノ酸	B4 の FR1
50	アミノ酸	B4 の FR2
51	アミノ酸	B4 の FR3
52	アミノ酸	B4 の FR4
53	アミノ酸	例示的な HA タグ
54	アミノ酸	例示的な HA タグ
55	アミノ酸	例示的なシステインタグ

10

20

30

【0395】

本明細書で引用される全ての文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。別段の定義がない限り、技術用語及び科学用語を含む、本発明の開示に使用される全ての用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。更なる指針により、本発明の教示をよりよく理解するために用語定義が含まれる。本明細書に記載の各実施形態は、特に明記しない限り、本明細書に記載の他の任意の実施形態と組み合わせられ得る。

40

【0396】

本発明は、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以下の実施例によって更に説明される。

【実施例】

【0397】

実施例 1：VHH B1、B2、B3 及び B4 並びにそれらのバリエーションの生成

VHH B1、B2、B3 及び B4 のヘマグルチニンタグ付け及びヘキサヒスチジンタグ

50

グ付け (H A - H i s₆ タグ付け) バリエーション (配列番号 17 ~ 20) を、V H H ファージミドベクターで形質導入された大腸菌 (E . c o l i) W K 6 細胞で生成し、V i n c k e , C . ら (2012 年) 「M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y」第 907 巻 : 第 145 ~ 176 頁のプロトコルなどの標準的なプロトコルに従って、凍結融解法又は浸透圧ショック法のいずれかによってペリプラズムから抽出した。要するに、細菌を T e r r i f i c B r o t h 培地中で成長させ、指数成長期に V H H 発現を誘導した。一晚の成長中、V H H をペリプラズムに移動させ、ペリプラズムから凍結融解サイクルによって抽出した。代わりに、浸透圧ショックによって V H H をペリプラズムから収集し、H I S 選択懸濁液 (S i g m a - A l d r i c h) とのバッチインキュベーション及び 0 . 5 M イミダゾールによる段階的溶出によって固定化金属親和性クロマトグラフィ (I M A C) により、80 % 超の純度まで精製した。溶出液を、P B S 中で平衡化した Z e b a S p i n 脱塩カラム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を用いるゲル濾過クロマトグラフィを介して脱塩した。

10

【0398】

V H H B 1、B 2、B 3 及び B 4 のヘキサヒスチジンタグ付け (H i s₆ タグ付け) バリエーション (配列番号 21 ~ 24) を、V H H 組換え発現プラスミドで形質転換し、且つ V i n c k e , C . ら (2012 年) 「M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y」第 907 巻 : 第 145 ~ 176 頁のプロトコルなどの標準的なプロトコルに従って、I M A C 及びサイズ排除クロマトグラフィ (S E C) によってペリプラズムから精製した、大腸菌 (E . c o l i) W K 6 細胞中で生成した。要するに、細菌を T e r r i f i c B r o t h 培地中で成長させ、指数成長期に V H H 発現を誘導した。一晚の成長中、V H H をペリプラズムに移動させて、浸透圧ショック後にこれらをペリプラズムから収集した。H I S 選択懸濁液 (S i g m a - A l d r i c h) とのバッチインキュベーション、続いて 0 . 5 M イミダゾールによる段階的溶出により、I M A C を介してペリプラズム抽出物から V H H を精製した。続いて、S E C は、P B S 中で平衡化した、H i L o a d 16 / 600 S u p e r d e x 75 P G カラム (G E H e a l t h c a r e) 又は S u p e r d e x 75 10 / 300 G L (G E H e a l t h c a r e) で行った。

20

【0399】

B a l d i ら (2005 年) 「B i o t e c h n o l P r o g . 」第 21 巻 (第 1 号) : 第 148 ~ 53 頁などの標準的なプロトコルに従って、エンドトキシンを含まないプラスミド DNA で一過性にトランスフェクトした H E K 293 - E 細胞において、V H H B 1 の非タグ付けバリエーション (配列番号 4) を生成した。トランスフェクションの 6 日後、V H H を含有する馴化培地を遠心分離によって採取した。V H H を、20 m M N a A c、p H 4 . 0 で平衡化した C a p t o S P I m p R e s カラム (G E H e a l t h c a r e) を用いて且つ塩勾配を採用して、陽イオン交換クロマトグラフィによって採取した培地から精製した。溶出液画分を、1 M T r i s - H C l、p H 8 . 0 で p H 7 . 0 まで中和した。続いて、S E C は、P B S 中で平衡化した S u p e r d e x 75 26 / 600 カラム (G E H e a l t h c a r e) で行った。

30

【0400】

40

【表 8】

表 6: VHH B1、B2、B3 及び B4 のバリエント。

クローン	バリエント	配列番号	
B1	HA-His6 タグ	17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMA WYRQVPGKRRELVAGITGGGETNYADFGGRFTISR DNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYCNFWPPLINYWG QGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B1	His6 タグ	21	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMA WYRQVPGKRRELVAGITGGGETNYADFGGRFTISR DNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYCNFWPPLINYWG QGTQVTVSSHHHHHHH
B1	非タグ付け	4	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMA WYRQVPGKRRELVAGITGGGETNYADFGGRFTISR DNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYCNFWPPLINYWG QGTQVTVSS
B2	HA-His6 タグ	18	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSISSANSMSG WYRQAPGKQRDVVAGLTGGRSHYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNLWPPVQGYW GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B2	His6 タグ	22	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSISSANSMSG WYRQAPGKQRDVVAGLTGGRSHYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNLWPPVQGYW GQGTQVTVSSHHHHHHH
B3	HA-His6 タグ	19	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRIFSTNAMG WYRQAPGKQRELVAGITGGDRSNYADSVKGRFTIS RDNGKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNFYPPIVGDYW GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B3	His6 タグ	23	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRIFSTNAMG WYRQAPGKQRELVAGITGGDRSNYADSVKGRFTIS RDNGKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNFYPPIVGDYW GQGTQVTVSSHHHHHHH
B4	HA-His6 タグ	20	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGFTFSSYYMS WVRQAPGKGLEWVASIYADGDMTYADSVRGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPLPPYHV NQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B4	His6 タグ	24	DVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCVASGFTFSSYYMS WVRQAPGKGLEWVASIYADGDMTYADSVRGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPLPPYHV NQGTQVTVSSHHHHHHH

10

20

30

40

【0401】

実施例 2：ノックインマウス

ヒトFAPノックイン（KI）マウスを、C57BL/6マウスにおける第2染色体上のマウスFAP遺伝子のエクソン1における開始コドンの後の、ヒトFAP cDNA（NM_004460.5由来；配列番号25、配列番号26をコードする）の相同組換えによる導入によって産生した（遺伝子ID：14089、NCBIアクセッション番号NM_007986.3）。これにより、正常なマウスFAP遺伝子の機能的発現が破壊され、代わりに、マウスFAPプロモータの下でのヒトFAPの発現が駆動される。

【0402】

50

K Iマウスでは、マウスFAPのエクソン1におけるATG開始コドンからイントロン2の一部までの領域が「ヒトFAP CDS-ポリA」カセットで置き換えられている。

【0403】

ターゲティングベクターの異なる要素を図1に概略的に示す。「ヒトFAP CDS-ポリA」カセットは「5'アーム」から「3'アーム」まで伸長する。ターゲティングベクターの17086bp配列は配列番号27である。

【0404】

「ヒトFAP CDS-ポリA」カセットは、以下の関連要素を含む：

1. マウスFAP 5'非翻訳領域及びエクソン1の一部（開始コドンまで）を包含する第1の相同アーム（図1の「5'アーム」）は、ヌクレオチド1704～3821である。相同アームを、C57BL/6BACライブラリからのBACクローンRP23-161B24又はRP24-308I10を鋳型として用いて、PCRによって産生する。

2. マウスFAPエクソン1は、ヌクレオチド3652で開始する

3. マウスFAP開始コドンはヌクレオチド3822からヌクレオチド3824までである

4. 図1において「ヒトFAP CDS」と示される、ヒトFAPコード配列（NCBI参照配列NM_004460.5に由来；配列番号25）は、ヌクレオチド3822～ヌクレオチド6104である

5. ウサギベータグロビンポリアダニル化配列（図1の「rBGpA」）は、ヌクレオチド6105～6626である

6. ES細胞の正の選択に使用されるネオマイシン耐性遺伝子（図1の「Neoカセット」）は、rBGpAシグナル配列と第2の相同アームとの間にあり、且つ2つのLoxP部位に隣接している（図1の「LoxP(r)」）、ヌクレオチド6640～6673及び10406～10439）

7. マウスFAPイントロン2の一部を包含する第2の相同アーム（図1の「3'アーム」）は、ヌクレオチド10506～14426である。相同アームを、C57BL/6BACライブラリからのBACクローンRP23-161B24又はRP24-308I10を鋳型として用いて、PCRによって産生する。

【0405】

ターゲティングベクターは、追加的に以下を含む：

1. 第1の相同アームの上流に位置する、相同組換えを受けていないES細胞の負の選択に使用されるジフテリア毒素A遺伝子（図1の「DTAカセット」）

2. 大腸菌（E. coli）におけるターゲティングベクターの正の選択のために使用される、アンピシリン耐性遺伝子（図1の「Amp」）

【0406】

ターゲティングベクターをRFLP分析及び配列決定によって検証する。ターゲティングベクターを、NotI DNA制限酵素で線状化し、C57BL/6N胚性幹（ES）細胞にエレクトロポレーションする。個々のクローンをネオマイシンでの正の選択後に選択した。選択されたESクローンの遺伝子型を核型分析、ロングレンジゲノムPCR及びサザンブロット分析によって検証する。

【0407】

選択されたES細胞クローンをC57BL/6アルビノ胚盤胞に微量注入し、次いで、CD-1偽妊娠雌に再移植した。雄F0ファウンダーマウスを、それらの毛色及びゲノムPCRによって同定した。F0ファウンダーマウスをC57BL/6雌と交配した。生殖系列の伝達の際、ネオマイシンカセットはゲノムから自己欠失する。F1子孫をゲノムPCR分析によって遺伝子型決定した。F1ヘテロ接合性K Iマウスを、3つの異なるESクローンから産生し、交配した。ヘテロ接合性K Iマウスは子孫の予想されるメンデル遺伝比で飼育された。これは、ヒトFAPノックイン構築物の充分性及び毒性の欠如を示す。ヘテロ接合体遺伝子型及びホモ接合体遺伝子型の両方がいかなる巨視的異常もなしに少なくとも1年間生存可能であった。

【0408】

公開された前臨床データから、マウスFAPが血液、リンパ節、骨、子宮、脾臓、皮膚及び筋肉などのいくつかの器官及び組織に存在することが示される（Pureら（2018年）「Oncogene」、8月；第37巻（第32号）：第4343～4357頁；Keaneら（2014年）「FEBS Open Bio」第4巻第43～54頁）。いくつかの報告は、この上昇した取込みの少なくとも一部の、マウスFAPの血流中への活発な排出（しかし、ヒトFAPでは排出しない）に関連する（Keaneら（2014年）「FEBS Open Bio」第4巻第43～54頁）。ヒトFAPノックインマウスにおいて用いる実施例5（実施例5a）に記載される結果は、ヒト／マウス交差反応性FAPターゲティングVHH B1が静脈内投与される場合、この上昇した取り込みが存在しないことを明らかにしており、これは、ヒトFAPがそれまでに排出されていないことを示す。これは、本明細書に記載のヒトFAPノックインマウスがヒトの状況を正確に表すことを意味する。

10

【0409】

実施例5（実施例5b）に記載される追加的結果は、ヒト／マウスFAP交差反応性VHH B1が野生型C57BL／6マウスにおける治癒創傷でのマウスFAP発現線維芽細胞及びホモ接合型ヒトFAPノックインマウスにおけるヒトFAP発現線維芽細胞を特異的に結合する一方、マウスFAPターゲティングVHH B4が野生型マウスにおける治癒創傷でマウスFAP発現線維芽細胞をターゲティングすることのみができ、ホモ接合型ヒトFAPノックインマウスではターゲティングできなかったことを示す。この観察結果は、実施例5で使用された動物モデルにおけるヒトFAPノックの真の検証として役立つ。

20

【0410】

実施例3：標識化合物の合成

His6タグ付けVHHは、140keVの光子エネルギーで検出可能なガンマ線を放出するため、診断目的のためにテクネチウム-99m（ ^{99m}Tc ）により放射性標識される。要するに、Xavierら、「Methods Mol Biol.」（2012年）；第911巻：第485～90頁に記載のように、それらのHis6タグで $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]$ により標識される。 $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]$ を、1mg/mLのVHH溶液に添加し、37～50℃で90分間インキュベートした。標識後、 ^{99m}Tc -VHH溶液を、PBSで予め平衡化した使い捨てサイズ排除カラム上で精製して、未結合の $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]$ を除去し、更なる使用前に0.22μmフィルタに通した。品質管理（QC）を即時薄層クロマトグラフィによって行った。

30

【0411】

以下の実施例では、FAPターゲティングHis6タグ付けVHH B1、B2、B3及びB4（配列番号21～24）を、診断用放射性同位体 ^{99m}Tc で放射性標識し、その後、診断用途のためにインビトロ及びインビボで特徴付けた。

【0412】

VHHは、セラノスティックな目的のために ^{131}I で放射性標識され、これは、同じ放射性標識されたVHHが診断目的及び治療目的の両方に使用され得ることを意味する。これは、診断目的（例えば、ガンマ線）及び治療目的（例えば、ベータ線）に使用することができる、異なる種類の放射線を放出する放射性同位体を適用することによって達成することができる。そのような放射性同位体の1つはヨウ素-131（ ^{131}I ）であり、これは、約364keVのガンマ線及び606keVの最大エネルギーを有するベータマイナース粒子の両方を放出する。手短に言えば、 $[\text{}^{131}\text{I}]$ SGMIBは、D'Huyvetter Mら「Clin Cancer Res.」（2017年11月1日）；第23巻（第21号）：第6616～6628頁から適合させた手順に従って合成及び精製した。ヨウ化ナトリウム $[\text{}^{131}\text{I}]$ をそのトリメチルスタンニル前駆体とアセトニトリル中において室温で20分間反応させ、その後、ビスBoc- $[\text{}^{131}\text{I}]$ SGMIBを

40

50

、トリフルオロ酢酸の添加によって脱保護し、続いて逆相 HPLC を用いて精製した。精製した [^{131}I] SGMIB を、VHH と共に $150\text{ }\mu\text{g}$ の 0.1 M ホウ酸緩衝液 pH 8.5 中において室温で 20 分間インキュベートし、求核置換を介してリジン側鎖アミン反応性基にコンジュゲートさせ、その後、[^{131}I] SGMIB-VHH を、PBS で予め平衡化した使い捨てサイズ排除カラムを用いて精製して未反応の [^{131}I] SGMIB を除去し、更なる使用前に $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルタを通過させた。品質管理 (QC) を即時薄層クロマトグラフィによって行った。

【0413】

以下に記載される実施例において、以下の FAP ターゲティング VHH は、セラノスティック放射性同位体 ^{131}I で放射性標識され、続いてセラノスティック用途 (His6 タグ付け VHH B1、B2、B3 及び B4 (配列番号 21~24) 並びに非タグ付け VHH B1 (配列番号 4)) のためにインビトロ及びインビボで特徴付けられている。

【0414】

VHH は、診断目的のために ^{111}In でも放射性標識される。インジウム-111 は、約 172 及び 246 keV のガンマ線を放出する。手短に言えば、二官能性キレート剤 p-SCN-Bn-DOTA を、 0.05 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) 中の VHH のリジン側鎖アミン反応基にコンジュゲートした。サイズ排除精製後、得られた VHH-DOTA を 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 7.0 中で再構成した。必要量の ^{111}In を、金属を含まない 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 5.0 を含有する試験バイアルに添加した。次いで、 $25\sim100\text{ }\mu\text{g}$ の VHH-DOTA を添加し、 55°C で 30 分間インキュベートした。 ^{111}In -DOTA-VHH をサイズ排除精製によって精製し、更に使用する前に $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルタに通した。品質管理 (QC) を即時薄層クロマトグラフィによって行った。以下の実施例において、FAP ターゲティング非タグ付け VHH B1 (配列番号 4) は、診断のための放射性同位体 ^{111}In で放射性標識され、続いて診断用途のためにインビトロ及びインビボで特徴付けられている。

【0415】

VHH は、セラノスティックな目的のために ^{177}Lu でも放射性標識される (D'Huysvetter ら (2012 年) 「Contrast Media Mol Imaging」第 7 巻 (第 2 号) : 第 254~264 頁)。ルテチウム-177 は、約 113 及び 210 keV のガンマ線と、 497 keV の最大エネルギーを有するベータマイナス粒子との両方を放出する。手短に言えば、二官能性キレート剤 p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA を、 0.05 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) 中の VHH のリジン側鎖アミン反応基にコンジュゲートした。サイズ排除精製後、得られた VHH-DTPA を 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 7.0 中で再構成した。必要量の ^{177}Lu を、金属を含まない 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 5.0 を含有する試験バイアルに添加した。次いで、 $25\sim100\text{ }\mu\text{g}$ の VHH-DTPA を添加し、 55°C で 30 分間インキュベートした。 ^{177}Lu -DTPA-VHH をサイズ排除精製によって精製し、更に使用する前に $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルタに通した。品質管理 (QC) を即時薄層クロマトグラフィによって行った。

【0416】

以下の実施例において、FAP ターゲティング非タグ付け VHH B1 (配列番号 4) を、セラノスティック放射性同位体 ^{177}Lu で放射性標識し、続いてセラノスティック用途のためにインビトロで特徴付けた。

【0417】

最後に、VHH は、治療目的のために ^{225}Ac でも放射性標識される (Pruszyński ら (2018 年) 「Mol Pharm」第 15 巻 (第 4 号) : 第 1457~1466 頁)。アクチニウム-225 は 5.8 MeV のアルファ粒子を放出する。手短に言えば、二官能性キレート剤 p-SCN-Bn-DOTA を、 0.05 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) 中の VHH のリジン側鎖アミン反応基にコンジュゲートした。サイズ排除精製後、得られた VHH-DOTA を 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 7.0 中

で再構成した。 ^{225}Ac の所望の活性を、 0.8 M 酢酸アンモニウム ($\text{pH } 5.0$) を含有する試験バイアルに添加し、続いてVHH-DOTA ($25\sim 100\text{ }\mu\text{g}$) と共に 55°C で 90 分間インキュベートした。混合物を室温まで冷却し、任意の遊離 ^{225}Ac を錯体化するために、 50 mM DTPA (0.8 M 酢酸アンモニウム中) 及びChellex 100でクエンチした。 ^{225}Ac -DOTA-VHHをサイズ排除精製によって精製し、更に使用する前に $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルタに通した。品質管理 (QC) を即時薄層クロマトグラフィによって行った。

【0418】

以下の実施例において、FAPターゲティング非タグ付けVHH B1 (配列番号4) を治療のための放射性同位体 ^{225}Ac で放射性標識し、続いて治療的適用のためにインビトロで特徴付けた。

10

【0419】

実施例4: VHH又はVHHを含む標識化合物の結合活性

実施例4a: 組換えタンパク質の生成

VHH結合活性試験のために、ヒトFAP及びマウスFAP組換えタンパク質を、Baldridge (2005年)「Biotechnol Prog.」第21巻 (第1号): 第148~53頁におけるプロトコルなどの標準的なプロトコルに従って、エンドトキシンを含まないプラスミドDNAにより一過性にトランスフェクトされたHEK293-E細胞において生成した。ヒトFAPの細胞外ドメイン (アミノ酸L26~D760、UniProtエントリQ12884、NCBI参照配列NP_004451.2) 及びマウスFAPの細胞外ドメイン (アミノ酸L26~D761、UniProtエントリP97321、NCBI参照配列NP_032012.1) を、培地中での分泌のためにヒトサイスタチン-Sシグナルペプチド (配列番号31) を用いて、N末端His6タグ (それぞれ配列番号28~29) により生成した。分泌されると、シグナルペプチドはタンパク質分解的に組換えFAPタンパク質から除去される。トランスフェクションの6日後、組換えタンパク質を含有する馴化培地を遠心分離によって採取した。FAP組換えタンパク質を、採取した培地から、Ni Sepharose Excel親和性培地 (Sigma-Aldrich) とのバッチインキュベーションによってIMACを介して精製した。 25 mM Tris、 500 mM NaCl、 $\text{pH } 8.2$ 及び 25 mM Tris、 500 mM NaCl、 20 mM イミダゾール、 $\text{pH } 8.2$ で洗浄した後、タンパク質を、 25 mM Tris、 500 mM NaCl、 500 mM イミダゾール、 $\text{pH } 8.2$ で溶出させた。続いて、SECは、PBS中で平衡化したSuperdex 200 16/600カラム (GE Healthcare) で行った。

20

30

【0420】

組換えFAPタンパク質は、実施例4dにおいて測定されるように、これがその酵素活性 (Aertgeerts Kら (2005年)「J Biol Chem」第280巻 (第20号): 第19441~4頁) のための必要条件であるため、溶液中でホモ二量体を形成した。

【0421】

実施例4b: ELISA: 特異的結合: ヒトFAP/マウスFAP、DPP IV

40

実施例のこの部分は、ELISAにおいて試験されるような、ヒト及び/又はマウスFAPの細胞外ドメイン (それぞれNCBI参照配列NP_004451.2及びNP_032012.1) に対するVHH B1、B2、B3及びB4の特異的結合並びにヒトDPP IVの細胞外ドメイン (NCBI参照配列NP_001926.2) に対する結合の非存在を記載する。DPP IV及びFAPは、いずれもジペプチジルペプチダーゼのファミリーに属する一方、DPP IVは、FAPの最も近いホモログであり、そのアミノ酸配列において約50%の相同性を共有する (Juillerat-Jeanneret Lら (2017年)「J Expert Opin Ther Targets」第21巻 (第10号): 第977~991頁)。

【0422】

50

測定の前日に100mM NaHCO₃、pH8.2中1μg/mLの濃度の0.1μgの組換えタンパク質を96ウェルELISAプレート(Nunc MaxiSorp)でコーティングした。VHHクローンごとに、ブランクコーティングウェルも予測された(緩衝液のみ)。ウェルを、タンパク質非含有T20(PBS)ブロッキング緩衝液(Pierce)でオーバーコーティングした。PBS、pH7.4、0.05%Tweenで洗浄した後、VHH含有細菌凍結融解抽出物を各ウェルに添加した。HA-His₆タグ付けVHHの結合を、マウス抗HA.11エピトープタグ(クローン16B12、Biolegend)を一次Abとして用いて、ヤギ抗マウスIgG(全分子)アルカリホスファターゼコンジュゲート(Sigma-Aldrich)を二次Abとして用いて、その間にPBS、pH7.4、0.05%Tweenで十分に洗浄することによって検出した。APブロット緩衝液(100mM NaCl、50mM MgCl₂、100mM Tris、pH9.5)中のホスファターゼ基質(Sigma-Aldrich)を用いてシグナルを発生させた。吸光度を、吸光度マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を用いて405nmで決定した。クローンごとに、抗原コーティングウェルと抗原非含有ウェルとの吸光度比を決定した。

10

20

30

40

50

【0423】

図2に示されるように、VHH B1、B2及びB3(配列番号17~19)は、ヒトFAP組換えタンパク質(配列番号28)によりコーティングされるウェルについては25を超えるシグナル対バックグラウンド比を示し、このことから、ヒトFAPに対する特異的結合が確認された。VHH B1及びB2は、マウスFAP組換えタンパク質(配列番号29)にも特異的に結合できることを示したが、これは、VHH B3については当てはまらなかった。その結果、VHH B4(配列番号20)は、マウスFAP組換えタンパク質によりコーティングされるウェルについては30を超えるシグナル対バックグラウンド比を示し、このことから、マウスFAPに対する特異的結合が確認された一方、ヒトFAPには結合しなかった。これらの実験は、VHH B1及びB2がマウスFAP/ヒトFAP交差反応性であり、VHH B3がヒトFAP特異的であり、VHH B4がマウスFAP特異的であることを実証する。

【0424】

全てのヒトFAP結合VHHがヒトDPPIV(Sino Biological)に対する結合の非存在を示し、シグナル対バックグラウンド比は、およそ1であった。

【0425】

実施例4c:フローサイトメトリ:GM05389及びHEK-マウスFAP

実施例のこの部分は、ヒトFAP発現線維芽細胞株GM05389(Coriell Institute for Medical ResearchのNIGMS Human Genetic Cell Repositoryから入手)及びマウスFAPトランスフェクト細胞株HEK293(Jonathan D. Cheng、Fox Chase Cancer Center、Philadelphia、PAから入手; Cheng, J. D.ら(2002年)「Cancer Research」第62巻(第16号):第4767~4772頁に記載)上の天然に発現される受容体を標的とするVHHの能力について記載する。

【0426】

細胞結合をフローサイトメトリ実験によって試験した。試験条件ごとに、PBS、0.5%BSAで洗浄した $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞を、96ウェルU底プレートのウェルにペレット化した。細胞ペレットを再懸濁し、VHH含有細菌凍結融解抽出物(PBS、0.5%BSAで希釈)と共にインキュベートした。HA-His₆タグ付けVHHの結合を、マウス抗HA.11エピトープタグ(クローン16B12、Biolegend)を一次検出抗体として用いて、PEコンジュゲートラット抗マウスIgG1(クローンA85-1、BD Pharmingen)を二次検出抗体として使用して、その間に0.5%BSAのPBSで洗浄し、最後に0.5%BSAのPBSに再懸濁して検出した。

【0427】

フローサイトメトリをFACS Canto II (BD Biosciences)で行った。FlowJoソフトウェアを用いてデータを分析した。前方散乱－側方散乱プロットに基づいて、単一細胞ゲートを描写した。蛍光強度の中央値を、単一細胞のフィコエリトリンシグナルについてのヒストグラムで決定した。蛍光強度中央値 (Δmfi) の差を、VHHのインキュベーションなしの試験条件 (細胞＋一次Ab＋二次Ab) と比較して計算し、図3に示す。

【0428】

組換えタンパク質を用いた実施例4bにおけるELISAの結果によれば、VHH B1、B2及びB3 (配列番号17～19) は、ヒトFAP発現細胞株GM05389に結合することができる一方、VHH B1、B2及びB4 (配列番号20) は、マウスFAPトランスフェクト細胞株HEK293に結合することができた。

【0429】

実施例4d：酵素活性

実施例のこの部分は、VHH結合の際のヒトFAPジペプチジルペプチダーゼ酵素活性に対する非阻害効果について記載する。

【0430】

ヒトFAP酵素活性は、蛍光発生基質であるベンジルオキシカルボニル-Gly-Pro-7-アミド-4-メチルクマリン (Z-Gly-Pro-AMC; Bachem) を用いて測定された。

【0431】

ヒトFAP組換えタンパク質 (配列番号28) を、1 μ MのHA-His₆タグ付けVHHの非存在下又は存在下、黒色の96ウェル平底プレートにおいてアッセイ緩衝液 (50mM Tris-HCl、1M NaCl、0.1% BSA、pH 7.5) で200 ng/mLに希釈した。阻害剤対照として、VHHの代わりに1 μ Mのメシル酸タラボスタット (Apex Bio) を加えた。結合平衡に達するまで1時間インキュベートした後、Z-Gly-Pro-AMC基質を50 μ Mの最終濃度で添加した。蛍光マイクロプレートリーダ (BioTek) を用いて、380 nmで励起し、460 nmで発光検出して、基質のZ-Gly-Pro及び7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) への酵素的変換を追跡した。蛍光を1分毎に1時間測定した。図4に示される曲線の傾きは、酵素活性の速度に対応する。

【0432】

ヒトFAP結合VHH B1、B2及びB3 (配列番号17～19) は、ヒトFAPジペプチジルペプチダーゼ酵素活性に対する影響を何ら示さず、Z-Gly-Pro-AMCをZ-Gly-Pro及びAMCに変換した。VHHの存在下における酵素活性の速度は、VHHのない状態 (陽性対照) に対応した一方、メシル酸タラボスタット (阻害剤対照) との共インキュベーションは、より低い蛍光レベルをもたらす基質加水分解速度の低下を示した。

【0433】

実施例4e：抗原結合速度論

実施例のこの部分は、抗原結合速度論の決定について記載する。

【0434】

この程度まで、ヒトFAP及びマウスFAP組換えタンパク質 (配列番号28～29) を、5倍モル過剰のスルホ-NHS-SS-ビオチン (Thermo Fisher Scientific) を用いてPBS緩衝液においてビオチン化した。過剰ビオチンを、PBS中で平衡化したZebaspin脱塩カラム (Thermo Fisher Scientific) を用いて除去した。

【0435】

精製されたVHHによる抗原結合の速度論パラメータを、Octet RED96装置 (FortéBio) を用いたバイオレイヤー干渉法によって決定した。アッセイは10

10

20

30

40

50

00rpmで振盪しながら25℃で行った。ストレプトアビジンコーティングSAセンサを、アッセイ緩衝液(0.5%BSA、0.1%Tweenを補充したHBS)中で平衡化した後、ビオチン化FAP組換えタンパク質を5μg/mLの濃度で5分間ロードした。アッセイ緩衝液中30nM~0.4nMの三倍段階希釈で、His6タグ付けVHHを分析した(ただし、VHH B3結合マウスFAP組換えタンパク質を除き、1000nM~1.6nMの5倍段階希釈物が採用された)。最初にアッセイ緩衝液中でベースラインを180秒間測定し、続いて濃度の昇順に180秒間のVHH調製物との5回のその後の会合段階を測定し、その間にアッセイ緩衝液中の75秒間の中間解離段階を行い、アッセイ緩衝液中で30分間の最終解離段階を行った。全てのアッセイにおいて、これは、会合段階中にアッセイ緩衝液中でインキュベートされた、FAP組換えタンパク質をロードした参照センサが含まれた。

10

【0436】

結合曲線を出し、BIAevaluation分析ソフトウェア(GE Healthcare)を用いて分析した。最初に、異なる曲線のy軸を、ベースライン測定の最後の5秒間の中央値に整列させた。その後、基準センサのセンサグラムを他の全てのセンサグラムから差し引いた。得られた結合曲線は、Rmaxをグローバルに、RIをローカルに、ドリフトを0に設定した「ドリフトによる速度論的滴定」結合(1:1 抗原:分析物)モデル(Karlsson, R.ら(2006年)「Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. Analytical Biochemistry」第349巻:第136~147頁)による一般的な適合を用いて適合させた。

20

【0437】

表7は、センサに負荷されたビオチン化ヒトFAP組換えタンパク質又はビオチン化マウスFAP組換えタンパク質を用いたバイオレイヤー干渉法によって決定されるような、His6タグ付けVHH B1、B2、B3及びB4(配列番号21~24)についての抗原結合の速度論的パラメータの概要を示す。

【0438】

VHH(B1、B2及びB3)は、1nMよりも小さい平衡解離定数(K_D)でヒトFAPに結合するための少なくともサブナノモル濃度の親和性を示した。特に、最良の結合特性は、 K_D 値<50pM及び解離反応速度定数(k_d)<5 10^{-5} 秒 $^{-1}$ を有するVHH B1について観察された。

30

【0439】

VHH B1及びB4は1nM未満の K_D 値でマウスFAPに結合することができた。VHH B2はマウスFAPについて24nMの中程度の親和性(K_D)を有した。

【0440】

40

50

【表 9】

表 7: 精製された His₆ タグ付け VHH B1、B2、B3 及び B4 の速度論的結合パラメータ k_a 、 k_d 、及び K_D 。

	k_a (M ⁻¹ 秒 ⁻¹)	k_d (秒 ⁻¹)	K_D (M)
ヒト FAP			
B1	7.0 E+05	2.7 E-05	37.8 E-12
B2	4.2 E+05	3.1 E-05	74.4 E-12
B3	3.4 E+05	5.4 E-05	160.0 E-12
B4	決定なし		
マウス FAP			
B1	1.9 E+06	1.4 E-03	742.0 E-12
B2	3.4 E+05	8.2 E-03	24.3 E-9
B3	結合なし		
B4	1.1 E+06	5.6 E-04	512.0 E-12

10

【0441】

20

実施例 4 f. FAP に対する放射性標識された VHH のインビトロ及びインビボでの結合活性

次に、本発明者らは、診断用放射性同位体 ^{99m}Tc による放射性標識後の種々の VHH のインビトロ及びインビボでのヒト FAP 及びマウス FAP 結合能を記載する。異なる ^{99m}Tc 標識 VHH の EC₅₀ 値を、ヒト FAP 発現 HEK-293 細胞及び GM05389 細胞並びにまたマウス FAP 発現 HEK-293 細胞 (GM05389 は、Coriell Institute for Medical Research の NIGMS Human Genetic Cell Repository から入手した；及び FAP トランスフェクト HEK293 細胞株は、Jonathan D. Cheng、Fox Chase Cancer Center、Philadelphia、PA から得た；Cheng, J. D. ら (2002 年)「Cancer Research」第 62 巻 (第 16 号)：第 4767～4772 頁) に記載) について決定した。His₆ タグ付けヒト／マウス FAP ターゲティング VHH を、実施例 3 に記載される放射化学的手順に従って、診断用放射性同位体 ^{99m}Tc で放射性標識した。

30

【0442】

次に、異なる細胞株を、0 nM～300 nM の範囲にわたる、異なる ^{99m}Tc 標識 His₆ タグ付け VHH の濃度の段階希釈物と共にインキュベートした。非特異的結合を評価するために、100 倍過剰の対応する非標識 VHH を並行して加えて、ヒト FAP タンパク質又はマウス FAP タンパク質を癌細胞表面において飽和させた。各 VHH について得られた EC₅₀ 値を表 8 に示す。これらのデータから、VHH B1 及び B2 の両方は、^{99m}Tc による放射性標識後にヒト FAP 細胞表面タンパク質及びマウス FAP 細胞表面タンパク質の両方に結合するそれらの能力を維持することが示される。非ターゲティング対照 VHH R3B23 (配列番号 32；Lemaire ら (2014 年)「Leukemia」第 28 巻 (第 2 号)：第 444～447 頁) は、評価した 3 つの細胞株のいずれに対しても関連する結合を明らかにしなかった。本発明者らは、^{99m}Tc 標識 VHH B4 はマウス FAP 細胞表面タンパク質にのみ結合する一方、VHH B3 はインビトロでヒト FAP 細胞表面分子にのみ結合することを確認した。

40

【0443】

50

【表 10】

表 8. 3 つの異なる細胞株: ヒト FAP 発現 HEK-293 細胞及び GM05389 細胞、並びにマウス FAP 発現 HEK-293 細胞に対する VHH の得られた EC50。データを平均±SD として表す(n=3)。

	EC50(平均±SD、nM)		
VHH	GM05389 ヒト FAP	HEK-293 ヒト FAP	HEK-293 マウス FAP
B1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.3	5.8 ± 0.4
B2	3.2 ± 0.5	13.0 ± 3.5	139.1 ± 30.0
B3	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.4	結合なし
B4	結合なし	結合なし	7.6 ± 0.5
R3B23	結合なし	結合なし	結合なし

10

【0444】

異なる ^{99}mTc 標識ヒトのみ、マウスのみ又はヒト／マウス交差反応性 FAP ターゲティング VHH を、解剖研究を介して正常雌 C57BL／6 マウスにおいてインビボで評価した。マウス（VHH 当たり $n=3$ ）に約 1mCi （ $\pm 4\mu\text{g}$ ）の ^{99}mTc 標識 VHH を静脈内注射した。次に、心臓穿刺によって血液を採取し、その後、注射の 1 時間後に頸椎脱臼によってマウスを安楽死させた。マウスを解剖し、異なる器官及び組織を収集した。目的の器官及び組織を秤量し、ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は % 注入活性（IA）／g 組織として表した。

20

【0445】

これらのデータから、VHH B1、B2 及び（B4）は、 ^{99}mTc による放射性標識後にマウス FAP と結合するそれらの能力を維持し、循環 FAP を発現及び／又は含有するいくつかの器官及び組織、例えば血液、リンパ節、骨、子宮、脾臓、皮膚及び筋肉などにおける放射能の高い保持が示される（Keane ら（2014 年）「FEB S Open Bio」第 4 巻第 43～54 頁）。（マウス FAP を結合させるための尺度としての）保持の程度は、マウス FAP に対するそれらの対応する結合親和性と一致する（ $B4 > B1 > B2$ ）。非ターゲティング対照の VHH R3B23 は、マウス FAP のいかなる関連するターゲティングも明らかにしなかった。 ^{99}mTc 標識 His6 タグ付けヒト FAP ターゲティング VHH B3 は、非ターゲティング放射性標識 His6 タグ付け VHH に典型的であるマウスにおける体内分布を明らかにした（表 9）。腎臓を除く全ての器官及び組織において、低放射性シグナルを測定した。

30

【0446】

40

50

【表 1 1】

表 9. 正常雌 C57BL/6 マウスにおける、 ^{99m}Tc 標識 His₆ タグ付け VHH B2、B1、B3、B4、及び非ターゲティング対照 R3B23 の注射 1 時間後の解剖から得られた、様々な器官及び組織における取込み。データを%IA/g として表し、平均±SD として表した(n=3)。

	^{99m}Tc -B2		^{99m}Tc -B1		^{99m}Tc -B3		^{99m}Tc -B4		^{99m}Tc -R3B23	
器官/組織	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0.97	0.09	2.52	0.03	0.59	0.11	2.74	0.18	0.89	0.30
リンパ節	1.27	0.19	4.54	0.23	0.56	0.09	3.30	0.35	0.60	0.27
心臓	0.38	0.04	0.78	0.01	0.29	0.08	0.91	0.07	0.36	0.09
肺	0.84	0.07	1.35	0.26	0.73	0.12	1.30	0.22	0.80	0.13
肝臓	1.18	0.14	1.59	0.14	0.77	0.04	0.90	0.08	0.54	0.06
膵臓	0.39	0.04	1.27	0.13	0.21	0.04	1.49	0.13	0.23	0.01
脾臓	0.50	0.04	0.82	0.15	0.30	0.03	0.67	0.05	0.29	0.01
副腎	1.05	0.23	2.75	0.40	0.55	0.12	2.13	0.29	0.51	0.43
腎臓	242.15	15.68	244.68	29.15	408.44	95.18	50.83	5.97	334.43	114.92
胃	1.50	0.06	1.62	0.17	0.88	0.08	1.05	0.19	1.09	0.16
小腸	0.55	0.06	1.67	0.07	0.31	0.05	0.89	0.18	0.35	0.08
大腸	0.53	0.05	1.01	0.09	0.49	0.12	0.89	0.05	0.43	0.08
子宮	1.51	0.31	2.69	0.72	0.72	0.23	2.86	0.55	0.62	0.05
皮膚	0.66	0.13	1.27	0.03	0.58	0.07	1.89	0.20	0.46	0.16
筋肉	0.46	0.21	0.94	0.16	0.22	0.12	1.38	0.17	0.26	0.12
骨	1.26	0.13	3.41	0.45	0.22	0.04	3.81	0.87	0.45	0.39
脳	0.05	0.01	0.08	0.02	0.03	0.02	0.09	0.02	0.02	0.01

【0 4 4 7】

いくつかの器官及び組織で観察された取り込み上昇が特異的ターゲティングに起因するものであるかどうかを評価するために、 ^{99m}Tc 標識 VHH B1 を単独で且つ 100 倍モル過剰の非標識 VHH B1 と組み合わせて、健康な雌 C57BL/6 マウスに投与し、その後、その体内分布を解剖研究によって評価した。マウス（条件当たり n=3）に約 1 mCi ($\pm 4 \mu\text{g}$) の ^{99m}Tc 標識 VHH を静脈内注射した。トレーサ投与の 30 分前に、非標識 VHH 又は等量のビヒクル溶液を投与した。次に、心臓穿刺によって血液を採取し、その後、注射の 1 時間後に頸椎脱臼によってマウスを安楽死させた。マウスを解剖し、単離した目的の器官及び組織を秤量し、ガンマカウンタを注射標準と共に用いて放射能を測定した。結果は%注入活性 (IA) / g 組織として表した。結果は、血液、リンパ節、骨、子宮、膵臓、皮膚及び筋肉における取込みの上昇が非標識 VHH B1 との同時投与によって完全に減少することを示し (表 10)、これは、取込みの上昇が、非特異

【0 4 4 8】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 10. 正常雌 C57BL/6 マウスにおける、 ^{99m}Tc 標識 His₆ タグ付け VHH B1単独の及び 100倍モル過剰の非標識 VHHと合わせた注射 1時間後の解剖から得られた、様々な器官及び組織における取込み。データを%IA/gとして表し、平均±SDとして表した(n=3)。

器官/組織	^{99m}Tc -B1		^{99m}Tc -B1+100 倍過剰の 非標識 B1	
	平均	SD	平均	SD
血液	1,90	0,27	0,78	0,10
リンパ節	3,19	0,28	0,64	0,23
心臓	0,75	0,05	0,37	0,15
肺	1,01	0,13	0,72	0,09
胆嚢	3,01	0,52	1,32	0,52
肝臓	1,05	0,20	0,81	0,01
膵臓	1,39	0,13	0,24	0,01
脾臓	0,59	0,09	0,35	0,03
副腎	2,39	0,42	0,75	0,02
腎臓	198,25	31,22	233,90	14,29
胃	1,19	0,11	0,87	0,03
小腸	0,92	0,40	0,61	0,09
大腸	0,94	0,11	0,45	0,07
子宮	2,83	0,45	0,93	0,08
皮膚	1,92	0,26	0,75	0,06
筋肉	1,15	0,12	0,29	0,02
骨	2,54	0,23	0,35	0,06
脳	0,07	0,00	0,03	0,00

10

20

【0 4 4 9】

実施例 5：

30

この実施例において、本発明者らは、正常な C 5 7 B L / 6 マウス及びホモ接合ヒト F A P ノックインマウスの両方並びに創傷治癒を受けるマウスにおいて、診断用放射性同位体 ^{99m}Tc (実施例 3 に記載されるような) による放射性標識後、関連するヒト F A P 発現又はマウス F A P 発現を測定するためのヒトのみ又はヒト / マウス交差反応性 F A P ターゲティング V H H の可能性を記載する。

【0 4 5 0】

実施例 5 a .

この実施例の最初の部分において、ヒト / マウス交差反応性 F A P ターゲティング V H H B 1、マウス F A P ターゲティング V H H B 4 及び非ターゲティング対照 V H H R 3 B 2 3 の体内分布を、正常な雌 C 5 7 B L / 6 マウス及びホモ接合型ヒト F A P ノックインマウスの両方において評価した。全てのマウスに、約 1 m C i (± 4 μ g) の ^{99m}Tc 標識 V H H を尾静脈内注射した。次に、マウスを 1 . 5 時間後に頸椎脱臼によって安楽死させ、解剖し、その後、異なる器官及び組織を収集した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は % 注入活性 (I A) / g 組織として表した。

40

【0 4 5 1】

結果は、マウス F A P を両方とも標的とする、 ^{99m}Tc 標識 B 1 及び B 4 の i . v . 投与後の、正常マウスの血液、リンパ節、骨、子宮、膵臓、皮膚及び筋肉における取込みの上昇を示す (表 1 1) 。 ^{99m}Tc - R 3 B 2 3 の場合、取込みの上昇はない。この観察結果は、正常なマウスでは、マウス F A P が血流中に活発に排出され、それにより、血

50

中並びに高度に灌流された器官及び組織における高いトレーサ取込みがもたらされるという事実によって説明され得る（K e a n e ら（2014年）「F E B S O p e n B i o」第4巻第43～54頁）。ヒト／マウス交差反応性F A P ターゲティングV H H B 1 がホモ接合体ヒトF A P ノックインマウスにi . v . 投与される場合、この上昇した取り込みが存在せず、ヒトF A P がその程度まで排出されないことを示し、これは、ヒトの状況を正確に表す。

【0452】

【表13】

表 11. 野生型 C57BL/6 マウス(WT)及びホモ接合体ヒト FAP ノック・イン・マウス(KI)の両方における、^{99m}Tc 標識 His₆ タグ付け VHH の注射の 1.5 時間後の解剖から得られた、異なる器官及び組織における取込み。データを%IA/g として表し、平均±SD として表した(n=3)。

器官	WT マウスに おける ^{99m} Tc-B1		KI マウスに おける ^{99m} Tc-B1		WT マウスに おける ^{99m} Tc-B4		KI マウスに おける ^{99m} Tc-B4		WT マウスに おける ^{99m} Tc- R3B23		KI マウスに おける ^{99m} Tc- R3B23	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	1,81	0,07	0,77	0,07	2,74	0,18	0,54	0,03	0,89	0,3	0,5	0,07
リンパ節	3,26	1,63	0,23	0,03	3,3	0,35	0,23	0,07	0,6	0,27	0,14	0,09
脾臓	1,38	0,11	0,2	0,02	1,49	0,13	0,14	0,01	0,23	0,01	0,12	0,01
子宮	2,07	1,02	0,87	0,06	2,86	0,55	0,76	0,14	0,62	0,05	0,61	0,14
皮膚	1,68	0,74	0,89	0,17	189	0,2	0,63	0,12	0,46	0,16	0,64	0,21
筋肉	0,65	0,24	0,2	0,03	1,38	0,17	0,15	0,04	0,26	0,12	0,11	0,01
骨	2,2	0,51	0,42	0,02	3,81	0,87	0,25	0,07	0,45	0,39	0,13	0,01

【0453】

実施例 5 b .

第2に、線維芽細胞が創傷治癒のプロセスに関与することが知られている（G i e s e l ら（2019年）「J N u c l M e d」第60巻（第3号）：第386～392頁；D i e n u s K ら、「A r c h D e r m a t o l R e s .」（2010年12月）；第302巻（第10号）：第725～31頁；G a o Y ら、「F a Y i X u e Z a Z h i .」（2009年12月）；第25巻（第6号）：第405～8頁）。本発明者らは、この現象を利用して、F A P 発現線維芽細胞を可視化するための^{99m}Tc 標識V H H の診断能を更に支持した。これに対して、野生型C 5 7 B L / 6 マウス及びホモ接合体ヒトF A P ノックインマウスの両方は、腰背部に小さい切開を受け、これを直ちに縫合した。1日後、全てのマウスに、約1mCi（±4μg）の^{99m}Tc 標識V H H を尾静脈内注射した。次に、V e c t o r ⁺ / C T M I L a b s システムを用いてトレーサ投与の1時間後にS P E C T / C T を行い、続いて1.5時間後に剖検研究を行った。S P E C T / C T イメージングは、S P E C T コリメータ及び6つのベッド位置のスパイラルスキャンモードを用いて行った（位置当たり2.5分）。C T については、1つの位置のみの通常スキャンモードを使用した。得られたS P E C T データは、0.4ボクセルサイズ、2サブセット及び4反復で再構成され、その後、画像は統合され、C T スキャンに基づいて減衰のために補正される。医用画像データ分析ツール（アミド）を用いて画像を分析する。器官及び組織の選択における取込み値を分析し、cm³当たりの%注入活性（% I A / c c）として表した。

【0454】

次に、マウスを1.5時間後に頸椎脱臼によって安楽死させ、解剖し、その後、異なる器官及び組織を収集した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は%注入活性（I A）／g 組織として表した。

【0455】

以下の表7及び表8に記載される結果は、ヒト／マウスF A P 交差反応性V H H B 1

が野生型 C 5 7 B L / 6 マウスにおけるインビボでのマウス F A P 発現線維芽細胞及びホモ接合型ヒト F A P ノックインマウスにおけるヒト F A P 発現線維芽細胞の治癒創傷で特異的に結合することを示す。解剖を介して得られた取り込み値は、ホモ接合型ヒト F A P ノックインマウスの治癒創傷において、マウス F A P 特異的 V H H B 4 ($p = 0.0044$) 及び非ターゲティング対照 V H H R 3 B 2 3 ($p = 0.0055$) について測定されたものと比較して有意に高かった。ノックインマウス及び野生型マウスにおける治癒創傷におけるヒト / マウス F A P 交差反応性 B 1 の取込みは、それぞれ対応のない t 検定によって決定されるように、有意に異ならなかった ($p = 0.1756$) 。

【 0 4 5 6 】

【表 1 4 】

10

表 12. 野生型 C57BL/6 マウス(WT)及びホモ接合体ヒト FAP ノック・イン・マウス(KI)の両方における、 ^{99m}Tc 標識 His₆ タグ付け VHH の注射の 1 時間後の SPECT/CT イメージングから得られた、異なる器官及び組織における取込み。データを %IA/cc として表し、平均 $\pm$ SD として表した(n=3)。

器官	^{99m}Tc -B1 WT マウスに おける		^{99m}Tc -B1 KI マウスに おける		^{99m}Tc -B4 KI マウスに おける		^{99m}Tc -R3B23 KI マウスに おける	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
心臓	0,80	0,03	0,22	0,04	0,23	0,03	0,27	0,07
肺	0,65	0,04	0,15	0,05	0,17	0,01	0,15	0,04
腎臓	78,53	2,43	101,66	8,94	22,54	2,72	84,70	29,32
関節	1,72	0,12	0,27	0,06	0,22	0,03	0,19	0,06
骨	0,82	0,09	0,13	0,07	0,10	0,08	0,15	0,06
創傷	1,21	0,01	0,45	0,24	0,13	0,03	0,15	0,03
筋肉	0,50	0,02	0,10	0,01	0,10	0,06	0,15	0,06
肝臓	0,76	0,04	0,33	0,05	0,26	0,01	0,28	0,02

20

【 0 4 5 7 】

30

40

50

【表 15】

表 13. 野生型 C57BL/6 マウス(WT)及びホモ接合体ヒト FAP ノック・イン・マウス(KI)の両方における、 ^{99m}Tc 標識 His₆ タグ付け VHH の注射の 1.5 時間後の解剖から得られた、異なる器官及び組織における取込み。データを %IA/g として表し、平均±SD として表した (n=3)。

器官	^{99m}Tc -B1 WT マウスに おける		^{99m}Tc -B1 KI マウスに おける		^{99m}Tc -B4 KI マウスに おける		^{99m}Tc -R3B23 KI マウスに おける	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	1,81	0,07	0,77	0,07	0,54	0,03	0,50	0,07
リンパ節	3,26	1,63	0,23	0,03	0,23	0,07	0,14	0,09
胸腺	0,61	0,25	0,22	0,05	0,12	0,03	0,13	0,02
心臓	0,75	0,05	0,34	0,03	0,24	0,03	0,22	0,01
肺	1,06	0,17	0,85	0,05	0,73	0,05	0,53	0,02
胆嚢	0,92	0,20	0,86	0,40	0,30	0,04	1,27	0,74
肝臓	1,27	0,36	0,82	0,21	0,57	0,03	0,40	0,02
膵臓	1,38	0,11	0,20	0,02	0,14	0,01	0,12	0,01
脾臓	0,61	0,11	0,39	0,03	0,29	0,01	0,23	0,02
副腎	1,91	0,39	0,48	0,09	0,39	0,13	0,28	0,00
腎臓	270,42	138,31	399,96	39,56	76,80	9,53	334,82	17,17
胃	0,87	0,16	0,51	0,06	0,60	0,24	0,37	0,03
小腸	0,55	0,03	0,37	0,04	0,26	0,01	0,24	0,02
大腸	0,82	0,07	0,43	0,04	0,30	0,02	0,34	0,02
卵巣	1,90	0,42	0,73	0,13	0,68	0,18	0,64	0,23
子宮	2,07	1,02	0,87	0,06	0,76	0,14	0,61	0,14
皮膚	1,68	0,74	0,89	0,17	0,63	0,12	0,64	0,21
筋肉	0,65	0,24	0,20	0,03	0,15	0,04	0,11	0,01
骨	2,20	0,51	0,42	0,02	0,25	0,07	0,13	0,01
関節	3,51	0,81	0,83	0,04	0,41	0,05	0,33	0,03
脳	0,07	0,02	0,03	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
創傷	2,36	0,82	1,17	0,10	0,59	0,05	0,58	0,10

10

20

30

【0458】

実施例 6：放射性標識 VHH の診断的使用

この実施例において、本発明者らは、診断用放射性同位体 ^{99m}Tc 及び ^{111}In による放射性標識後、関連するヒト FAP 発現又はマウス FAP 発現を可視化するそれらの能力を調べることにより、ヒトのみ又はヒト／マウス交差反応性 FAP ターゲティング VHH の診断能を記載する（実施例 3 に記載されるように）。診断能は、マウス FAP を発現する天然浸潤癌関連線維芽細胞を有するヒト MDA-MB-231 腫瘍を保有する無胸腺ヌードマウス及びヒト FAP 受容体を発現する HEK-293 腫瘍を保有する無胸腺ヌードマウスにおいて確認される。

40

【0459】

実施例 6 a .

この実施例の最初の部分において、 ^{99m}Tc 標識されたヒト／マウス交差反応性 FAP ターゲティング VHH B1 及び B2 の診断能を、マウス FAP 特異的 VHH B4、非ターゲティング対照 VHH R3B23 及びヒト FAP ターゲティング VHH B3 と共に、自然浸潤癌関連線維芽細胞がマウス FAP を発現する MDA-MB-231 腫瘍を有

50

する無胸腺ヌードマウスにおいて評価した。

【0460】

これを行うために、無胸腺ヌードマウス（VHH当たり $n=3$ ）に、Matrigelにおいて 10×10^6 個のMDA-MB-231細胞を接種した。腫瘍成長の検証（約 200 mm^3 の平均サイズ）後、マウスに約 1 mCi （ $\pm 4\text{ }\mu\text{g}$ ）の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識VHHを尾静脈内注射した。次に、上記のように、Vector⁺/CTMILabsシステムを用いてトレーサ投与の1時間後にSPECT/CTを行い、続いて1.5時間後に剖検研究を行った。

【0461】

結果は、マウスFAP特異的VHH B4及びヒト/マウスFAP交差反応性VHH B1の両方がMDA-MB-231腫瘍に特異的に蓄積したが、この組織における取込みの上昇は、ヒト/マウスFAP交差反応性VHH B2についてはより低く、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識非ターゲティング対照VHH R3B23及びヒトFAP特異的VHH B3については存在せず、これは、マウスFAPに対するこれらのVHHの対応する親和性と一致することを示す。一元配置分散分析多重比較（ $p < 0.05$ ）によって示されるように、マウスFAP特異的VHH B4及びヒト/マウスFAP交差反応性VHH B1の両方の特異的蓄積は、追加的な評価されたVHHと比較して有意に高かった（表#9及び表##10）。これは、VHHが、マウスFAP受容体をターゲティングすることにより、正常マウスにおける癌関連線維芽細胞を可視化できることを示す。本発明者らは、VHH B1も高い結合親和性でヒトFAPに結合することを知っているため、これは、重要な知見である。したがって、交差反応性のヒト/マウスFAPターゲティングVHH B1は、ヒトの状況においてヒトFAP発現腫瘍関連線維芽細胞もターゲティングするであろうと仮定することが好適である。

【0462】

【表16】

表 14. MDA-MB-231 腫瘍を保有する無胸腺ヌードマウスにおける $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識 His₆ タグ付け VHH の注射 1 時間後の SPECT/CT イメージングから得られた、様々な器官及び組織における取込み。データを%IA/ccとして表し、平均±SDとして表した($n=3$)。

器官/組織	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2		$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B1		$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -R3B23		$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B3		$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B4	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
腎臓	65,02	2,22	58,25	11,32	71,82	4,49	80,24	2,86	15,15	1,65
心臓	0,37	0,07	0,65	0,09	0,27	0,09	0,14	0,02	0,92	0,14
肺	0,30	0,06	0,54	0,10	0,23	0,10	0,12	0,03	0,84	0,02
肝臓	0,37	0,04	0,52	0,10	0,25	0,05	0,23	0,02	0,71	0,09
筋肉	0,20	0,06	0,54	0,05	0,04	0,02	0,07	0,01	0,69	0,14
腫瘍	0,34	0,06	0,86	0,11	0,15	0,01	0,15	0,03	1,38	0,27

【0463】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 15. MDA-MB-231 腫瘍を保有する無胸腺ヌードマウスにおける ^{99m}Tc 標識 His₆ タグ付け VHH の注射 1.5 時間後の解剖から得られた、様々な器官及び組織における取込み。データを %IA/g として表し、平均±SD として表した(n=3)。

器官/組織	^{99m}Tc -B2		^{99m}Tc -B1		^{99m}Tc -R3B23		^{99m}Tc -B3		^{99m}Tc -B4	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0,41	0,06	0,83	0,19	0,46	0,22	0,24	0,03	1,38	0,13
リンパ節	0,78	0,54	3,98	1,46	0,32	0,11	0,26	0,03	2,76	1,71
心臓	0,24	0,03	0,42	0,10	0,20	0,07	0,12	0,01	0,60	0,05
肺	0,49	0,08	0,58	0,09	0,43	0,12	0,29	0,03	0,79	0,09
肝臓	0,59	0,04	0,69	0,05	0,41	0,08	0,49	0,05	0,82	0,11
脾臓	0,16	0,02	0,64	0,23	0,14	0,05	0,08	0,00	0,94	0,10
脾臓	0,18	0,01	0,24	0,03	0,15	0,04	0,11	0,01	0,38	0,03
副腎	0,34	0,03	1,02	0,38	0,29	0,07	0,18	0,03	0,96	0,13
腎臓	191,74	2,74	169,55	25,44	219,80	3,07	249,34	26,52	36,96	0,64
胃	0,67	0,58	0,60	0,45	0,53	0,17	0,32	0,15	0,58	0,04
小腸	0,31	0,10	0,30	0,09	0,22	0,05	0,14	0,02	0,42	0,17
大腸	0,38	0,09	0,41	0,08	0,30	0,09	0,18	0,04	0,45	0,02
子宮	0,77	0,26	1,40	0,49	0,32	0,05	0,22	0,16	1,88	0,50
皮膚	0,63	0,09	1,91	0,72	0,36	0,10	0,26	0,02	2,49	0,20
筋肉	0,25	0,01	0,78	0,25	0,14	0,08	0,08	0,01	0,94	0,15
骨	0,33	0,10	0,62	0,39	0,14	0,06	0,10	0,05	1,74	0,39
腫瘍	0,57	0,11	0,99	0,47	0,31	0,01	0,36	0,07	1,71	0,27
脳	0,02	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,07	0,03

10

20

【0464】

実施例 6 b .

第 2 に、非タグ付けのヒト／マウス FAP 交差反応性 VHH B1 を ^{111}In で放射性標識し、その後、そのインビトロ及びインビボ診断能を評価した。得られた放射性コンジュゲートの結合能を評価して、これが VHH のアミノ酸配列への ^{111}In -DOTA のコンジュゲーションによって影響されないことを確認した。これを行うために、ヒト FAP 発現 GM05389 細胞を、0 nM ~ 33 nM の範囲にわたる ^{111}In 標識 VHH の濃度を有する段階希釈物によりインキュベーションした。非特異的結合を評価するために、100 倍過剰の対応する非標識 VHH を並行して加えて、癌細胞上に発現されるヒト FAP 受容体を飽和させた。0.6 ± 0.08 nM の EC50 が得られたため、ヒト FAP 受容体への結合は妨げられなかった。

30

【0465】

^{111}In で放射性標識された非タグ付けヒト FAP／マウス FAP 交差反応性 VHH B1 のインビボ診断能を、ヒト FAP 受容体を発現する HEK-293 腫瘍を有する無胸腺ヌードマウスにおいて評価した。これに対して、無胸腺ヌードマウス（時点当たり n = 4）の首にヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍成長（約 100 ~ 200 mm³ のサイズ）の検証後、全てのマウスに約 450 µCi (± 7 µg) の ^{111}In 標識 VHH を尾静脈内注射した。マイクロ SPECT／CT イメージングを、MILabs VECToR⁺／CT システムを用いてトレーサ注入の 1 時間、4 時間及び 24 時間後に行った。手短に言えば、ラット SPECT コリメータ及び 6 つのベッド位置（位置当たり 3 分）のスパイラルスキャンモードを用いてイメージングを行った。CT については、1 つの位置のみの通常スキャンモードを使用した。得られた Micro-SPECT／CT データは、0.4 ボクセルサイズ、2 サブセット及び 4 反復で再構成され、その後、画像は統合され、CT スキャンに基づいて減衰のために補正される。医用画像データ分析ツール（アミド）を用いて画像を分析する。器官及び組織における取込み値を分析

40

50

し、 cm^3 当たりの % 注入活性 ($\% \text{IA} / \text{cc}$) として表した。最後に、各スキャン後にマウスを 殺し、上記のように処理した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は % 注入活性 (IA) / g 組織として表した。

【0466】

結果は、 ^{111}In 標識された VHH B1 が、ヒト FAP を発現する腫瘍に特異的に蓄積することを示した。腫瘍における取込みは経時的に一貫しており、1 時間後に約 $2.52 \pm 0.16 \% \text{IA} / \text{g}$ 及び $1.01 \pm 0.18 \% \text{IA} / \text{cc}$ 並びに 24 時間後に約 $1.90 \pm 0.65 \% \text{IA} / \text{g}$ 及び $0.74 \pm 0.58 \% \text{IA} / \text{cc}$ の値を示した (表 16 及び表 17)。

10

【0467】

VHH B1 は、 ^{111}In による放射性標識後にマウス FAP と結合するその能力を維持し、循環するマウス FAP を発現及び／又は含有するいくつかの器官及び組織 (例えば、血液、リンパ節、骨、子宮、脾臓、皮膚及び筋肉など) における放射能の高い保持を伴った (実施例 4 f に合致)。上述の器官及び組織におけるこの取り込みは経時的に減少し、注射 24 時間後のバックグラウンド値に近かった。

【0468】

【表 18】

表 16. ヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍を有するマウスにおける、 ^{111}In 標識非タグ付け B1 の注射 1 時間、4 時間、及び 24 時間後の SPECT/CT イメージングから得られた、種々の器官及び組織における取込み。データを $\% \text{IA} / \text{cc}$ として表し、平均 $\pm$ SD として表した ($n=3$)。

20

%IA/cc	1 時間 pi		4 時間 pi		24 時間 pi	
器官/組織	平均	SD	平均	SD	平均	SD
腫瘍	1.01	0.18	0.94	0.60	0.74	0.58
腎臓	7.92	1.13	8.95	0.87	4.37	0.63
肝臓	0.40	0.08	0.21	0.03	0.09	0.01
心臓	0.62	0.12	0.19	0.04	0.04	0.002
肺	0.49	0.06	0.20	0.05	0.04	0.01
関節	1.29	0.17	0.75	0.05	0.25	0.01
骨	0.84	0.21	0.54	0.16	0.11	0.02
筋肉	0.42	0.16	0.33	0.07	0.07	0.01

30

【0469】

40

50

【表 19】

表 17. ヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍を有するマウスにおける ^{111}In 標識非タグ付け B1 の注射の 1.5 時間後、4.5 時間後、及び 24.5 時間後に解剖から得られた、種々の器官及び組織における取込み。データを %IA/g として表し、平均±SD として表した(n=3)。

%IA/g	1.5 時間 pi		4.5 時間 pi		24.5 時間 pi	
器官/組織	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0.85	0.22	0.31	0.10	0.02	0.002
リンパ節	2.21	0.64	1.23	0.65	0.31	0.07
心臓	0.34	0.09	0.13	0.01	0.04	0.002
肺	0.48	0.05	0.20	0.05	0.06	0.01
胆嚢	0.26	0.13	0.18	0.05	0.06	0.01
肝臓	0.35	0.02	0.31	0.05	0.17	0.01
膵臓	0.47	0.12	0.18	0.03	0.04	0.003
脾臓	0.20	0.04	0.12	0.02	0.07	0.004
副腎	0.64	0.12	0.33	0.01	0.09	0.01
腎臓	20.96	1.52	26.42	2.81	15.08	1.46
胃	0.43	0.25	0.15	0.02	0.04	0.003
小腸	0.23	0.04	0.12	0.02	0.04	0.004
大腸	0.33	0.06	0.23	0.11	0.05	0.004
卵巣	0.80	0.13	0.38	0.10	0.14	0.04
子宮	1.57	0.28	0.74	0.13	0.53	0.20
皮膚	1.77	0.15	1.14	0.12	0.34	0.02
筋肉	0.67	0.06	0.50	0.14	0.11	0.01
骨	1.42	0.45	0.72	0.25	0.31	0.01
関節	2.32	0.45	1.39	0.18	0.58	0.08
腫瘍	2.52	0.16	2.04	0.57	1.90	0.65
脳	0.04	0.01	0.02	0.01	0.004	0.001

【0470】

実施例 7： ^{131}I で標識された VHH のセラノスティック使用

セラノスティック使用とは、1つの同じ標識化合物が診断用途と治療用途との両方に適用可能である能力を指す。この実施例では、本発明者らは、ヒト FAP / マウス FAP 交差反応性 VHH B1 (その His₆ タグ付けバージョン及びその非タグ付けバージョンの両方)、ヒト FAP / マウス FAP 交差反応性 VHH B2 及びマウス FAP 特異的 VHH B4 のセラノスティック能を、(実施例 3 に記載されるように) セラノスティック放射性核種 ^{131}I による放射性標識後のそれらのターゲティング能を調べることによって記載する。セラノスティック能を、ヒト FAP 発現細胞に結合するそれらの能力 (飽和結合及び細胞保持) によってインビトロで及び関連するマウスモデルにおけるそれらの体内分布を評価することによってインビボで評価する。

【0471】

実施例 7a.

第 1 の部分では、インビトロ挙動を、それらの細胞結合及び保持を経時的に調べることによって評価した。得られた放射性コンジュゲートの結合能を評価して、これが VHH のアミノ酸配列への ^{131}I - SGMIB の導入によって影響されないことを確認した。これに向けて、ヒト FAP 発現 GM05389 (His₆ タグ付け及び非タグ付け VHH B1) 及びヒト FAP トランスフェクト HEK-293 細胞 (His₆ タグ付け及び非タグ付け VHH B1 ; His₆ タグ付け VHH B2) を、0 nM ~ 33 nM の範囲にわ

たる様々な ^{131}I 標識VHHの濃度を有する段階希釈物と共にインキュベートした。非特異的結合を評価するために、100倍過剰の対応する非標識VHHを並行して加えて、癌細胞上に発現されるヒトFAP受容体を飽和させた。

【0472】

全ての ^{131}I 標識化VHHがヒトFAP発現GM05389細胞及びHEK-293細胞に対する細胞結合実験において匹敵する用量応答曲線を示し、これは、 ^{131}I 標識化が結合能に影響を及ぼさなかったことを示す。GM05389細胞の場合、His6タグ付けB1及び非タグ付けB1について、それぞれ 0.6 ± 0.1 及び 2.7 ± 0.1 nMのEC50値が得られた一方、HEK-293では、His6タグ付けB1、非タグ付けB1及びHis6タグ付けB2について、それぞれ 1.4 ± 0.5 、 2.8 ± 0.7 及び 3.8 ± 3.3 nMのEC50値が観察された。

10

【0473】

^{131}I 標識His6タグ付けB1及び非タグ付けB1のインビトロ細胞保持を、ヒトFAP発現GM05389細胞で評価した。この特定の場合、細胞を10 nMの ^{131}I 標識VHHと共に4℃で1時間インキュベートし、その後、未結合画分を収集した。100倍過剰の対応する非標識VHHを添加して、非特異的結合を評価した。次に、細胞を新鮮な培地と共に37℃で最大24時間インキュベートし、その後、解離した画分を収集した。その後、細胞を0.05 MグリシンpH 2.8で洗浄して、膜結合画分を収集した。最後に、細胞を室温で1 M NaOHで可溶化して、内在化した画分を収集した。膜結合画分及び内在化画分の合計は、全細胞随伴性画分に対応する。

20

【0474】

His6タグ付けB1及び非タグ付けB1の両方は、ヒトFAP受容体に結合すると、非常に高いレベルの細胞随伴性活性を経時的に明らかにする。24時間のインキュベーション後、初期結合活性（それぞれ非タグ付け及びHis6タグ付けB1について）の約80%及び70%が依然として腫瘍細胞上に保持され、交差反応性ヒト／マウスFAPターゲティングVHH B1の広範で維持されたターゲティング能力を反映した（図5）。この特徴は、標的細胞をその細胞傷害性ペイロードに長時間曝露することを可能にするため、VHHを用いる治療用途にとって非常に重要である。

【0475】

実施例7b.

30

次に、 ^{131}I 標識されたB1、B2及びB4のセラノスティック能を、ヒトFAPを発現するHEK-293腫瘍を有するマウスにおいて評価した。これに対して、無胸腺ヌードマウス（時点当たりn=3）の首にヒトFAP発現HEK-293腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍成長（約100～200 mm³のサイズ）の検証後、全てのマウスに約400 µCi（±25 µg）の ^{131}I 標識VHHを尾静脈内注射した。マイクロSPECT／CTイメージングを、MILabs VECTOr⁺／CTシステムを用いて、D'Huyvetterら、「Clin Cancer Res.」（2017年11月1日）；第23巻（第21号）：第6616～6628頁に記載される手順に従って、トレーサ注入の2時間後に行った。手短に言えば、マウスPETコリメータ及び94ベッド位置（位置当たり19秒）のスパイラルスキャンモードを用いてイメージングを行った。CTについては、1つの位置のみの通常スキャンモードを使用した。得られたMicro-SPECT／CTデータは、0.6ボクセルサイズ、2サブセット及び7反復で再構成され、その後、画像は、統合され、CTスキャンに基づいて減衰のために補正される。医用画像データ分析ツール（アミド）を用いて画像を分析する。器官及び組織における取込み値を分析し、cm³当たりの%注入活性（%IA／cc）として表した。最後に、マウスを2.5時間後に殺し、上記のように処理した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は%注入活性（IA）／g組織として表した。

40

【0476】

結果は、ヒトFAP発現HEK-293腫瘍における ^{131}I 標識されたB2及びB1

50

の特異的な蓄積を明らかにした一方、B 4 についてはるかに低い取込みが観察された（表 18 及び表 19）。腫瘍取込みは、B 2、B 1 及び B 4 について、それぞれ 2.96 ± 0.47 、 3.47 ± 0.24 、 1.15 ± 0.44 % IA / g と測定された。リンパ節、子宮及び骨などの全ての追加の器官及び組織における ^{131}I 標識 B 1 の取込みは一致していたが、その ^{131}I 標識バリエーション（実施例 6 b）について見られたものよりも絶対数が少なく、且つ B 4 について観察されたものよりも低かった。2.5 時間後の腎臓での保持は全ての放射性コンジュゲートについて低く、B 2、B 1 及び B 4 について、それぞれわずか 7.95 ± 1.62 、 4.77 ± 1.01 、 18.35 ± 3.07 % IA / g であった。画像定量化は同様の結果を生じた。これは治療指数（腫瘍／腎臓比） 0.45 ± 0.08 と計算される；剖検で得られた B 2、B 1 及び B 4 については、それぞれ 0.65 ± 0.21 、 0.06 ± 0.02 、イメージング定量では、それぞれ 0.6 ± 0.03 、 0.9 ± 0.28 及び 0.13 ± 0.04 の比あった。B 2 及び B 1 の治療指数は、一元配置分散分析によって示されるように、B 4 について得られたものと比較して有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。 ^{131}I 標識 B 1 の治療指数は、 ^{131}I 標識 B 2 について得られた治療指数と比較して、有意ではないが高かった。

10

【0477】

【表20】

表 18. ヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍を有するマウスにおける、 ^{131}I 標識された His₆ タグ付け B2、B1、及び B4 の注射の 2 時間後の SPECT/CT イメージングから得られた、異なる器官及び組織における取込み。データを %IA/cc として表し、平均±SD として表した(n=3)。

20

器官/組織	^{131}I -B2		^{131}I -B1		^{131}I -B4	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
腎臓	3,41	0,22	2,34	0,30	4,66	1,04
心臓	0,14	0,02	0,32	0,02	0,42	0,02
肺	0,18	0,00	0,32	0,00	0,42	0,06
肝臓	0,92	0,10	0,75	0,26	0,44	0,08
筋肉	0,20	0,05	0,35	0,09	0,43	0,08
腫瘍	2,05	0,21	1,98	0,54	0,61	0,26
腫瘍対腎臓比	0,6	0,03	0,9	0,28	0,13	0,04

30

【0478】

40

50

【表 2 1】

表 19. ヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍を有するマウスにおける、 ^{131}I 標識された His₆ タグ付け B2、B1、及び B4 の注射の 2.5 時間後の解剖から得られた、異なる器官及び組織における取込み。データを %IA/g として表し、平均±SD として表した(n=3)。

器官/組織	^{131}I -B2		^{131}I -B1		^{131}I -B4	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0,13	0,03	0,28	0,02	0,75	0,14
リンパ節	0,52	0,21	1,74	0,29	1,86	0,81
甲状腺	0,45	0,15	1,12	0,36	2,18	1,13
心臓	0,16	0,02	0,20	0,01	0,41	0,05
肺	0,27	0,03	0,26	0,04	0,68	0,14
胆嚢	0,45	0,15	0,45	0,32	0,56	0,19
肝臓	1,68	0,21	0,97	0,28	0,66	0,21
脾臓	0,40	0,04	0,45	0,02	0,81	0,28
脾臓	0,41	0,05	0,36	0,16	0,42	0,10
副腎	0,24	0,02	0,42	0,06	0,88	0,12
腎臓	7,95	1,62	4,77	1,01	18,35	3,07
胃	0,26	0,10	0,20	0,01	0,53	0,21
小腸	0,31	0,20	0,18	0,02	0,32	0,06
大腸	0,18	0,01	0,19	0,04	0,34	0,01
子宮	0,31	0,05	0,67	0,19	2,47	1,98
皮膚	0,55	0,24	0,79	0,02	2,05	0,35
筋肉	0,25	0,09	0,41	0,00	0,71	0,10
骨	0,28	0,15	0,70	0,14	1,55	0,57
腫瘍	3,47	0,24	2,96	0,47	1,15	0,44
脳	0,03	0,02	0,03	0,01	0,04	0,01
腫瘍対腎臓比	0,45	0,08	0,65	0,21	0,06	0,02

【0 4 7 9】

実施例 7 c .

次に、 ^{131}I 標識非タグ付け VHH B1 の長期体内分布及び腫瘍ターゲティング能を、ヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍を有するマウスにおいて i . v . 注射後 5 日間にわたって評価した。これに対して、無胸腺ヌードマウス（時点当たり n = 3）の首にヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍成長（ $315.98 \pm 346.80 \text{ mm}^3$ のサイズ）の検証後、全てのマウスに、約 $25 \mu\text{Ci}$ （ $\pm 5 \mu\text{g}$ ）の ^{131}I 標識非タグ付け VHH B1 を尾静脈内注射した。次に、注射の 120 時間後まで頸椎脱臼によってマウスを安楽死させ、解剖し、その後、異なる器官及び組織を収集した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は % 注入活性（IA）／g 組織として表した。

【0 4 8 0】

^{131}I 標識非タグ付け VHH B1 の静脈内注射は、リンパ節、子宮、骨及び皮膚などの器官並びに組織における、わずかに上昇するが一過性の取込み（約 2 ～ 3 % IA／g であるが、経時的に減少する）を明らかにする（表 20）。腎臓の活性の量は、 13.14 ± 3.38 % IA／g の値で 2 時間後に関連したが、24 時間後に 0.5 % IA／g 未満に急速に減少した。腫瘍における取込みは、有意であり、2 時間後の値は、 2.79 ± 1.37 % IA／g であり、24 時間後の腎臓における取込みを上回り、腫瘍における値は、 0.97 ± 0.41 % IA／g であった。全ての他の器官及び組織における取込みは、全ての時点で低かった。

【 0 4 8 1 】

【表 2 2】

表 20: %IA が使用される甲状腺を除いて、組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射後 120 時間までの ^{131}I 標識非タグ付け VHH B1 の様々な器官及び組織における取り込み値。データは平均 $\pm$ SD として提示した(n=3)。

	2 h		4 h		24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
器官/組織	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0.63	0.06	0.40	0.05	0.04	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
リンパ節	2.86	1.16	1.56	0.65	0.18	0.10	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
甲状腺	0.04	0.04	0.04	0.02	0.11	0.04	0.01	0.02	0.07	0.03	0.07	0.02	0.05	0.05
心臓	0.32	0.02	0.26	0.04	0.03	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03
肺	0.49	0.01	0.36	0.03	0.04	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.05	0.08
肝臓	0.87	0.11	0.60	0.04	0.14	0.02	0.07	0.01	0.06	0.00	0.05	0.01	0.06	0.02
膵臓	0.81	0.09	0.50	0.03	0.06	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
脾臓	0.28	0.03	0.24	0.03	0.06	0.02	0.03	0.01	0.02	0.00	0.02	0.01	0.04	0.03
腎臓	13.14	3.38	5.15	0.72	0.47	0.04	0.19	0.01	0.14	0.05	0.08	0.01	0.07	0.03
胃	0.55	0.04	0.33	0.04	0.05	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.03	0.03
小腸	0.50	0.09	0.23	0.05	0.03	0.01	0.05	0.06	0.01	0.00	0.01	0.00	0.03	0.03
大腸	0.38	0.07	0.26	0.07	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.14	0.13
子宮	1.70	0.39	0.95	0.23	0.20	0.12	0.05	0.03	0.02	0.01	0.01	0.00	0.23	0.31
皮膚	2.32	0.25	1.83	0.31	0.40	0.13	0.06	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.04	0.04
筋肉	0.68	0.20	0.67	0.08	0.07	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.07	0.07
骨	1.52	0.24	1.07	0.11	0.18	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.18	0.20
腫瘍	2.79	1.37	2.48	0.94	0.97	0.41	0.31	0.22	0.21	0.23	0.11	0.12	0.16	0.08
脳	0.07	0.02	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02

【 0 4 8 2 】

まとめると、この実施例は、細胞におけるインビトロ及び腫瘍におけるインビボでのヒト FAP 発現のターゲティングが、 ^{131}I 標識交差反応性ヒト FAP / マウス FAP ターゲティング VHH B1 により、その His6 タグ付けフォーマット（配列番号 21）及び非タグ付けフォーマット（配列番号 4）の両方で実行可能であることを示す。インビボ腫瘍ターゲティング能は、追加の器官及び組織における放射能の低い保持と相まって、その治療適用を支持する。

【 0 4 8 3 】

実施例 8: ^{177}Lu で標識された VHH のセラノスティック使用

セラノスティック使用とは、1つの同じ標識化合物が診断用途と治療用途との両方に適用可能である能力を指す。この実施例において、本発明者らは、（実施例 3 に記載されるように）セラノスティック放射性核種 ^{177}Lu による放射性標識後のそのターゲティング能を調べることにより、交差反応性ヒト FAP / マウス FAP ターゲティング非タグ付け VHH B1 のセラノスティック能について記載する。セラノスティック能を、ヒト FAP 発現細胞に結合するその能力（飽和結合及び細胞保持）によってインビトロで及び関連するマウスモデルにおけるその体内分布を評価することによってインビボで評価する。

【 0 4 8 4 】

第 1 の部分では、そのインビトロ挙動を、その細胞結合及び保持を経時的に調べることによって評価した。得られた放射性コンジュゲートの結合能を評価して、これが VHH のアミノ酸配列への ^{177}Lu -DTPA の導入によって影響されないことを確認した。これに対して、ヒト FAP 発現 GM05389 細胞及び HEK-293 細胞を、0 nM ~ 33 nM の範囲にわたる ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1 の濃度を有する段階希釈物とインキュベートした。非特異的結合を評価するために、100 倍過剰の対応する非標識

VHHを並行して加えて、癌細胞上に発現されるヒトFAP受容体を飽和させた。

【0485】

両方の細胞株において、 ^{177}Lu 標識非タグ付けVHH B1の結合は、ヒトFAP発現GM05389細胞及びHEK-293細胞における匹敵する用量応答曲線を明らかにし、これは、 ^{177}Lu -DTPAの導入が結合能に影響を及ぼさなかったことを示す。GM05389細胞の場合、 $0.5 \pm 0.1 \text{ nM}$ のEC50値が得られた一方、HEK-293では、 $0.8 \pm 0.1 \text{ nM}$ のEC50値が観察された。

【0486】

ヒトFAP発現GM05389及びHEK-293細胞について、 ^{177}Lu 標識非タグ付けVHH B1のインビトロ細胞保持を評価した。この特定の場合、細胞を 10 nM の ^{177}Lu 標識非タグ付けB1と共に1時間 4°C でインキュベートし、その後、未結合画分を収集した。 100 倍過剰の対応する非標識VHHを使用して、非特異的結合を評価した。次に、細胞を新鮮な培地と共に 37°C で最大24時間インキュベートし、その後、解離した画分を収集した。その後、細胞を 0.05 M グリシン $\text{pH } 2.8$ で洗浄して、膜結合画分を収集した。最後に、細胞を室温で 1 M NaOHで可溶化して、内在化した画分を収集した。膜結合画分及び内在化画分の合計は、全細胞随伴性画分に対応する。

【0487】

両方の場合、非タグ付けVHH B1は、ヒトFAP受容体に結合する際、経時的に非常に高いレベルの細胞随伴性活性を明らかにする。24時間のインキュベーション後、初期結合活性の約80%及び65%が依然としてHEK-293細胞及びGM05389細胞においてそれぞれ保持され、交差反応性ヒトFAP/マウスFAPターゲティングVHH B1の広範且つ維持されたターゲティング能力を反映した(図6)。この特徴は、標的細胞をその細胞傷害性ペイロードに長時間曝露することを可能にするため、VHHを用いる治療用途にとって非常に重要である。

【0488】

次に、 ^{177}Lu 標識非タグ付けVHH B1の長期体内分布及び腫瘍ターゲティング能を、ヒトFAP発現HEK-293腫瘍を有するマウスにおいてi.v.注射後5日間にわたって評価した。これに対して、無胸腺ヌードマウス(時点当たり $n=3$)の首にヒトFAP発現HEK-293腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍成長($43.67 \pm 26.61 \text{ mm}^3$ のサイズ)の検証後、全てのマウスに約 $80 \mu\text{Ci}$ ($\pm 5 \mu\text{g}$)の ^{177}Lu 標識非タグ付けVHH B1を尾静脈内注射した。次に、注射の120時間後まで頸椎脱臼によってマウスを安楽死させ、解剖し、その後、異なる器官及び組織を収集した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は%注入活性(IA)/g組織として表した。

【0489】

^{177}Lu 標識非タグ付けVHH B1の静脈内注射は、副腎、子宮、骨及び皮膚などの器官及び組織における、わずかに上昇するが一過性の取込み(約2~3%IA/gであるが、経時的に減少する)を明らかにする(表16及び表17)。腎臓での活性の量は、 $94.05 \pm 9.58\%$ IA/gの値で2時間後に関連しており、 ^{131}I 標識VHH B1で観察されたものとは対照的に、経時的に急速に減少しなかった。実際、腎臓での取込みは、24時間後も依然として $31.72 \pm 1.68\%$ IA/gであった。腫瘍への取り込みは有意であり、2時間後に $3.90 \pm 0.35\%$ IA/gの値であり、経時的に高いままであり、24時間後も依然として $2.15 \pm 0.98\%$ IA/gであった。これは、 ^{131}I 標識VHH B1で観察されるものと比較して高い。全ての他の器官及び組織における取込みは、全ての時点で低かった。

【0490】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 21: %IA が使用されるリンパ節を除いて、組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射後 24 時間までの ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1 の異なる器官及び組織における取込み値。データは平均 $\pm$ SD として提示した(n=3)。

器官/組織	1 h		2 h		6 h		24 h	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0.80	0.14	0.69	0.03	0.21	0.03	0.01	0.01
リンパ節	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
心臓	0.35	0.03	0.33	0.03	0.14	0.02	0.05	0.01
肺	0.62	0.03	0.71	0.16	0.30	0.04	0.09	0.02
胆嚢	0.59	0.29	0.77	0.93	0.31	0.23	0.18	0.08
肝臓	0.38	0.03	0.48	0.03	0.47	0.04	0.28	0.01
膵臓	0.62	0.06	0.55	0.02	0.26	0.07	0.07	0.01
脾臓	0.28	0.08	0.23	0.05	0.20	0.01	0.11	0.03
副腎	1.77	0.29	1.49	0.34	0.81	0.14	0.33	0.11
腎臓	81.65	4.86	94.05	9.58	75.68	6.29	31.72	1.68
胃	0.58	0.25	0.40	0.04	0.22	0.03	0.07	0.01
小腸	0.38	0.08	0.27	0.04	0.15	0.04	0.05	0.01
大腸	0.56	0.08	0.41	0.07	0.22	0.08	0.09	0.02
子宮	1.73	0.18	2.26	0.32	1.04	0.51	0.26	0.07
皮膚	2.25	0.37	2.19	0.23	1.39	0.20	0.39	0.06
筋肉	0.78	0.13	0.77	0.21	0.34	0.03	0.06	0.02
骨	1.75	0.52	1.65	0.14	1.02	0.21	0.23	0.02
腫瘍	3.68	0.60	3.90	0.35	5.31	0.12	2.15	0.98
脳	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01

【 0 4 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 22: %IA が使用されるリンパ節を除いて、組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射後 48 時間から 120 時間までの ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1 の異なる器官及び組織における取込み値。データは平均±SD として提示した(n=3)。

器官/組織	48 h		72 h		96 h		120 h	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
リンパ節	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
心臓	0.05	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
肺	0.07	0.01	0.05	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01
胆嚢	0.04	0.04	0.21	0.30	0.03	0.05	0.03	0.04
肝臓	0.20	0.02	0.21	0.04	0.15	0.01	0.11	0.03
膵臓	0.03	0.01	0.04	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01
脾臓	0.09	0.02	0.14	0.11	0.07	0.01	0.06	0.02
副腎	0.35	0.06	0.12	0.08	0.10	0.09	0.09	0.06
腎臓	23.12	4.84	11.86	2.02	6.68	0.78	4.56	1.04
胃	0.05	0.01	0.04	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01
小腸	0.03	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
大腸	0.06	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01
子宮	0.13	0.01	0.11	0.04	0.08	0.04	0.11	0.05
皮膚	0.25	0.04	0.16	0.04	0.14	0.01	0.12	0.03
筋肉	0.05	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02
骨	0.26	0.06	0.31	0.05	0.15	0.08	0.13	0.06
腫瘍	1.54	0.37	1.16	0.38	0.48	0.20	0.44	0.15
脳	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

【0 4 9 2】

150 mg / kg のゲルフシンとの同時投与は、1 時間後に既に得られた 15.58 ± 1.46 % IA / g の腎臓取り込み値に対して、 ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1 の腎臓保持を有意に減少させることができた(表 23)。 ^{177}Lu 標識非ターゲティング対照 VHH R3 B23 の取り込みは、同じ時点で 0.28 ± 0.24 % IA / g のみが測定されたため、腫瘍蓄積は、非常に特異的なままであった。

【0 4 9 3】

10

20

30

40

50

【表 25】

表 23: 組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射 1 時間後の ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1 及び非ターゲティング対照 VHH R3B23 の、異なる器官及び組織における取込み値。データは平均±SD として提示した(n=3)。

器官/組織	^{177}Lu -B1		^{177}Lu -R3B23	
	平均	SD	平均	SD
血液	0.58	0.07	0.13	0.02
リンパ節	2.15	0.83	0.28	0.07
心臓	0.28	0.04	0.10	0.02
肺	0.37	0.04	0.21	0.04
胆嚢	0.86	0.25	0.61	0.37
肝臓	0.27	0.05	0.20	0.04
膵臓	0.68	0.20	0.07	0.01
脾臓	0.17	0.04	0.09	0.01
副腎	0.50	0.05	0.10	0.00
腎臓	15.58	1.46	15.27	0.56
胃	0.37	0.14	0.16	0.02
小腸	0.26	0.07	0.11	0.02
大腸	0.24	0.02	0.17	0.03
子宮	1.15	0.16	0.23	0.07
皮膚	1.90	0.19	0.44	0.04
筋肉	0.61	0.12	0.10	0.01
骨	1.21	0.33	0.07	0.01
腫瘍	2.79	0.42	0.28	0.24
脳	0.03	0.01	0.01	0.00

10

20

【0494】

まとめると、この実施例は、細胞におけるインビトロでのヒト FAP 発現のターゲティング及び腫瘍におけるインビボでのヒト FAP 発現のターゲティングが ^{177}Lu 標識交差反応性ヒト FAP / マウス FAP ターゲティング VHH B1 により実行可能であることを示す。腎臓での取込みがその ^{131}I -SGMB 標識バリエーションについて観察されるレベルに匹敵するレベルまで有意に（ゲロフシンとの同時注射によって）低下し得るという事実と組み合わせられたインビボ腫瘍ターゲティング能は、その治療適用を支持する。

30

【0495】

実施例 9: ^{225}Ac で標識した VHH の治療的使用

この実施例において、本発明者らは、治療用放射性核種 ^{225}Ac による放射性標識後のそのターゲティング能力を調べることにより、交差反応性ヒト FAP / マウス FAP ターゲティング非タグ付け VHH B1 の治療的可能性を記載する（実施例 3 に記載の通り）。治療能を、ヒト FAP 発現細胞に結合するその能力（飽和結合及び細胞保持）によってインビトロで及び関連するマウスモデルにおけるその体内分布を評価することによってインビボで評価する。

40

【0496】

第 1 の部分では、そのインビトロ挙動を、その細胞結合及び保持を経時的に調べることによって評価した。得られた放射性コンジュゲートの結合能を評価して、これが VHH のアミノ酸配列への ^{225}Ac -DOTA の導入によって影響されないことを確認した。これに対して、ヒト FAP 発現 GM05389 細胞を、0 nM ~ 33 nM の範囲にわたる ^{225}Ac 標識非タグ付け VHH B1 の濃度を有する段階希釈物とインキュベートした。非特異的結合を評価するために、100 倍過剰の対応する非標識 VHH を並行して加えて

50

、癌細胞上に発現されるヒト F A P 受容体を飽和させた。

【0497】

^{225}Ac 標識非タグ付け V H H B 1 の結合により、ヒト F A P 発現 G M 0 5 3 8 9 細胞に対する用量応答曲線が、その ^{131}I -S G M I B 及び ^{177}Lu -D T P A バリアントについて得られた用量応答曲線に匹敵することが明らかにされ、これは、 ^{225}Ac -D O T A の導入が結合能に影響を及ぼさなかったことを示した。 $0.4 \pm 0.1 \text{ nM}$ の E C 5 0 値が得られた。

【0498】

^{225}Ac 標識非タグ付け V H H B 1 のインビトロ細胞保持を、ヒト F A P 発現 G M 0 5 3 8 9 細胞で評価した。この特定の場合、細胞を 10 nM の ^{225}Ac 標識非タグ付け V H H B 1 と共に 1 時間 4°C でインキュベートし、その後、未結合画分を収集した。 100 倍過剰の対応する非標識 V H H を使用して、非特異的結合を評価した。次に、細胞を新鮮な培地と共に 37°C で最大 24 時間インキュベートし、その後、解離した画分を収集した。その後、細胞を 0.05 M グリシン $\text{pH } 2.8$ で洗浄して、膜結合画分を収集した。最後に、細胞を室温で 1 M N a O H で可溶化して、内在化した画分を収集した。膜結合画分及び内在化画分の合計は、全細胞随伴性画分に対応する。

【0499】

^{225}Ac 標識非タグ付け V H H B 1 は、ヒト F A P 受容体に結合する際、経時的に非常に高いレベルの細胞随伴性活性を明らかにする。 24 時間のインキュベーション後、初期結合活性の約 80% が依然として G M 0 5 3 8 9 細胞において保持され、交差反応性ヒト F A P / マウス F A P ターゲティング V H H B 1 の広範囲維持されたターゲティング能力を反映した (図 7)。この特徴は、標的細胞をその細胞傷害性ペイロードに長時間曝露することを可能にするため、V H H を用いる治療用途にとって非常に重要である。

【0500】

次に、 ^{225}Ac 標識非タグ付け V H H B 1 の長期体内分布及び腫瘍ターゲティング能を、ヒト F A P 発現 H E K - 2 9 3 腫瘍を有するマウスにおいて i . v . 注射後 4 日間にわたって評価した。これに対して、無胸腺ヌードマウス (時点当たり $n = 3$) の首にヒト F A P 発現 H E K - 2 9 3 腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍成長 ($60.71 \pm 39.10 \text{ mm}^3$ のサイズ) の検証後、全てのマウスに、約 $1.6 \mu\text{Ci}$ ($\pm 5 \mu\text{g}$) の ^{225}Ac 標識非タグ付け V H H B 1 を尾静脈内注射し、 $150 \text{ mg} / \text{kg}$ のゲルフシンと同時に注射した。次に、注射の 96 時間後まで頸椎脱臼によってマウスを安楽死させ、解剖し、その後、異なる器官及び組織を収集した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は % 注入活性 (I A) / g 組織として表した。

【0501】

^{225}Ac 標識非タグ付け V H H B 1 の静脈内注射は、腸、子宮及び皮膚などの器官及び組織における、わずかに上昇するが一過性である取込み (約 $2 \sim 4\%$ I A / g であるが、経時的に減少する) を明らかにする。骨への取込みは、全ての時点で約 5% I A / g の範囲であった (表 2 4)。腎臓における活性の量は、1 時間後に $13.48 \pm 1.58\%$ I A / g の値に関連し、96 時間後に約 $6.35 \pm 1.30\%$ I A / g に減少した。腫瘍への取込みは、有意であり、1 時間後に $3.83 \pm 0.53\%$ I A / g の値であり、経時的に高いままであり、24 時間後には依然として $3.12 \pm 0.62\%$ I A / g、96 時間後には $2.54 \pm 2.07\%$ I A / g であった。これは、 ^{131}I 標識及び ^{177}Lu 標識非タグ付け V H H B 1 で観察されるものと比較して高い。全ての他の器官及び組織における取込みは、全ての時点で低かった。

【0502】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 24: %IA が使用されるリンパ節を除いて、組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射後 96 時間までの ^{225}Ac 標識非タグ付け VHH B1 の異なる器官及び組織における取込み値。データは平均±SD として提示した(n=3)。

器官	1 h		4 h		24 h		72 h		96 h	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	1,14	0,53	1,02	0,46	1,27	0,97	0,57	0,33	0,97	0,38
リンパ節	0,09	0,02	0,08	0,01	0,07	0,02	0,09	0,00	0,10	0,03
心臓	1,10	0,20	0,94	0,13	0,72	0,11	0,70	0,19	0,90	0,09
肺	1,72	1,29	1,56	0,86	0,94	0,21	4,31	2,13	1,91	0,11
肝臓	1,65	0,20	2,08	0,20	2,18	0,44	2,00	0,11	2,12	0,57
脾臓	1,07	0,15	0,59	0,05	0,48	0,10	0,51	0,08	0,67	0,18
腎臓	0,93	0,22	0,68	0,05	0,74	0,18	0,70	0,06	0,79	0,17
胃	13,48	1,58	17,94	1,02	13,74	2,56	8,49	0,79	6,35	1,30
小腸	0,83	0,17	0,82	0,18	0,76	0,22	0,56	0,07	0,71	0,14
大腸	1,16	0,37	0,74	0,02	0,75	0,26	0,62	0,22	0,64	0,16
子宮	2,47	0,68	1,67	0,36	2,27	0,89	1,89	0,23	3,05	1,31
皮膚	2,60	1,02	2,74	0,69	2,01	0,69	2,70	0,56	1,91	0,47
筋肉	2,06	0,43	1,53	0,22	1,03	0,54	1,11	0,16	1,51	0,57
骨	1,29	0,28	1,16	0,17	0,85	0,29	1,05	0,33	1,15	0,16
腫瘍	4,10	0,41	4,10	0,74	3,12	0,62	6,71	3,05	7,05	3,53
脳	3,83	0,53	4,17	0,77	4,25	1,10	2,51	1,10	2,54	2,07
	0,24	0,05	0,19	0,03	0,25	0,06	0,25	0,06	0,37	0,14

10

20

【0503】

実施例 10：非タグ付け VHH B1 の放射性標識バリエーションの体内分布

実施例 7、実施例 8 及び実施例 9 に記載された結果に加えて、 ^{131}I 標識； ^{225}Ac 標識 VHH B1 及び ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1 の長期体内分布及び腫瘍ターゲティング能を、ヒト FAP を天然に発現するヒト神経膠芽腫瘍 (U87 MG) を有するマウスにおいて、i.v. 注射後 4 日にわたって評価した。これに対して、無胸腺ヌードマウス (時点当たり n=3) の首にヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍細胞を皮下接種した。腫瘍成長の検証後 ($150 \sim 250 \text{ mm}^3$)、マウスに、約 $80 \mu\text{Ci}$ ($\pm 5 \mu\text{g}$) の ^{131}I 標識； $0.5 \mu\text{Ci}$ ($\pm 5 \mu\text{g}$) ^{225}Ac 標識又は $100 \mu\text{Ci}$ ($\pm 5 \mu\text{g}$) ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1 を尾静脈内注射した。次に、注射の 96 時間後まで頸椎脱臼によってマウスを安楽死させ、解剖し、その後、異なる器官及び組織を収集した。目的の器官及び組織を秤量し、自動ガンマカウンタを用いて、注射標準と共に放射能を測定した。結果は%注入活性 (IA) / g 組織として表した。

30

【0504】

^{131}I 標識非タグ付け VHH B1 の静脈内注射は、リンパ節、子宮、骨及び皮膚などの器官並びに組織における、わずかに上昇するが一過性の取込み (約 $2 \sim 3 \% \text{ IA} / \text{g}$ であるが、経時的に減少する) を明らかにする (表 1)。腎臓における活性の量は、 $8.64 \pm 0.56 \% \text{ IA} / \text{g}$ の値で 3 時間後に関連していたが、24 時間後に $1 \% \text{ IA} / \text{g}$ 未満に急速に減少した。腫瘍における取込みは、有意であり、3 時間後の値は、 $10.89 \pm 3.81 \% \text{ IA} / \text{g}$ であり、3 時間後に既に腎臓における取込みを上回った。全ての他の器官及び組織における取込みは、全ての時点で低かった。

40

【0505】

^{225}Ac 標識非タグ付け VHH B1 の投与は、リンパ節、子宮、骨及び皮膚などの器官並びに組織における、わずかに上昇するが一過性の取込み (約 $2 \sim 3 \% \text{ IA} / \text{g}$ である

50

が、経時的に減少する)を明らかにする(表2)。腎臓における活性の量は、3時間後に関連しており、 $12.30 \pm 0.53\% \text{ IA/g}$ の値であり、24時間後に $8.07 \pm 1.39\% \text{ IA/g}$ 及び96時間後に $2.47 \pm 0.18\% \text{ IA/g}$ にゆっくりと減少した。腫瘍における取込みは、有意であり、3時間後の値は、 $5.03 \pm 1.74\% \text{ IA/g}$ であったが、腎臓における取込みを上回ることにはなかった。全ての他の器官及び組織における取込みは、全ての時点で低かった。

【0506】

^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1の投与は、リンパ節、子宮、骨及び皮膚などの器官並びに組織における、わずかに上昇するが一過性の取込み(約 $2 \sim 3\% \text{ IA/g}$ であるが、経時的に減少する)を明らかにする(表3)。腎臓における活性の量は、4時間後に関連しており、 $42.27 \pm 1.58\% \text{ IA/g}$ の値であり、24時間後に $28.38 \pm 2.02\% \text{ IA/g}$ 及び96時間後に $5.02 \pm 0.53\% \text{ IA/g}$ にゆっくりと減少した。腫瘍における取込みは、有意であり、4時間後の値は、 $10.52 \pm 2.25\% \text{ IA/g}$ であったが、腎臓における取込みを上回ることにはなかった。全ての他の器官及び組織における取込みは、全ての時点で低かった。重要なことに、 ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1の腎臓での取込みは、調査した全ての時点で ^{225}Ac 標識バリエーションについて得られた値よりも有意に高かった。

【0507】

取込み値から、非タグ付け VHH B1の放射性標識バリエーションの各々について、対応する経時的な腫瘍対腎臓(T/K)比を計算した。非タグ付け VHH B1の ^{131}I 標識バリエーションでは、 $T/K > 1$ が投与後3時間以降に得られ、ピーク値は注射後48時間で 11.13 ± 3.02 であった。 ^{225}Ac 標識 VHH B1及び ^{177}Lu 標識非タグ付け VHH B1の両方では、 $T/K > 1$ は得られなかったが、 ^{225}Ac 標識非タグ付け VHH B1については、48時間で 0.79 ± 0.19 のピークT/K比が計算された一方、 ^{177}Lu 標識バリエーションについては、ピークT/Kは72時間後に 0.37 ± 0.05 のみ測定された。

【0508】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 25: %IA が使用される甲状腺を除いて、組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射後 96 時間までの ^{131}I 標識非タグ付け VHH B1 の様々な器官及び組織における取り込み値。データは平均±SD として提示した(n=3)。

	1 h		3 h		6 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
器官/組織	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	1,48	0,50	0,51	0,02	0,34	0,15	0,03	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
リンパ節	3,19	0,63	1,32	0,20	1,22	0,38	0,11	0,04	0,03	0,02	0,07	0,01	0,02	0,01
甲状腺(%IA)	0,07	0,02	0,05	0,04	0,03	0,04	0,11	0,08	0,11	0,01	0,24	0,05	0,10	0,03
胸腺	0,05	0,05	0,51	0,11	0,23	0,03	0,07	0,01	0,02	0,01	0,05	0,06	0,01	0,01
心臓	0,68	0,13	0,27	0,01	0,20	0,06	0,03	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01
肺	0,98	0,13	0,53	0,06	0,28	0,09	0,04	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01
肝臓	1,12	0,10	0,73	0,04	1,04	1,03	0,16	0,02	0,13	0,01	0,22	0,01	0,09	0,01
脾臓	1,27	0,11	0,47	0,12	0,38	0,18	0,04	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
脾臓	0,62	0,08	0,85	0,74	0,34	0,14	0,09	0,02	0,05	0,01	0,16	0,07	0,04	0,02
副腎	1,85	0,02	0,58	0,40	0,67	0,25	0,07	0,03	0,03	0,01	0,03	0,00	0,03	0,01
腎臓	43,97	3,61	8,64	0,56	4,68	0,82	0,73	0,18	0,41	0,01	0,62	0,21	0,16	0,02
胃	0,79	0,01	0,66	0,35	0,32	0,17	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
小腸	0,70	0,10	0,26	0,07	0,24	0,15	0,03	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
大腸	1,31	0,19	0,37	0,04	0,29	0,16	0,02	0,01	0,01	0,00	0,03	0,02	0,02	0,02
子宮	2,39	0,35	1,35	0,22	0,60	0,03	0,13	0,04	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01
卵巣	0,98	0,90	0,26	0,23	0,64	0,57	0,05	0,01	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01
皮膚	3,53	0,29	1,92	0,03	1,35	0,30	0,14	0,08	0,03	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01
筋肉	1,21	0,18	0,62	0,14	0,53	0,09	0,02	0,02	0,02	0,00	0,04	0,05	0,00	0,00
骨	2,59	0,29	1,43	0,47	1,16	0,27	0,13	0,03	0,04	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01
関節	4,89	1,31	2,20	0,49	1,80	0,47	0,25	0,05	0,05	0,02	0,04	0,02	0,01	0,00
腫瘍	15,61	2,49	10,89	3,81	12,45	2,30	7,23	6,07	4,53	1,25	5,93	1,00	0,72	0,69
脳	0,08	0,02	0,04	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
腫瘍-腎臓比	0,35	0,03	1,28	0,52	2,68	0,36	8,96	6,30	11,13	3,02	10,08	2,69	4,78	4,74

【 0 5 0 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 8】

表 26: 組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射後 96 時間までの²²⁵Ac 標識非タグ付け VHH B1 の異なる器官及び組織における取込み値。データは平均±SD として提示した(n=3)。

	1 h		3 h		6 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
器官/組織	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0,43	0,22	0,20	0,01	0,11	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01
心臓	0,27	0,03	0,10	0,01	0,08	0,02	0,04	0,03	0,03	0,00	0,03	0,01	0,02	0,01
肺	0,38	0,01	0,18	0,03	0,15	0,03	0,07	0,00	0,27	0,26	0,02	0,02	0,03	0,01
肝臓	0,33	0,03	0,26	0,01	0,36	0,01	0,41	0,09	0,38	0,04	0,34	0,03	0,42	0,02
脾臓	0,45	0,04	0,21	0,03	0,14	0,02	0,05	0,03	0,02	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01
脾臓	0,20	0,03	0,11	0,01	0,11	0,03	0,12	0,05	0,08	0,02	0,06	0,01	0,06	0,01
副腎	0,48	0,11	0,25	0,09	0,17	0,13	0,20	0,07	0,10	0,07	0,14	0,10	0,30	0,18
腎臓	12,41	1,52	12,30	0,53	13,51	1,18	8,07	1,39	4,44	0,51	3,68	0,56	2,47	0,18
胃	0,26	0,04	0,13	0,02	0,15	0,06	0,06	0,00	0,04	0,01	0,03	0,02	0,04	0,01
小腸	0,22	0,03	0,16	0,05	0,15	0,07	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01
大腸	0,34	0,04	0,20	0,03	0,24	0,09	0,06	0,01	0,09	0,03	0,07	0,07	0,06	0,03
子宮	1,13	0,31	0,65	0,10	0,39	0,10	0,28	0,06	0,20	0,14	0,14	0,10	0,13	0,08
卵巣	0,43	0,08	0,20	0,02	0,07	0,02	0,08	0,03	0,08	0,05	0,07	0,00	0,06	0,01
皮膚	1,87	0,31	0,94	0,24	0,85	0,16	0,31	0,08	0,14	0,05	0,22	0,08	0,18	0,07
筋肉	0,45	0,10	0,25	0,03	0,21	0,04	0,09	0,04	0,04	0,03	0,13	0,15	0,03	0,02
骨	1,34	0,16	0,72	0,65	0,72	0,12	0,73	0,44	0,50	0,18	0,50	0,22	0,25	0,09
関節	2,31	0,68	1,06	0,20	0,96	0,12	0,78	0,22	0,57	0,27	0,79	0,26	0,48	0,05
腫瘍	4,18	0,54	5,03	1,74	6,51	1,77	3,49	0,49	3,44	0,40	1,90	0,17	1,68	0,65
脳	0,03	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
腫瘍-腎臓比	0,34	0,07	0,41	0,14	0,48	0,09	0,43	0,02	0,79	0,19	0,53	0,11	0,62	0,29

【0 5 1 0】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 27: 組織のグラム当たりの%注射活性(%IA/g)として表される、i.v.注射後 96 時間までの¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 の異なる器官及び組織における取込み値。データは平均±SD として提示した(n=3)。

器官/組織	1 h		4 h		6 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
血液	0,89	0,07	0,43	0,07	0,27	0,06	0,06	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
心臓	0,33	0,01	0,20	0,03	0,13	0,01	0,06	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00
肺	0,48	0,09	0,27	0,07	0,20	0,03	0,12	0,07	0,08	0,04	0,03	0,01	0,03	0,00
肝臓	0,39	0,08	0,36	0,03	0,37	0,11	0,23	0,06	0,79	1,13	0,09	0,01	0,06	0,02
膵臓	0,81	0,08	0,33	0,06	0,25	0,05	0,07	0,01	0,04	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00
脾臓	0,21	0,02	0,19	0,01	0,14	0,02	0,10	0,02	0,06	0,01	0,05	0,00	0,03	0,00
副腎	1,05	0,13	0,79	0,04	0,60	0,05	0,30	0,07	0,18	0,06	0,11	0,04	0,09	0,01
腎臓	28,94	4,27	42,27	1,58	42,16	4,41	28,38	2,02	17,73	1,51	8,87	1,36	5,02	0,53
胃	0,33	0,08	0,24	0,02	0,17	0,03	0,09	0,00	0,07	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01
小腸	0,38	0,10	0,31	0,14	0,14	0,03	0,08	0,02	0,04	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01
大腸	0,69	0,10	0,71	0,24	0,25	0,03	0,17	0,01	0,08	0,02	0,05	0,02	0,03	0,00
卵巣	1,17	0,42	0,63	0,31	0,42	0,07	0,36	0,07	0,19	0,03	0,12	0,03	0,13	0,01
子宮	1,91	0,68	1,13	0,35	0,73	0,11	0,55	0,16	0,24	0,09	0,08	0,04	0,07	0,02
皮膚	2,36	0,21	1,42	0,06	1,38	0,18	0,40	0,02	0,40	0,36	0,10	0,01	0,06	0,01
筋肉	0,79	0,06	0,50	0,12	0,60	0,10	0,15	0,00	0,06	0,01	0,05	0,01	0,02	0,01
骨	1,34	0,20	1,15	0,23	1,07	0,46	0,61	0,12	0,21	0,02	0,14	0,03	0,12	0,01
関節	2,83	0,44	1,88	0,13	1,56	0,24	0,77	0,02	0,40	0,00	0,18	0,07	0,17	0,01
腫瘍	4,56	0,42	10,52	2,25	9,20	0,91	10,12	3,55	4,88	1,29	3,25	0,09	1,39	0,05
脳	0,05	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
腫瘍-腎臓比	0,16	0,04	0,25	0,06	0,22	0,00	0,35	0,11	0,27	0,05	0,37	0,05	0,19	0,03

【0 5 1 1】

まとめると、この実施例は、ヒト神経膠芽腫瘍（U87 MG）に対する天然のヒト FAP 発現のターゲティングが¹³¹I 標識、²²⁵Ac 標識 VHH B1 及び¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 により実行可能であることを示す。インビボ腫瘍ターゲティング能は、追加の器官及び組織における放射能の限られた保持と相まって、それらの治療適用を支持する。最適な体内分布は、非タグ付け VHH B1 の¹³¹I 標識バリエーションについて得られ、腎臓からの迅速な洗い流しによる高い持続的な腫瘍ターゲティングを伴った。²²⁵Ac 標識非タグ付け VHH B1 は、腎臓からのより遅いクリアランスと組み合わせ、高い持続的な腫瘍ターゲティングを明らかにした。最後に、¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 は、hFAP 発現ヒト神経膠芽腫瘍を効率的に標的とするが、非タグ付け VHH B1 の2つの他の放射性標識バリエーションと比較して、経時的に有意により多く腎臓に保持される。

【0 5 1 2】

実施例 11：非タグ付け VHH B1 の放射性標識バリエーションの治療有効性

この実施例では、本発明者らは、ヒト FAP 発現腫瘍を有するマウスにおいて評価される、¹³¹I 標識；²²⁵Ac で標識及び¹⁷⁷Lu で標識非タグ付け VHH B1 の治療的可能性について記載する。3つ全ての場合において、小さい確立された腫瘍を有するマウスを、(i) 高用量の若しくは(ii) 低用量の放射性標識非タグ付け VHH B1、(iii) 高用量の放射性標識 R3B23 又は最後に(iv) ビヒクル溶液のいずれかで、6回連続して処置した。腫瘍体積及び動物の体重を繰り返し測定した。以下のエンドポイントの1つに達した場合、ドロップアウトを考慮した：皮下腫瘍については、(i) 1

500 mm³ 超の腫瘍サイズ、(i i) 20% 超の体重減少、又は (i i i) 壊死腫瘍組織の存在。

【0513】

¹³¹I 標識非タグ付け VHH B1 の場合、無胸腺ヌードマウス (群当たり n = 10) に、ヒト FAP を天然に発現するヒト神経膠芽腫瘍 (U87 MG) を皮下接種した。小さい腫瘍が確立された場合、マウスに、約 6000 µCi (± 5 µg) 若しくは 3000 µCi (± 2.5 µg) の ¹³¹I 標識非タグ付け VHH B1; 6000 µCi (± 5 µg) の ¹³¹I 標識 R3B23 又はビヒクル溶液を尾静脈内注射した。図 1A に示すように、¹³¹I 標識非タグ付け VHH B1 で処置したマウスは、¹³¹I 標識 R3B23 又はビヒクル溶液 (p < 0.0001、ログランク・マンテル・コックス検定) で処置したマウスと比較して、有意に長く生存した。

10

【0514】

次に、²²⁵Ac 標識非タグ付け VHH B1 の治療有効性を、ヒト FAP 発現 HEK-293 腫瘍を保有する無胸腺ヌードマウス (群当たり n = 10) において評価した。小さい腫瘍が確立された場合、マウスに、約 6.5 µCi (± 5 µg) 若しくは 3.25 µCi (± 2.5 µg) の ²²⁵Ac 標識非タグ付け VHH B1; 6.5 µCi (± 5 µg) の ²²⁵Ac 標識 R3B23 又はビヒクル溶液を、尾静脈内注射した。図 1B に示すように、²²⁵Ac 標識非タグ付け VHH B1 で処置したマウスは、²²⁵Ac 標識 R3B23 又はビヒクル溶液 (p < 0.0001、ログランク・マンテル・コックス検定) で処置したマウスと比較して、有意に長く生存した。更に、高放射性 ²²⁵Ac 標識非タグ付け VHH B1 による処置は、低放射性 ²²⁵Ac 標識非タグ付け VHH B1 と比較して、より効果的であった (p < 0.005、ログランク・マンテル・コックス検定)。

20

【0515】

最後に、ヒト FAP を天然に発現するヒト神経膠芽腫瘍 (U87 MG) を保有する無胸腺ヌードマウス (群当たり n = 10) において、¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 の治療有効性を評価した。小さい腫瘍が確立された場合、マウスに、約 3000 µCi (± 5 µg) 若しくは 1500 µCi (± 2.5 µg) の ¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1; 3000 µCi (± 5 µg) の ¹⁷⁷Lu 標識 R3B23 又はビヒクル溶液を、尾静脈内注射した。図 1C に示すように、¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 で処置したマウスは、¹⁷⁷Lu 標識 R3B23 又はビヒクル溶液 (p < 0.0001、ログランク・マンテル・コックス検定) で処置したマウスと比較して、有意に長く生存した。更に、高放射性 ¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 による処置は、低放射性 ¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 と比較して、より効果的であった (p < 0.05、ログランク・マンテル・コックス検定)。

30

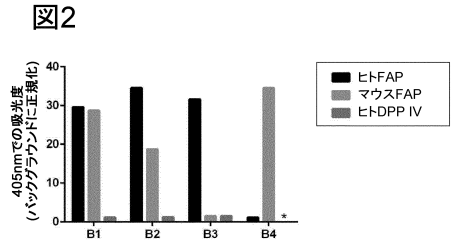
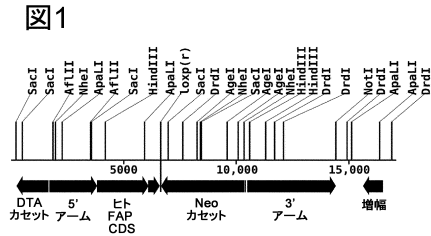
【0516】

結論として、¹³¹I 標識 VHH B1、²²⁵Ac 標識 VHH B1 及び ¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 は、hFAP 発現腫瘍異種移植マウスモデルにおいて有効であることが明らかにされた。実施例 10 に記載される ¹³¹I 標識バリエーションの最適な T/K 比は、その良好な治療的可能性と組み合わせて、非タグ付け VHH B1 のこの放射性標識変異体をセラノスティック使用のための好ましい化合物にする。重要なことに、²²⁵Ac 標識 VHH B1 及び ¹⁷⁷Lu 標識非タグ付け VHH B1 の両方がマウスでも有効であることを示すが、実施例 10 に記載されるように、T/K 比は、最適ではない。

40

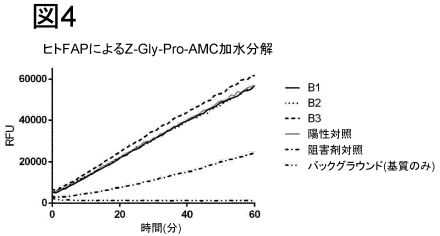
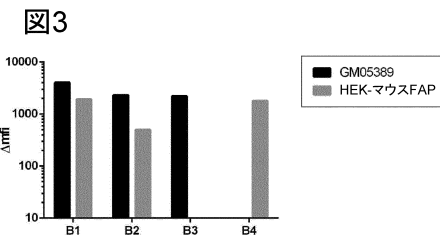
【図面】
【図 1】

【図 2】



【図 3】

【図 4】



10

20

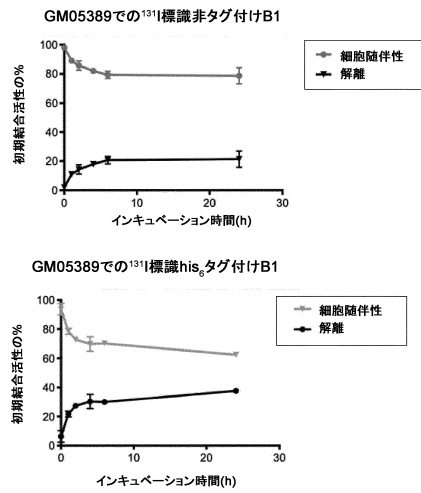
30

40

50

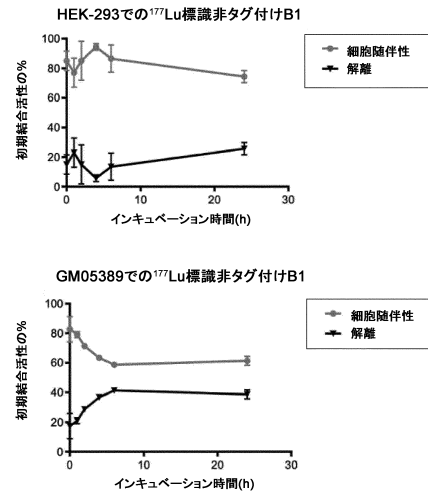
【図 5】

図5



【図 6】

図6

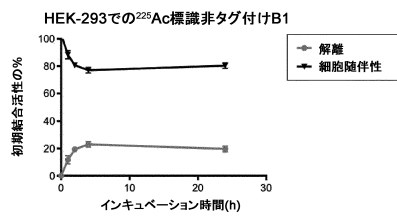


10

20

【図 7】

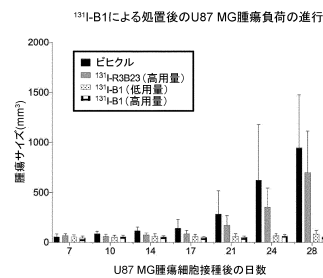
図7



【図 8 A】

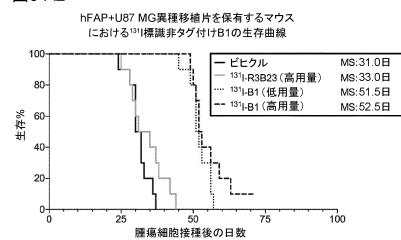
図8-A

図8-A1



30

図8-A2



40

50

【図 8 B】

図8-B

図8-B1

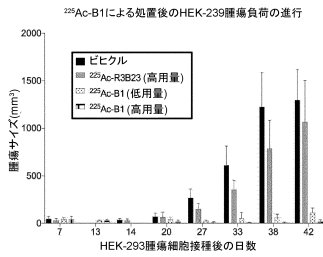
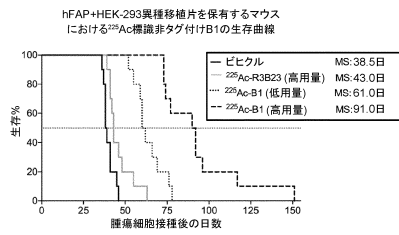


図8-B2



【図 8 C】

図8-C

図8-C1

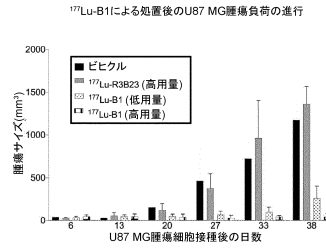
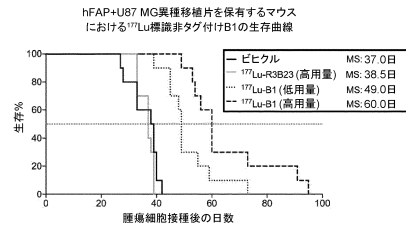


図8-C2



10

20

30

40

50

【配列表】

2023541601000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/075009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/30 C07K16/40 A61K51/10 A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Brocks Bodo ET AL: "Species-Crossreactive scFv Against the Tumor Stroma Marker "Fibroblast Activation Protein" Selected by Phage Display From an Immunized FAP ?/? Knock-Out Mouse", Molecular Medicine, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 461-469, XP055778933, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1950057/pdf/11683371.pdf [retrieved on 2021-02-23] e.g. abstract; fig. 2; page 468, right-hand column, last paragraph; the whole document ----- -/--	1-24
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 February 2022		Date of mailing of the international search report 01/03/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gruber, Andreas

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/075009

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/092951 A1 (SZALAY ALADAR [US] ET AL) 5 April 2018 (2018-04-05) e.g. example 3; the whole document -----	1-24
X	WO 2019/152979 A1 (ORIONIS BIOSCIENCES INC [US]; VIB VZW [BE]; UNIV GENT [BE]) 8 August 2019 (2019-08-08) e.g. example 6; claims 1-5, 21, 22; the whole document -----	1-24
X	CN 106 928 365 A (UNIV GUANGXI MEDICAL) 7 July 2017 (2017-07-07) e.g. claims 1-10; the whole document -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/075009

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/075009**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-24 (partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

50

International Application No. PCT/EP2021/075009

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-24(partially)

An antibody fragment that specifically binds human and/or murine FAP and comprises SEQ ID NO:4, respective compositions and therapy

2-4. claims: 1-24(partially)

An antibody fragment that specifically binds human and/or murine FAP and comprise SEQ ID NO:1 (invention 2), 2(invention 3), 3 (invention 4), respective compositions and therapy

5. claim: 25

A non-human animal comprising a nucleic acid construct allowing the expression of human FAP.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/075009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018092951 A1	05-04-2018	AU 2016232863 A1	09-11-2017
		CN 107530384 A	02-01-2018
		EA 201792058 A1	30-03-2018
		EP 3270940 A1	24-01-2018
		JP 2018510158 A	12-04-2018
		KR 20170139020 A	18-12-2017
		US 2018092951 A1	05-04-2018
		WO 2016149559 A1	22-09-2016
WO 2019152979 A1	08-08-2019	AU 2019215440 A1	27-08-2020
		CA 3090406 A1	08-08-2019
		CN 112074267 A	11-12-2020
		EP 3749295 A1	16-12-2020
		JP 2021513361 A	27-05-2021
		KR 20200128533 A	13-11-2020
		US 2021023167 A1	28-01-2021
		WO 2019152979 A1	08-08-2019
CN 106928365 A	07-07-2017	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 6 1 K 51/10 1 0 0	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 51/10 2 0 0	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
	G 0 1 N 33/531 A	
	C 1 2 N 15/13	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- 弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100172683
弁理士 綾 聡平
- (74)代理人 100219265
弁理士 鈴木 崇大
- (74)代理人 100203208
弁理士 小笠原 洋平
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 ラハウト, トニー
ベルギー、ブリュッセル・ビー—1 0 9 0、ブルゲメステール・エティエンヌ・デミュンターラー
ン・3
- (72)発明者 デヴォーグト, ニック
ベルギー、ブリュッセル・ビー—1 0 9 0、ブルゲメステール・エティエンヌ・デミュンターラー
ン・3
- (72)発明者 ドゥホイヴェッター, マティアス
ベルギー、ブリュッセル・ビー—1 0 9 0、ブルゲメステール・エティエンヌ・デミュンターラー
ン・3
- (72)発明者 マッサ, サム
ベルギー、ブリュッセル・ビー—1 0 9 0、ブルゲメステール・エティエンヌ・デミュンターラー
ン・3

F ターム (参考)	4C084	AA12 AA19 NA05 NA14 ZB26
	4C085	AA13 AA14 AA26 BB31 CC22 EE01 KA03 KA29 KB02 KB03 KB07 KB09 KB10 KB11 KB12 KB15 KB18 LL18
	4H045	AA11 AA30 BA10 BA71 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74