

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6494507号  
(P6494507)

(45) 発行日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日(2019.3.15)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C07K</b>	<b>16/30</b> (2006.01)	C07K	16/30 ZNA
<b>C07K</b>	<b>19/00</b> (2006.01)	C07K	19/00
<b>C07K</b>	<b>16/46</b> (2006.01)	C07K	16/46
<b>C12P</b>	<b>21/08</b> (2006.01)	C12P	21/08
<b>C12N</b>	<b>1/15</b> (2006.01)	C12N	1/15

請求項の数 31 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-515243 (P2015-515243)	(73) 特許権者	508285606
(86) (22) 出願日	平成25年5月31日 (2013.5.31)		ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリ リカ, アズ リプレゼンテッド バイ ザ セクレタリー, デパートメント オ ブ ヘルス アンド ヒューマン サービ シーズ
(65) 公表番号	特表2015-526387 (P2015-526387A)		アメリカ合衆国, メリーランド 2089 2-7660, ベセスダ, エグゼキュティ ブ ブールバード 6011, スイート 325, エムエスシー 7660
(43) 公表日	平成27年9月10日 (2015.9.10)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/043633		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02013/181543	(74) 代理人	100113413
(87) 国際公開日	平成25年12月5日 (2013.12.5)		弁理士 森下 夏樹
審査請求日	平成28年4月4日 (2016.4.4)		
(31) 優先権主張番号	61/654, 232		
(32) 優先日	平成24年6月1日 (2012.6.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリピカン-3 に対する高親和性モノクローナル抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グリピカン-3 (GPC3) を結合する単離されたモノクローナル抗体であって、

(i) 前記抗体の重鎖が、配列番号12に示される可変重鎖(VH)ドメインの相補性決定領域(CDR)1、CDR2、およびCDR3を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号14に示される可変軽鎖(VL)ドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含むか；

(ii) 前記抗体の重鎖が、配列番号8に示されるVHドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号10に示されるVLドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含むか；

(iii) 前記抗体の重鎖が、配列番号16に示されるVHドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号18に示されるVLドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含むか；または

(iv) 前記抗体の重鎖が、配列番号20に示されるVHドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号22、配列番号24、もしくは配列番号26に示されるVLドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、

(a) 前記抗体の重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3と、前記抗体の軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3がすべて、Kababtによって決定されるか、または

(b) 前記抗体の重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3と、前記抗体の軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3がすべて、IMGTによって決定される、

単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 2】

( i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 12 のアミノ酸残基 26 ~ 33、51 ~ 60、および 99 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 14 のアミノ酸残基 27 ~ 38、56 ~ 58、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含むか；

( i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 8 のアミノ酸残基 26 ~ 33、51 ~ 60、および 99 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 10 のアミノ酸残基 27 ~ 38、56 ~ 58、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含むか；

( i i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 16 のアミノ酸残基 26 ~ 33、51 ~ 60、および 99 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 18 のアミノ酸残基 27 ~ 38、56 ~ 58、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含むか；または

( i v ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 20 のアミノ酸残基 26 ~ 33、51 ~ 60、および 99 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 22 のアミノ酸残基 27 ~ 38、56 ~ 58、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3、配列番号 24 のアミノ酸残基 27 ~ 38、56 ~ 58、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3、もしくは配列番号 26 のアミノ酸残基 27 ~ 38、56 ~ 58、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含む、  
請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 3】

( i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 12 のアミノ酸残基 31 ~ 35、50 ~ 68、および 101 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 14 のアミノ酸残基 24 ~ 40、56 ~ 62、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含む；

( i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 8 のアミノ酸残基 31 ~ 35、50 ~ 68、および 101 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 10 のアミノ酸残基 24 ~ 40、56 ~ 62、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含むか；

( i i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 16 のアミノ酸残基 31 ~ 35、50 ~ 68、および 101 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 18 のアミノ酸残基 24 ~ 40、56 ~ 62、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含むか；または

( i v ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 20 のアミノ酸残基 31 ~ 35、50 ~ 68、および 101 ~ 106 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 22 のアミノ酸残基 24 ~ 40、56 ~ 62、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3、配列番号 24 のアミノ酸残基 24 ~ 40、56 ~ 62、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3、もしくは配列番号 26 のアミノ酸残基 24 ~ 40、56 ~ 62、および 95 ~ 103 にそれぞれ示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含む、  
請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 4】

( i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 12 と少なくとも 90 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 14 と少なくとも 90 % 同一であるか；

( i i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 8 と少なくとも 90 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 10 と少なくとも 90 % 同一であるか；

( i i i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 16 と少なくとも 90 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 18 と少なくとも 90 % 同一であるか；または

10

20

30

40

50

( i v ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 2 0 と少なくとも 9 0 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 2 2、2 4、もしくは 2 6 と少なくとも 9 0 % 同一であるか、あるいは

( v ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 2 と少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 4 と少なくとも 9 5 % 同一であるか；

( v i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 8 と少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 0 と少なくとも 9 5 % 同一であるか；

( v i i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 6 と少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 8 と少なくとも 9 5 % 同一であるか；または

( v i i i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 2 0 と少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 2 2、2 4、もしくは 2 6 と少なくとも 9 5 % 同一である、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 5】

( i ) 前記抗体の重鎖が配列番号 1 2 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 1 4 を含むか；

( i i ) 前記抗体の重鎖が配列番号 8 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 1 0 を含むか；

( i i i ) 前記抗体の重鎖が配列番号 1 6 もしくは配列番号 3 7 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 1 8 を含むか；または

( i v ) 前記抗体の重鎖が配列番号 2 0 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 2 2、2 4、もしくは 2 6 を含む、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F ( a b ) ' <sub>2</sub> フラグメント、単鎖可変フラグメント ( s c F v )、またはジスルフィド安定化可変フラグメント ( d s F v ) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 7】

前記抗体が I g G である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 8】

前記抗体が標識されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 9】

前記標識が蛍光標識、酵素標識、または放射性標識である、請求項 8 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 1 0】

前記モノクローナル抗体がヒト化モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 1 1】

薬学的に許容され得るキャリア中に、治療的有効量の、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体を含む、組成物。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体およびエフェクター分子または治療薬を含む、単離された免疫結合体。

【請求項 1 3】

前記エフェクター分子が毒素である、請求項 1 2 に記載の単離された免疫結合体。

【請求項 1 4】

前記毒素が P s e u d o m o n a s 外毒素またはそのバリエーションである、請求項 1 3 に記載の単離された免疫結合体。

【請求項 1 5】

10

20

30

40

50

前記毒素が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む P E 3 8 である、請求項 1 4 に記載の単離された免疫結合体。

【請求項 1 6】

配列番号 3 5 の残基 2 ~ 5 9 7、配列番号 2 8 の残基 2 ~ 5 9 7、配列番号 3 1 の残基 2 ~ 5 9 7、または配列番号 3 3 の残基 2 ~ 5 9 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の単離された免疫結合体。

【請求項 1 7】

前記エフェクター分子が検出可能な標識である、請求項 1 2 に記載の単離された免疫結合体。

【請求項 1 8】

薬学的に許容され得るキャリア中に、治療的有効量の、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の単離された免疫結合体を含む、組成物。

【請求項 1 9】

がんを有する被験体を処置するための請求項 1 1 または請求項 1 8 に記載の組成物であって、G P C 3 を発現するがんを有する前記被験体を選択され、および治療的有効量の前記組成物が前記被験体に投与され、それにより前記被験体における前記がんが処置されることを特徴とする、組成物。

【請求項 2 0】

腫瘍成長または転移を阻害するための請求項 1 1 または請求項 1 8 に記載の組成物であって、G P C 3 を発現するがんを有する前記被験体を選択され、および治療的有効量の前記組成物が前記被験体に投与され、それにより腫瘍成長または転移が阻害されることを特徴とする、組成物。

【請求項 2 1】

被験体がんを有するかどうかを決定する方法、または被験体におけるがんの診断を確認する方法、のための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含み、前記方法は、前記被験体由来の試料を前記組成物に接触させる工程；および前記抗体の前記試料への結合を検出する工程を含み、前記抗体の対照試料への結合と比較しての前記抗体の前記試料への結合の増加により、前記被験体がんを有すると同定されるか、または前記被験体におけるがんの診断が確認されることを特徴とする、組成物。

【請求項 2 2】

前記モノクローナル抗体が直接標識されている、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記方法が、前記モノクローナル抗体を特異的に結合する二次抗体を前記試料に接触させる工程、および前記二次抗体の結合を検出する工程をさらに含み、前記二次抗体の対照試料への結合と比較しての前記二次抗体の前記試料への結合の増加により、前記被験体におけるがんが検出されるか、または前記被験体におけるがんの診断が確認されることを特徴とする、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記がんが、肝細胞がん腫 ( H C C )、メラノーマ、肺の扁平上皮がん腫、または卵巣明細胞がん腫である、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 2 6】

( i ) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 1 1 を含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 1 3 を含むか；

10

20

30

40

50

( i i ) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 7 を含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 9 を含むか ;

( i i i ) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 1 5 もしくは配列番号 3 6 を含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 1 7 を含むか ; または

( i v ) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 1 9 を含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 2 1、配列番号 2 3、もしくは配列番号 2 5 を含む、  
請求項 2 5 に記載の単離された核酸分子。 10

【請求項 2 7】

請求項 2 5 または請求項 2 6 に記載の単離された核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 2 8】

請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の核酸分子または発現ベクターで形質転換された、単離された宿主細胞。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含む、キメラ抗原受容体 ( C A R ) 。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含む、二重特異性抗体。 20

【請求項 3 1】

前記治療薬が薬物を含む、請求項 1 2 に記載の単離された免疫結合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、その全体が参考として本明細書に援用される、2012年6月1日出願した米国仮出願第61/654,232号の利益を主張する。

【0002】

分野

本開示は、グリピカン-3 (GPC3) に特異的な高親和性抗体、ならびにがんの診断および処置のためのそれらの使用に関する。 30

【背景技術】

【0003】

背景

肝臓がんは、世界中で5番目に最もよく見られる悪性腫瘍であり (Ho, BioDrugs 25:275-284, 2011)、肝細胞がん腫 (HCC) が最もよく見られる型である。胆管がん腫 (CCA) は、原発性肝臓がんの別の主要な型である。外科的切除は、その疾患の処置のための標準的方法を提供するが、患者のほんの一部のみがその手順に適格である。肝臓がんは、ほとんどの化学療法薬に応答しない。したがって、抗体治療などの新規な免疫治療の差し迫った必要性がある。グリピカン-3 (GPC3) が、HCCにおいて高度に発現していることを考慮すれば、GPC3が肝臓がん治療のための魅力的な標的を表すことは、示唆されている (Capurroら, Gastroenterology 125:89-97, 2003; CapurroおよびFilmus, Cancer Res 65:372, 2005; HoおよびKim, Eur J Cancer 47:333-338, 2011; AllegrettaおよびFilmus, Anticancer Agents Med Chem 11:543-548, 2011)。

【0004】

GPC3遺伝子は、70kDaの前駆コアタンパク質をコードし、それは、フォーリンに 50

よって切断されて40kDaアミノ(N)末端タンパク質および30kDaの膜結合型カルボキシル(C)末端タンパク質を生じ得る。C末端は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーによって細胞膜に付着している。GPC3は、抗体免疫治療(Ishiguroら、Cancer Res 68:9832-9838、2008; Nakanoら、Biochem Biophys Res Commun 378:279-284、2009; Nakanoら、Anticancer Drugs 21:907-916、2010)および細胞に基づいた免疫治療(Nakatsuraら、Clin Cancer Res 10:8630-8640、2004; Komoriら、Clin Cancer Res 12:2689-2697、2006)の両方についての標的として示唆されている。しかしながら、GPC3発現は、HCCおよび他のがん(例えば、卵巣明細胞がん腫およびメラノーマ)において非常に不均一である(Suzukiら、Cancer Sci、102:1622-1629、2011)。理想的な治療モノクローナル抗体(mAb)は、低レベルの標的抗原を発現する腫瘍細胞を排除すべきである。その領域における研究は、がんの治療および診断のために腫瘍細胞における低発現のGPC3を検出するのに用いることができる高親和性mAbが存在しないことにより、妨げられてきた。

10

## 【0005】

Filmusおよび共同研究者らは、GPC3のC末端に特異的な、広く用いられる1G12 mAbを開発し、HCC患者において血清GPC3を検出するためのELISA方法を確立した(Capurroら、Gastroenterology 125:89-97、2003)。Hippoらは、GPC3のN末端に特異的なmAbを開発した(Hippoら、Cancer Res、64:2418-2423、2004)。どちらの研究も、HCC培養上清またはがん患者の循環血における可溶性GPC3タンパク質を検出したが、N末端サブユニットまたはC末端サブユニットが実際に、可溶性GPC3形式を表しているかどうか明らかではない(CapurroおよびFilmus、Cancer Res 65:372、2005)。血清GPC3の濃度が、一般的に、患者において高くないこと、および容易に入手できるmAbのいずれも、おそらくそのmAbのGPC3に対する低親和性のせいで、血清GPC3を測定するのに用いることができないことを、以前の研究が示している。

20

## 【先行技術文献】

30

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】Capurroら、Gastroenterology 125:89-97、2003

【非特許文献2】CapurroおよびFilmus、Cancer Res 65:372、2005

【非特許文献3】HoおよびKim、Eur J Cancer 47:333-338、2011

【非特許文献4】AllegrrettaおよびFilmus、Anticancer Agents Med Chem 11:543-548、2011

40

【非特許文献5】Ishiguroら、Cancer Res 68:9832-9838、2008

【非特許文献6】Nakanoら、Biochem Biophys Res Commun 378:279-284、2009

【非特許文献7】Nakanoら、Anticancer Drugs 21:907-916、2010

【非特許文献8】Nakatsuraら、Clin Cancer Res 10:8630-8640、2004

【非特許文献9】Komoriら、Clin Cancer Res 12:2689-2697、2006

50

【非特許文献10】Suzukiら、Cancer Sci、102:1622-1629、2011

【非特許文献11】Hippoら、Cancer Res、64:2418-2423、2004

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

要旨

細胞表面および可溶性のGPC3タンパク質に高親和性で結合するモノクローナル抗体のパネルが本明細書で開示されている。本明細書で提供される抗体は、IgG抗体などの免疫グロブリン分子、ならびに、抗体フラグメントおよびヒト化モノクローナル抗体およびフラグメントを包含する。さらに、GPC3に結合する(例えば特異的に結合する)抗体を含む組成物、これらの抗体をコードする核酸分子、その核酸分子を含む発現ベクター、およびその核酸分子を発現する単離された宿主細胞が提供される。本明細書に開示された抗体、および毒素などのエフェクター分子を含む免疫結合体もまた提供される。

10

【0008】

本明細書で提供される抗体および組成物は、GPC3を発現するがん、例えば、HCC、メラノーマ、肺の扁平上皮がん腫、または卵巣明細胞がん腫の診断を確認するためなどの様々な目的に用いることができる。したがって、がんと診断された被験体由来の試料を、GPC3を結合するモノクローナル抗体と接触させる工程、およびその抗体のその試料への結合を検出する工程により、被験体におけるがんの診断を確認する方法が本明細書に提供される。抗体の対照試料への結合と比較しての、その試料への抗体の結合の増加により、がん診断が確認される。いくつかの実施形態において、方法はさらに、GPC3特異的抗体を特異的に認識する二次抗体をその試料に接触させる工程、および二次抗体の結合を検出する工程を含む。

20

【0009】

同様に、被験体においてGPC3を発現するがんを検出する方法が本明細書に提供される。方法は、被験体由来の試料を、本明細書に記載されたモノクローナル抗体と接触させる工程、およびその抗体のその試料への結合を検出する工程を含む。対照試料と比較しての、その試料への抗体の結合の増加が、被験体におけるがんを検出する。いくつかの実施形態において、方法はさらに、GPC3特異的抗体を特異的に認識する二次抗体をその試料に接触させる工程、および二次抗体の結合を検出する工程を含む。

30

【0010】

GPC3を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、GPC3に特異的なモノクローナル抗体、またはその抗体を含む免疫結合体をその被験体に投与する工程により、がん、例えば、HCC、メラノーマ、肺の扁平上皮がん腫、または卵巣明細胞がん腫を有する被験体を処置する方法がさらに提供される。

【0011】

GPC3を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、本明細書に開示された抗体、免疫結合体、または組成物をその被験体に投与する工程により、被験体において腫瘍成長を阻害するための方法もまた提供される。

40

【0012】

本発明の前述の、および他の目的、特徴、および利点は、添付の図を参照して進める、以下の詳細な説明からより明らかになるだろう。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

グリピカン-3(GPC3)を結合する単離されたモノクローナル抗体であって、

(i) 前記抗体の重鎖が、配列番号38、配列番号39、および配列番号40を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号44、配列番号14のアミノ酸残基56~58、および配列番号45を含むか；または

50

( i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 4 1、配列番号 4 2、および配列番号 4 3 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 4 6、配列番号 4 7、および配列番号 4 5 を含む、単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 2 )

( i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 1 2 のアミノ酸残基 2 6 ~ 3 3、5 1 ~ 6 0、および 9 9 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 1 4 のアミノ酸残基 2 7 ~ 3 8、5 6 ~ 5 8、および 9 5 ~ 1 0 3 を含むか；

( i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 8 のアミノ酸残基 2 6 ~ 3 3、5 1 ~ 6 0、および 9 9 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 2 7 ~ 3 8、5 6 ~ 5 8、および 9 5 ~ 1 0 3 を含むか；

( i i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 1 6 のアミノ酸残基 2 6 ~ 3 3、5 1 ~ 6 0、および 9 9 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 1 8 のアミノ酸残基 2 7 ~ 3 8、5 6 ~ 5 8、および 9 5 ~ 1 0 3 を含むか；または

( i v ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 2 0 のアミノ酸残基 2 6 ~ 3 3、5 1 ~ 6 0、および 9 9 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 2 2 のアミノ酸残基 2 7 ~ 3 8、5 6 ~ 5 8、および 9 5 ~ 1 0 3、配列番号 2 4 のアミノ酸残基 2 7 ~ 3 8、5 6 ~ 5 8、および 9 5 ~ 1 0 3、もしくは配列番号 2 6 のアミノ酸残基 2 7 ~ 3 8、5 6 ~ 5 8、および 9 5 ~ 1 0 3 を含む、

項目 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 3 )

( i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 1 2 のアミノ酸残基 3 1 ~ 3 5、5 0 ~ 6 8、および 1 0 1 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 1 4 のアミノ酸残基 2 4 ~ 4 0、5 6 ~ 6 2、および 9 5 ~ 1 0 3 を含む；

( i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 8 のアミノ酸残基 3 1 ~ 3 5、5 0 ~ 6 8、および 1 0 1 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 2 4 ~ 4 0、5 6 ~ 6 2、および 9 5 ~ 1 0 3 を含むか；

( i i i ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 1 6 のアミノ酸残基 3 1 ~ 3 5、5 0 ~ 6 8、および 1 0 1 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 1 8 のアミノ酸残基 2 4 ~ 4 0、5 6 ~ 6 2、および 9 5 ~ 1 0 3 を含むか；または

( i v ) 前記抗体の重鎖が、配列番号 2 0 のアミノ酸残基 3 1 ~ 3 5、5 0 ~ 6 8、および 1 0 1 ~ 1 0 6 を含み、前記抗体の軽鎖が、配列番号 2 2 のアミノ酸残基 2 4 ~ 4 0、5 6 ~ 6 2、および 9 5 ~ 1 0 3、配列番号 2 4 のアミノ酸残基 2 4 ~ 4 0、5 6 ~ 6 2、および 9 5 ~ 1 0 3、もしくは配列番号 2 6 のアミノ酸残基 2 4 ~ 4 0、5 6 ~ 6 2、および 9 5 ~ 1 0 3 を含む、

項目 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 4 )

( i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 2 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 4 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一であるか；

( i i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 8 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 0 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一であるか；

( i i i ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 6 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 1 8 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一であるか；または

( i v ) 前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 2 0 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一であり、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 2 2、2 4、もしくは 2 6 と少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % 同一である、

項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 5 )

10

20

30

40

50

( i ) 前記抗体の重鎖が配列番号 1 2 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 1 4 を含むか ;

( i i ) 前記抗体の重鎖が配列番号 8 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 1 0 を含むか ;

( i i i ) 前記抗体の重鎖が配列番号 1 6 もしくは配列番号 3 7 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 1 8 を含むか ; または

( i v ) 前記抗体の重鎖が配列番号 2 0 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 2 2、2 4、もしくは 2 6 を含む、

項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 6 )

G P C 3 を結合する単離されたモノクローナル抗体であって、前記抗体が、

( i ) 配列番号 1 2、配列番号 8、配列番号 1 6、配列番号 3 7、もしくは配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む可変重鎖 ( V H ) ドメイン ; または

( i i ) 配列番号 1 4、配列番号 1 0、配列番号 1 8、配列番号 2 2、配列番号 2 4、もしくは配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖 ( V L ) ドメイン ; または

( i i i ) ( i ) および ( i i ) の両方

を含む、単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 7 )

前記抗体が V H 単ドメイン抗体、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F ( a b ) ' <sub>2</sub> フラグメント、単鎖可変フラグメント ( s c F v )、またはジスルフィド安定化可変フラグメント ( d s F v ) である、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 8 )

前記抗体が I g G である、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 9 )

前記抗体が標識されている、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 1 0 )

前記標識が蛍光標識、酵素標識、または放射性標識である、項目 9 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 1 1 )

前記モノクローナル抗体がヒト化モノクローナル抗体である、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

( 項目 1 2 )

薬学的に許容され得るキャリア中に、治療的有効量の、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の抗体を含む、組成物。

( 項目 1 3 )

項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体およびエフェクター分子を含む、単離された免疫結合体。

( 項目 1 4 )

前記エフェクター分子が毒素である、項目 1 3 に記載の単離された免疫結合体。

( 項目 1 5 )

前記毒素が P s e u d o m o n a s 外毒素またはそのバリエーションである、項目 1 4 に記載の単離された免疫結合体。

( 項目 1 6 )

前記毒素が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む P E 3 8 である、項目 1 5 に記載の単離された免疫結合体。

( 項目 1 7 )

配列番号 3 5 の残基 2 ~ 5 9 7、配列番号 2 8 の残基 2 ~ 5 9 7、配列番号 3 1 の残基 2 ~ 5 9 7、または配列番号 3 3 の残基 2 ~ 5 9 7 のアミノ酸配列を含む、項目 1 3 ~ 1 6

10

20

30

40

50

のいずれか一項に記載の単離された免疫結合体。

(項目 18)

前記エフェクター分子が検出可能な標識である、項目 13 に記載の単離された免疫結合体

(項目 19)

薬学的に許容され得るキャリア中に、治療的有効量の、項目 13 ~ 18 のいずれか一項に記載の単離された免疫結合体を含む、組成物。

(項目 20)

がんを有する被験体を処置する方法であって、GPC3 を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、項目 12 または項目 19 に記載の組成物を前記被験体に投与し、それにより前記被験体における前記がんを処置する工程を含む、方法。

(項目 21)

腫瘍成長または転移を阻害する方法であって、GPC3 を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、項目 12 または項目 19 に記載の組成物を前記被験体に投与し、それにより腫瘍成長または転移を阻害する工程を含む、方法。

(項目 22)

被験体がんを有するかどうかを決定する方法、または被験体におけるがんの診断を確認する方法であって、

前記被験体由来の試料を項目 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体に接触させる工程；および

前記抗体の前記試料への結合を検出する工程

を含み、前記抗体の対照試料への結合と比較しての前記抗体の前記試料への結合の増加により、前記被験体がんを有すると同定されるか、または前記被験体におけるがんの診断が確認される、方法。

(項目 23)

前記モノクローナル抗体が直接標識されている、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記モノクローナル抗体を特異的に結合する二次抗体を前記試料に接触させる工程、および

二次抗体の結合を検出する工程

をさらに含み、前記二次抗体の対照試料への結合と比較しての前記二次抗体の前記試料への結合の増加により、前記被験体におけるがんが検出されるか、または前記被験体におけるがんの診断が確認される、項目 22 に記載の方法。

(項目 25)

前記がんが、肝細胞がん腫 (HCC)、メラノーマ、肺の扁平上皮がん腫、または卵巣明細胞がん腫である、項目 22 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 26)

項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体をコードする、単離された核酸分子。

(項目 27)

(i) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 11 を含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 13 を含むか；

(ii) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 7 を含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 9 を含むか；

(iii) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 15 もしくは配列番号 36 を含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 17 を含むか；または

(iv) 前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 19 を

10

20

30

40

50

含み、前記モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が配列番号 2 1、配列番号 2 3、もしくは配列番号 2 5 を含む、

項目 2 6 に記載の単離された核酸分子。

( 項目 2 8 )

項目 2 6 または項目 2 7 に記載の単離された核酸分子を含む、発現ベクター。

( 項目 2 9 )

項目 2 6 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の核酸分子または発現ベクターで形質転換された、単離された宿主細胞。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1 A】図 1 A ~ 1 E : G P C 3 に対する新しいモノクローナル抗体の知見。( 図 1 A ) G P C 3 の概略構造。ヒト G P C 3 遺伝子は、5 8 0 個のアミノ酸の 7 0 k D a 前駆タンパク質をコードする。細胞膜における成熟型において、G P I アンカーが、C 末端シグナルに取って代わっている(推定切断部位: S 5 6 0)。そのコアタンパク質は、ジスルフィド架橋を形成するシステイン残基によってまとめられている。ヘパラン硫酸(H S)鎖がそのポリペプチドコアに付着している。成熟 G P C 3 の C 末端に対応する免疫化ペプチドが示されている。( 図 1 B ) ハイスループットフローサイトメトリースクリーニング。陽性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(上のパネル)および陰性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(下のパネル)。各ハイブリドーマを、フローサイトメトリー分析における抗原陽性 A 4 3 1 / G 1 細胞および抗原陰性 A 4 3 1 細胞の 1 : 1 混合物を組み入れた同時結合アッセイにより、G P C 3 特異的 m A b 産生について試験した。( 図 1 C ) A 4 3 1 / G 1 および H e p 3 B を用いた、5 つの選択されたマウスハイブリドーマクローン( Y P 6、Y P 7、Y P 8、Y P 9、および Y P 9 . 1 ) ( 実線 ) および 1 G 1 2 ( 対照抗 G P C 3 m A b ) ( 中央の点線 ) のフローサイトメトリー分析。塗りつぶされたピーク: アイソタイプ対照。( 図 1 D ) 組換え G P C 3 タンパク質における 5 つのハイブリドーマクローンの E L I S A 分析。G P C 3 : 組換え G P C 3 - ヒト F c ; G P C 3 H S : H S を含まない組換え G P C 3 ; 対照: B S A ; 1 G 1 2 : 市販の抗 G P C 3 m A b。( 図 1 E ) Y P 7 および Y P 9 のウェスタンブロット分析。H e p G 2、H e p 3 B、A 4 3 1 / G 1 ( A 4 3 1 . G P C 3 + )、および A 4 3 1 の 3 0 μ g の細胞全体の溶解産物を負荷し、各ハイブリドーマ上清で探索した。

【図 1 B】図 1 A ~ 1 E : G P C 3 に対する新しいモノクローナル抗体の知見。( 図 1 A ) G P C 3 の概略構造。ヒト G P C 3 遺伝子は、5 8 0 個のアミノ酸の 7 0 k D a 前駆タンパク質をコードする。細胞膜における成熟型において、G P I アンカーが、C 末端シグナルに取って代わっている(推定切断部位: S 5 6 0)。そのコアタンパク質は、ジスルフィド架橋を形成するシステイン残基によってまとめられている。ヘパラン硫酸(H S)鎖がそのポリペプチドコアに付着している。成熟 G P C 3 の C 末端に対応する免疫化ペプチドが示されている。( 図 1 B ) ハイスループットフローサイトメトリースクリーニング。陽性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(上のパネル)および陰性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(下のパネル)。各ハイブリドーマを、フローサイトメトリー分析における抗原陽性 A 4 3 1 / G 1 細胞および抗原陰性 A 4 3 1 細胞の 1 : 1 混合物を組み入れた同時結合アッセイにより、G P C 3 特異的 m A b 産生について試験した。( 図 1 C ) A 4 3 1 / G 1 および H e p 3 B を用いた、5 つの選択されたマウスハイブリドーマクローン( Y P 6、Y P 7、Y P 8、Y P 9、および Y P 9 . 1 ) ( 実線 ) および 1 G 1 2 ( 対照抗 G P C 3 m A b ) ( 中央の点線 ) のフローサイトメトリー分析。塗りつぶされたピーク: アイソタイプ対照。( 図 1 D ) 組換え G P C 3 タンパク質における 5 つのハイブリドーマクローンの E L I S A 分析。G P C 3 : 組換え G P C 3 - ヒト F c ; G P C 3 H S : H S を含まない組換え G P C 3 ; 対照: B S A ; 1 G 1 2 : 市販の抗 G P C 3 m A b。( 図 1 E ) Y P 7 および Y P 9 のウェスタンブロット分析。H e p G 2、H e p 3 B、A 4 3 1 / G 1 ( A 4 3 1 . G P C 3 + )、および A 4 3 1 の 3 0 μ g の細胞全体の溶解産物を負荷し、各ハイブリドーマ上清で探索した。

10

20

30

40

50

【図1C】図1A～1E：GPC3に対する新しいモノクローナル抗体の知見。(図1A) GPC3の概略構造。ヒトGPC3遺伝子は、580個のアミノ酸の70kDa前駆タンパク質をコードする。細胞膜における成熟型において、GPIアンカーが、C末端シグナルに取って代わっている(推定切断部位：S560)。そのコアタンパク質は、ジスルフィド架橋を形成するシステイン残基によってまとめられている。ヘパラン硫酸(HS)鎖がそのポリペプチドコアに付着している。成熟GPC3のC末端に対応する免疫化ペプチドが示されている。(図1B)ハイスループットフローサイトメトリースクリーニング。陽性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(上のパネル)および陰性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(下のパネル)。各ハイブリドーマを、フローサイトメトリー分析における抗原陽性A431/G1細胞および抗原陰性A431細胞の1:1混合物を組み入れた同時結合アッセイにより、GPC3特異的mAb産生について試験した。(図1C)A431/G1およびHep3Bを用いた、5つの選択されたマウスハイブリドーマクローン(YP6、YP7、YP8、YP9、およびYP9.1)(実線)および1G12(対照抗GPC3 mAb)(中央の点線)のフローサイトメトリー分析。塗りつぶされたピーク：アイソタイプ対照。(図1D)組換えGPC3タンパク質における5つのハイブリドーマクローンのELISA分析。GPC3：組換えGPC3-ヒトFc；GPC3 HS：HSを含まない組換えGPC3；対照：BSA；1G12：市販の抗GPC3 mAb。(図1E)YP7およびYP9のウェスタンブロット分析。HepG2、Hep3B、A431/G1(A431.GPC3+)、およびA431の30μgの細胞全体の溶解産物を負荷し、各ハイブリドーマ上清で探索した。

10

20

【図1D】図1A～1E：GPC3に対する新しいモノクローナル抗体の知見。(図1A) GPC3の概略構造。ヒトGPC3遺伝子は、580個のアミノ酸の70kDa前駆タンパク質をコードする。細胞膜における成熟型において、GPIアンカーが、C末端シグナルに取って代わっている(推定切断部位：S560)。そのコアタンパク質は、ジスルフィド架橋を形成するシステイン残基によってまとめられている。ヘパラン硫酸(HS)鎖がそのポリペプチドコアに付着している。成熟GPC3のC末端に対応する免疫化ペプチドが示されている。(図1B)ハイスループットフローサイトメトリースクリーニング。陽性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(上のパネル)および陰性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(下のパネル)。各ハイブリドーマを、フローサイトメトリー分析における抗原陽性A431/G1細胞および抗原陰性A431細胞の1:1混合物を組み入れた同時結合アッセイにより、GPC3特異的mAb産生について試験した。(図1C)A431/G1およびHep3Bを用いた、5つの選択されたマウスハイブリドーマクローン(YP6、YP7、YP8、YP9、およびYP9.1)(実線)および1G12(対照抗GPC3 mAb)(中央の点線)のフローサイトメトリー分析。塗りつぶされたピーク：アイソタイプ対照。(図1D)組換えGPC3タンパク質における5つのハイブリドーマクローンのELISA分析。GPC3：組換えGPC3-ヒトFc；GPC3 HS：HSを含まない組換えGPC3；対照：BSA；1G12：市販の抗GPC3 mAb。(図1E)YP7およびYP9のウェスタンブロット分析。HepG2、Hep3B、A431/G1(A431.GPC3+)、およびA431の30μgの細胞全体の溶解産物を負荷し、各ハイブリドーマ上清で探索した。

30

40

【図1E】図1A～1E：GPC3に対する新しいモノクローナル抗体の知見。(図1A) GPC3の概略構造。ヒトGPC3遺伝子は、580個のアミノ酸の70kDa前駆タンパク質をコードする。細胞膜における成熟型において、GPIアンカーが、C末端シグナルに取って代わっている(推定切断部位：S560)。そのコアタンパク質は、ジスルフィド架橋を形成するシステイン残基によってまとめられている。ヘパラン硫酸(HS)鎖がそのポリペプチドコアに付着している。成熟GPC3のC末端に対応する免疫化ペプチドが示されている。(図1B)ハイスループットフローサイトメトリースクリーニング。陽性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(上のパネル)および陰性上清に関して得られた代表的なヒストグラム(下のパネル)。各ハイブリドーマを、フローサイトメトリー分析における抗原陽性A431/G1細胞および抗原陰性A431細胞の1:1混

50

合物を組み入れた同時結合アッセイにより、GPC3特異的mAb産生について試験した。(図1C) A431/G1およびHep3Bを用いた、5つの選択されたマウスハイブリドマクロン(YP6、YP7、YP8、YP9、およびYP9.1)(実線)および1G12(対照抗GPC3 mAb)(中央の点線)のフローサイトメトリー分析。塗りつぶされたピーク：アイソタイプ対照。(図1D)組換えGPC3タンパク質における5つのハイブリドマクロンのELISA分析。GPC3：組換えGPC3-ヒトFc；GPC3 HS：HSを含まない組換えGPC3；対照：BSA；1G12：市販の抗GPC3 mAb。(図1E) YP7およびYP9のウェスタンブロット分析。HepG2、Hep3B、A431/G1(A431.GPC3+)、およびA431の30μgの細胞全体の溶解産物を負荷し、各ハイブリドマ上清で探索した。

10

【図2A】図2A~2C：YP7結合特性の特徴づけ。(図2A)内因性GPC3発現ヒト細胞系のパネルを用いたフローサイトメトリー分析。4つのHCC細胞系(HepG2、Hep3B、Huh4、およびHuh7)、4つのCCA細胞系(HuCC1、KMBC、KMCH、およびMz-ChA-1)、1つの卵巣CCC細胞系(TOV-21G)、および1つのメラノーマ細胞系(UACC-62)へのYP7の結合が示されている。(図2B)細胞表面会合型GPC3に対するYP7の結合親和性測定。MFI：平均蛍光強度。スキャッチャードプロットおよび $K_D$ 値を、Prismを用いて計算した。(図2C)組換えGPC1タンパク質、組換えGPC3タンパク質、および組換えGPC5タンパク質におけるYP7の結合。

【図2B】図2A~2C：YP7結合特性の特徴づけ。(図2A)内因性GPC3発現ヒト細胞系のパネルを用いたフローサイトメトリー分析。4つのHCC細胞系(HepG2、Hep3B、Huh4、およびHuh7)、4つのCCA細胞系(HuCC1、KMBC、KMCH、およびMz-ChA-1)、1つの卵巣CCC細胞系(TOV-21G)、および1つのメラノーマ細胞系(UACC-62)へのYP7の結合が示されている。(図2B)細胞表面会合型GPC3に対するYP7の結合親和性測定。MFI：平均蛍光強度。スキャッチャードプロットおよび $K_D$ 値を、Prismを用いて計算した。(図2C)組換えGPC1タンパク質、組換えGPC3タンパク質、および組換えGPC5タンパク質におけるYP7の結合。

20

【図2C】図2A~2C：YP7結合特性の特徴づけ。(図2A)内因性GPC3発現ヒト細胞系のパネルを用いたフローサイトメトリー分析。4つのHCC細胞系(HepG2、Hep3B、Huh4、およびHuh7)、4つのCCA細胞系(HuCC1、KMBC、KMCH、およびMz-ChA-1)、1つの卵巣CCC細胞系(TOV-21G)、および1つのメラノーマ細胞系(UACC-62)へのYP7の結合が示されている。(図2B)細胞表面会合型GPC3に対するYP7の結合親和性測定。MFI：平均蛍光強度。スキャッチャードプロットおよび $K_D$ 値を、Prismを用いて計算した。(図2C)組換えGPC1タンパク質、組換えGPC3タンパク質、および組換えGPC5タンパク質におけるYP7の結合。

30

【図3A】図3A~3E：肝臓がんにおけるGPC3タンパク質発現。(図3A)ウェスタンブロットで検出された肝臓がん細胞系におけるGPC3発現。HCC：肝細胞がん腫；CCA：胆管がん腫；1G12：GPC3に対する市販のmAb；Mz：Mz-ChA-1；SK：SK-Hep-1。(図3B)卵巣明細胞がん腫(CCC)のウェスタンブロット。TOV-21G：卵巣CCC系。(図3C)培養上清から免疫沈降されて、ウェスタンブロットにより分析された可溶性GPC3タンパク質。YP7を用いて、培養上清における可溶性GPC3タンパク質をプルダウンした。H：マウスIgG重鎖；L：マウスIgG軽鎖；C末端：C末端サブユニット(約30kDa)；IP：免疫沈降。(図3D)9つのHCCおよび9つのCCAの原発性肝臓腫瘍組織におけるウェスタンブロットによるGPC3発現分析。(図3E)HCC組織におけるGPC3の免疫組織化学法。円形は、低倍率における、明瞭なGPC3陽性があるかまたはない腫瘍巢(a、c)を識別する。矢印は、より高い倍率における、GPC3陽性があるかまたはない腫瘍(b、d)を識別する。a、c：100x；bおよびd：aおよびcそれぞれの

40

50

より高い倍率(400x)。

【図3B】図3A~3E: 肝臓がんにおけるGPC3タンパク質発現。(図3A) ウェスタンブロッティングで検出された肝臓がん細胞系におけるGPC3発現。HCC: 肝細胞がん腫; CCA: 胆管がん腫; 1G12: GPC3に対する市販のmAb; Mz: Mz-ChA-1; SK: SK-Hep-1。(図3B) 卵巣明細胞がん腫(CCC)のウェスタンブロット。TOV-21G: 卵巣CCC系。(図3C) 培養上清から免疫沈降されて、ウェスタンブロッティングにより分析された可溶性GPC3タンパク質。YP7を用いて、培養上清における可溶性GPC3タンパク質をプルダウンした。H: マウスIgG重鎖; L: マウスIgG軽鎖; C末端: C末端サブユニット(約30kDa); IP: 免疫沈降。(図3D) 9つのHCCおよび9つのCCAの原発性肝臓腫瘍組織におけるウェスタンブロッティングによるGPC3発現分析。(図3E) HCC組織におけるGPC3の免疫組織化学法。円形は、低倍率における、明瞭なGPC3陽性があるかまたはない腫瘍巢(a、c)を識別する。矢印は、より高い倍率における、GPC3陽性があるかまたはない腫瘍(b、d)を識別する。a、c: 100x; bおよびd: aおよびcそれぞれのより高い倍率(400x)。

10

【図3C】図3A~3E: 肝臓がんにおけるGPC3タンパク質発現。(図3A) ウェスタンブロッティングで検出された肝臓がん細胞系におけるGPC3発現。HCC: 肝細胞がん腫; CCA: 胆管がん腫; 1G12: GPC3に対する市販のmAb; Mz: Mz-ChA-1; SK: SK-Hep-1。(図3B) 卵巣明細胞がん腫(CCC)のウェスタンブロット。TOV-21G: 卵巣CCC系。(図3C) 培養上清から免疫沈降されて、ウェスタンブロッティングにより分析された可溶性GPC3タンパク質。YP7を用いて、培養上清における可溶性GPC3タンパク質をプルダウンした。H: マウスIgG重鎖; L: マウスIgG軽鎖; C末端: C末端サブユニット(約30kDa); IP: 免疫沈降。(図3D) 9つのHCCおよび9つのCCAの原発性肝臓腫瘍組織におけるウェスタンブロッティングによるGPC3発現分析。(図3E) HCC組織におけるGPC3の免疫組織化学法。円形は、低倍率における、明瞭なGPC3陽性があるかまたはない腫瘍巢(a、c)を識別する。矢印は、より高い倍率における、GPC3陽性があるかまたはない腫瘍(b、d)を識別する。a、c: 100x; bおよびd: aおよびcそれぞれのより高い倍率(400x)。

20

【図3D】図3A~3E: 肝臓がんにおけるGPC3タンパク質発現。(図3A) ウェスタンブロッティングで検出された肝臓がん細胞系におけるGPC3発現。HCC: 肝細胞がん腫; CCA: 胆管がん腫; 1G12: GPC3に対する市販のmAb; Mz: Mz-ChA-1; SK: SK-Hep-1。(図3B) 卵巣明細胞がん腫(CCC)のウェスタンブロット。TOV-21G: 卵巣CCC系。(図3C) 培養上清から免疫沈降されて、ウェスタンブロッティングにより分析された可溶性GPC3タンパク質。YP7を用いて、培養上清における可溶性GPC3タンパク質をプルダウンした。H: マウスIgG重鎖; L: マウスIgG軽鎖; C末端: C末端サブユニット(約30kDa); IP: 免疫沈降。(図3D) 9つのHCCおよび9つのCCAの原発性肝臓腫瘍組織におけるウェスタンブロッティングによるGPC3発現分析。(図3E) HCC組織におけるGPC3の免疫組織化学法。円形は、低倍率における、明瞭なGPC3陽性があるかまたはない腫瘍巢(a、c)を識別する。矢印は、より高い倍率における、GPC3陽性があるかまたはない腫瘍(b、d)を識別する。a、c: 100x; bおよびd: aおよびcそれぞれのより高い倍率(400x)。

30

【図3E】図3A~3E: 肝臓がんにおけるGPC3タンパク質発現。(図3A) ウェスタンブロッティングで検出された肝臓がん細胞系におけるGPC3発現。HCC: 肝細胞がん腫; CCA: 胆管がん腫; 1G12: GPC3に対する市販のmAb; Mz: Mz-ChA-1; SK: SK-Hep-1。(図3B) 卵巣明細胞がん腫(CCC)のウェスタンブロット。TOV-21G: 卵巣CCC系。(図3C) 培養上清から免疫沈降されて、ウェスタンブロッティングにより分析された可溶性GPC3タンパク質。YP7を用いて、培養上清における可溶性GPC3タンパク質をプルダウンした。H: マウスIgG重

40

50

鎖；L：マウス IgG 軽鎖；C 末端：C 末端サブユニット（約 30 kDa）；IP：免疫沈降。（図 3D）9 つの HCC および 9 つの CCA の原発性肝臓腫瘍組織におけるウェスタンブロッティングによる GPC3 発現分析。（図 3E）HCC 組織における GPC3 の免疫組織化学法。円形は、低倍率における、明瞭な GPC3 陽性があるかまたはない腫瘍巣（a、c）を識別する。矢印は、より高い倍率における、GPC3 陽性があるかまたはない腫瘍（b、d）を識別する。a、c：100x；b および d：a および c それぞれのより高い倍率（400x）。

【図 4A】図 4A～4B：HCC 異種移植片モデルにおける YP7 の抗腫瘍活性。（図 4A）BALB/c nu/nu マウスに HepG2 細胞を皮下に接種した。腫瘍が 100 mm<sup>3</sup> の平均体積に達した時、マウスに 5 mg/kg の YP7 を週 2 回、2 週間半、投与した。矢印：YP7 注射；\* p < 0.05。（図 4B）処置群（YP7）および未処置群（ビヒクル）における HCC 腫瘍を有する代表的なマウス。

10

【図 4B】図 4A～4B：HCC 異種移植片モデルにおける YP7 の抗腫瘍活性。（図 4A）BALB/c nu/nu マウスに HepG2 細胞を皮下に接種した。腫瘍が 100 mm<sup>3</sup> の平均体積に達した時、マウスに 5 mg/kg の YP7 を週 2 回、2 週間半、投与した。矢印：YP7 注射；\* p < 0.05。（図 4B）処置群（YP7）および未処置群（ビヒクル）における HCC 腫瘍を有する代表的なマウス。

【図 5】図 5 は、IMGT（太字）および Kabat（下線）を用いて決定された場合の CDR1、CDR2、および CDR3 の位置を示す、YP6 クローン 4（配列番号 15）、YP6 クローン 7（配列番号 36）、YP8（配列番号 15）、YP7（配列番号 7）、YP9（配列番号 19）、および YP9.1（配列番号 11）の VH 配列のヌクレオチドアラインメントである。

20

【図 6】図 6 は、IMGT（太字）および Kabat（下線）を用いて決定された場合の CDR1、CDR2、および CDR3 の位置を示す、YP6 クローン 4（配列番号 16）、YP6 クローン 7（配列番号 37）、YP8（配列番号 16）、YP7（配列番号 8）、YP9（配列番号 20）、および YP9.1（配列番号 12）の VH 配列のアミノ酸アラインメントである。

【図 7A】図 7A～7B は、IMGT（太字）および Kabat（下線）を用いて決定された場合の CDR1、CDR2、および CDR3 の位置を示す、YP6（配列番号 17）、YP8（配列番号 17）、YP9 クローン 9（配列番号 21）、YP9 クローン 1（配列番号 25）、YP9 クローン 10（配列番号 23）、YP9.1（配列番号 13）、および YP7（配列番号 9）の VL 配列のヌクレオチドアラインメントを示す。

30

【図 7B】図 7A～7B は、IMGT（太字）および Kabat（下線）を用いて決定された場合の CDR1、CDR2、および CDR3 の位置を示す、YP6（配列番号 17）、YP8（配列番号 17）、YP9 クローン 9（配列番号 21）、YP9 クローン 1（配列番号 25）、YP9 クローン 10（配列番号 23）、YP9.1（配列番号 13）、および YP7（配列番号 9）の VL 配列のヌクレオチドアラインメントを示す。

【図 8】図 8 は、IMGT（太字）および Kabat（下線）を用いて決定された場合の CDR1、CDR2、および CDR3 の位置を示す、YP6（配列番号 18）、YP8（配列番号 18）、YP9 クローン 9（配列番号 22）、YP9 クローン 1（配列番号 26）、YP9 クローン 10（配列番号 24）、YP9.1（配列番号 14）、および YP7（配列番号 10）の VL 配列のアミノ酸アラインメントである。

40

【図 9A】図 9A～9D は、GPC3 特異的免疫毒素のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。（図 9A）YP7 ScFv-PE38 免疫毒素のヌクレオチド配列（配列番号 27）およびアミノ酸配列（配列番号 28）。（図 9B）YP8 ScFv-PE38 免疫毒素のヌクレオチド配列（配列番号 30）およびアミノ酸配列（配列番号 31）。（図 9C）YP9 ScFv-PE38 免疫毒素のヌクレオチド配列（配列番号 32）およびアミノ酸配列（配列番号 33）。（図 9D）YP9.1 ScFv-PE38 免疫毒素のヌクレオチド配列（配列番号 34）およびアミノ酸配列（配列番号 35）。図 9A～9D において、VH 配列は下線が引かれ、VL 配列は太字で示され、PE38 配列はイタリック体

50

で、かつ下線が引かれている。

【図9B】図9A～9Dは、GPC3特異的免疫毒素のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。(図9A) Y P 7 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号27)およびアミノ酸配列(配列番号28)。(図9B) Y P 8 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号30)およびアミノ酸配列(配列番号31)。(図9C) Y P 9 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号32)およびアミノ酸配列(配列番号33)。(図9D) Y P 9 . 1 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号34)およびアミノ酸配列(配列番号35)。図9A～9Dにおいて、V H配列は下線が引かれ、V L配列は太字で示され、P E 3 8配列はイタリック体で、かつ下線が引かれている。

10

【図9C】図9A～9Dは、GPC3特異的免疫毒素のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。(図9A) Y P 7 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号27)およびアミノ酸配列(配列番号28)。(図9B) Y P 8 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号30)およびアミノ酸配列(配列番号31)。(図9C) Y P 9 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号32)およびアミノ酸配列(配列番号33)。(図9D) Y P 9 . 1 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号34)およびアミノ酸配列(配列番号35)。図9A～9Dにおいて、V H配列は下線が引かれ、V L配列は太字で示され、P E 3 8配列はイタリック体で、かつ下線が引かれている。

【図9D】図9A～9Dは、GPC3特異的免疫毒素のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。(図9A) Y P 7 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号27)およびアミノ酸配列(配列番号28)。(図9B) Y P 8 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号30)およびアミノ酸配列(配列番号31)。(図9C) Y P 9 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号32)およびアミノ酸配列(配列番号33)。(図9D) Y P 9 . 1 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列(配列番号34)およびアミノ酸配列(配列番号35)。図9A～9Dにおいて、V H配列は下線が引かれ、V L配列は太字で示され、P E 3 8配列はイタリック体で、かつ下線が引かれている。

20

【図10】図10は、GPC3発現細胞系G1(左)、HepG2(中央)、およびHep3B(右)に対する抗GPC3免疫毒素(Y P 7 I T、Y P 8 I T、Y P 9 I T、およびY P 9 . 1 I T)の結合親和性を示す一連のグラフである。これらの細胞系上での免疫毒素結合は、フローサイトメトリーによって測定される蛍光(幾何平均値)により示されている。

30

【図11】図11は、GPC3発現細胞系G1(左)、HepG2(中央)、およびHep3B(右)に対する抗GPC3免疫毒素(Y P 7 I T、Y P 8 I T、Y P 9 I T、およびY P 9 . 1 I T)の細胞傷害性を示す一連のグラフである。細胞増殖をWST-8変換によって評価した。450nmにおける試料の吸光度を、650nmの参照波長と共に測定した。

【発明を実施するための形態】

【0014】

配列表

添付の配列表に列挙される核酸配列およびアミノ酸配列は、37C.F.R.1.822に規定されているように、ヌクレオチド塩基に対する標準的な文字の省略形、およびアミノ酸に対する3文字コードを用いて示される。各核酸配列の片方の鎖だけが示されるが、相補鎖は、表示される鎖に対する任意の参照によって含められると理解される。配列表は、2013年5月21日に作成された、68.6KBのASCIIテキストファイルとして提出されており、それは、本明細書中に参考として援用される。添付の配列表においては以下のとおりである：

配列番号1は、PE38のアミノ酸配列である。

【0015】

40

50

- 配列番号 2 は、P E - L R のアミノ酸配列である。
- 【 0 0 1 6 】
- 配列番号 3 は、P E - L R / 6 X のアミノ酸配列である。
- 【 0 0 1 7 】
- 配列番号 4 は、免疫原性が低減した P E のアミノ酸配列である。
- 【 0 0 1 8 】
- 配列番号 5 は、P E - L R / 8 M のアミノ酸配列である。
- 【 0 0 1 9 】
- 配列番号 6 は、G P C 3 ペプチドのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 2 0 】 10
- 配列番号 7 は、Y P 7 V H ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 2 1 】
- 配列番号 8 は、Y P 7 V H ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 2 2 】
- 配列番号 9 は、Y P 7 V L ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 2 3 】
- 配列番号 1 0 は、Y P 7 V L ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 2 4 】
- 配列番号 1 1 は、Y P 9 . 1 V H ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 2 5 】 20
- 配列番号 1 2 は、Y P 9 . 1 V H ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 2 6 】
- 配列番号 1 3 は、Y P 9 . 1 V L ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 2 7 】
- 配列番号 1 4 は、Y P 9 . 1 V L ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 2 8 】
- 配列番号 1 5 は、Y P 8 および Y P 6 のクローン 4 の V H ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 2 9 】 30
- 配列番号 1 6 は、Y P 8 および Y P 6 のクローン 4 の V H ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 3 0 】
- 配列番号 1 7 は、Y P 8 および Y P 6 の V L ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 3 1 】
- 配列番号 1 8 は、Y P 8 および Y P 6 の V L ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 3 2 】
- 配列番号 1 9 は、Y P 9 V H ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 3 3 】
- 配列番号 2 0 は、Y P 9 V H ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 3 4 】 40
- 配列番号 2 1 は、Y P 9 クローン 9 の V L ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 3 5 】
- 配列番号 2 2 は、Y P 9 クローン 9 の V L ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 3 6 】
- 配列番号 2 3 は、Y P 9 クローン 1 0 の V L ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 3 7 】
- 配列番号 2 4 は、Y P 9 クローン 1 0 の V L ドメインのアミノ酸配列である。
- 【 0 0 3 8 】
- 配列番号 2 5 は、Y P 9 クローン 1 の V L ドメインのヌクレオチド配列である。
- 【 0 0 3 9 】 50

配列番号 26 は、Y P 9 のクローン 1 の V L ドメインのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 0 】

配列番号 27 は、Y P 7 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 1 】

配列番号 28 は、Y P 7 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 29 は、P s e u d o m o n a s e x o t o x i n ( P E ) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 3 】

配列番号 30 は、Y P 8 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列である。 10

【 0 0 4 4 】

配列番号 31 は、Y P 8 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 32 は、Y P 9 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 33 は、Y P 9 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 7 】

配列番号 34 は、Y P 9 . 1 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 8 】

配列番号 35 は、Y P 9 . 1 S c F v - P E 3 8 免疫毒素のアミノ酸配列である。 20

【 0 0 4 9 】

配列番号 36 は、Y P 6 クローン 7 の V H ドメインのヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 0 】

配列番号 37 は、Y P 6 クローン 7 の V H ドメインのアミノ酸配列である。

【 0 0 5 1 】

配列番号 38 は、H - C D R 1 コンセンサスアミノ酸配列 ( I M G T ) である。

【 0 0 5 2 】

配列番号 39 は、H - C D R 2 コンセンサスアミノ酸配列 ( I M G T ) である。

【 0 0 5 3 】

配列番号 40 は、H - C D R 3 コンセンサスアミノ酸配列 ( I M G T ) である。 30

【 0 0 5 4 】

配列番号 41 は、H - C D R 1 コンセンサスアミノ酸配列 ( K a b a t ) である。

【 0 0 5 5 】

配列番号 42 は、H - C D R 2 コンセンサスアミノ酸配列 ( K a b a t ) である。

【 0 0 5 6 】

配列番号 43 は、H - C D R 3 コンセンサスアミノ酸配列 ( K a b a t ) である。

【 0 0 5 7 】

配列番号 44 は、H - C D R 1 コンセンサスアミノ酸配列 ( I M G T ) である。

【 0 0 5 8 】

配列番号 45 は、H - C D R 3 コンセンサスアミノ酸配列 ( I M G T および K a b a t ) である。 40

【 0 0 5 9 】

配列番号 46 は、H - C D R 1 コンセンサスアミノ酸配列 ( K a b a t ) である。

【 0 0 6 0 】

配列番号 47 は、H - C D R 2 コンセンサスアミノ酸配列 ( K a b a t ) である。

【 0 0 6 1 】

( 詳細な説明 )

I . 省略形

B S A ウシ血清アルブミン

C A R キメラ抗原受容体

CCA	胆管がん腫	
CCC	明細胞がん腫	
CDR	相補性決定領域	
CTL	細胞傷害性Tリンパ球	
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法	
FACS	蛍光活性化細胞ソーティング	
GPC3	グリピカン3	
GPI	グリコシルホスファチジルイノシトール	
HCC	肝細胞がん腫	
HS	ヘパラン硫酸	10
IC <sub>50</sub>	阻害濃度50	
Ig	免疫グロブリン	
IHC	免疫組織化学法	
IP	免疫沈降	
IT	免疫毒素	
KLH	キーホールリンペットヘモシアニン	
mAb	モノクローナル抗体	
MFI	平均蛍光強度	
PE	フィコエリトリン	
PE	<i>Pseudomonas</i> 外毒素	20
s.c.	皮下	
VHまたはV <sub>H</sub>	可変重鎖	
VLまたはV <sub>L</sub>	可変軽鎖	
【0062】		

#### II.用語および方法

別段述べられない限り、専門用語は、慣例的用法に従って使用される。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin, *Genes*, Oxford University Pressによる出版, 1994 (ISBN0-19-854287-9); Kendrewら (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd.による出版, 1994 (ISBN0-632-02182-9); および Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc.による出版, 1995 (ISBN1-56081-569-8)に見られ得る。

#### 【0063】

本開示の様々な実施形態の検討を容易にするために、特定の用語の説明が以下に提供される：

抗体：抗原（例えば、GPC3またはそのフラグメント）のエピトープを認識して結合する（例えば、特異的に認識し、それに特異的に結合する）、少なくとも軽鎖免疫グロブリン可変領域または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンド。免疫グロブリン分子は、重鎖および軽鎖から構成され、その各々が、可変重鎖（V<sub>H</sub>）領域および可変軽鎖（V<sub>L</sub>）領域と呼ばれる可変領域を有する。まとめると、V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域は、抗体によって認識される抗原への結合に参与する。

#### 【0064】

抗体には、当該分野で周知のインタクトな免疫グロブリンならびに抗体のバリエーションおよび部分（例えば、単ドメイン抗体（例えばVHドメイン抗体）、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)'<sub>2</sub>フラグメント、単鎖Fvタンパク質（「scFv」）およびジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」））が含まれる。scFvタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域および免疫グロブリンの重鎖可変領域が

リンカーによって結合された融合タンパク質であり、それらの鎖は、dsFvでは、それらの鎖の会合を安定化するジスルフィド結合を導入するように変異されている。用語「抗体」は、遺伝的に操作された形態（例えば、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）およびヘテロ結合体抗体（例えば、二重特異性抗体））も包含する。Pierce Catalog and Handbook, 1994 - 1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3<sup>rd</sup> Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997もまた参照のこと。

#### 【0065】

通常、天然に存在する免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続された重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。軽鎖には2つのタイプ、ラムダ（ $\lambda$ ）およびカッパー（ $\kappa$ ）が存在する。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス（またはアイソタイプ）：IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEが存在する。

#### 【0066】

重鎖および軽鎖の各々が、定常領域および可変領域を含む（それらの領域は、「ドメイン」としても知られる）。重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、一体となって抗原に特異的に結合する。軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域によって中断された「フレームワーク」領域を含む。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、Kabataら (Kabataら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照のこと) およびIMMUNOGENETICSデータベース (IMGT) (Lefranc, Nucleic Acids Res 29:207-9, 2001を参照のこと; およびimgt.cines.fr/IMGT\_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIgにおいてオンラインで)によって定義されている。種々の軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、ヒトなどの種内で比較的保存されている。構成要素である軽鎖および重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、3次元空間にCDRを配置し、整列させるように働く。

#### 【0067】

CDRは、主に、抗原のエピトープへの結合に関与する。各鎖のCDRは、通常、N末端から順番にナンバリングされたCDR1、CDR2およびCDR3と称され、また、しばしば、特定のCDRが位置する鎖によって特定される。したがって、 $V_H$ CDR3（またはH-CDR3）は、それが見られる抗体の重鎖の可変ドメインに位置するのに対し、 $V_L$ CDR1（またはL-CDR1）は、それが見られる抗体の軽鎖の可変ドメインのCDR1である。例えばGPC3に結合する抗体は、一般に、特異的な $V_H$ 領域配列および $V_L$ 領域配列、ひいては、特異的なCDR配列を有する。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位）を有する抗体は、異なるCDRを有する。CDRは、抗体ごとに異なるが、CDR内の限られた数のアミノ酸位置だけが、抗原結合に直接関わる。これらのCDR内の位置は、特異性決定残基（SDR）と呼ばれる。

#### 【0068】

「 $V_H$ 」または「 $VH$ 」に対する言及は、Fv、scFv、dsFvまたはFabの可変領域を含む、免疫グロブリン重鎖の可変領域のことを指す。「 $V_L$ 」または「 $VL$ 」に対する言及は、Fv、scFv、dsFvまたはFabの可変領域を含む、免疫グロブリン軽鎖の可変領域のことを指す。

#### 【0069】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単クローンまたは単一抗体の軽鎖遺伝子および/または重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生される抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって、例えば、ミエローマ細胞と免疫脾臓細胞との融合によってハイブリッド抗体を形成する細胞を作製することによって、作製

10

20

30

40

50

される。モノクローナル抗体には、ヒト化モノクローナル抗体が含まれる。

【0070】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの1つの種由来のフレームワーク残基、およびGPC3に特異的に結合するマウス抗体などの別の種由来のCDR（一般に抗原結合性を付与する）を有する。

【0071】

「ヒト」抗体（「完全ヒト」抗体とも呼ばれる）は、ヒトフレームワーク領域、およびヒト免疫グロブリン由来のすべてのCDRを含む抗体である。1つの例において、フレームワークおよびCDRは、同じ起源のヒト重鎖および/または軽鎖アミノ酸配列に由来する。しかしながら、1つのヒト抗体のフレームワークは、異なるヒト抗体のCDRを含むように操作され得る。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域、および非ヒト（例えば、マウス、ラットまたは合成）免疫グロブリンの1つ以上のCDRを含む免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。1つの実施形態において、そのすべてのCDRが、ヒト化免疫グロブリンにおいてドナー免疫グロブリン由来である。定常領域は、存在する必要はないが、存在する場合は、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%（例えば、約95%またはそれ以上）同一でなければならない。ゆえに、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分（おそらくCDRを除く）が、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンまたはヒト化抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから得られたアミノ酸による限られた数の置換を有し得る。ヒト化モノクローナル抗体または他のモノクローナル抗体は、抗原結合性または他の免疫グロブリンの機能に対して実質的に影響しない追加の保存的アミノ酸置換を有し得る。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作を用いて構築され得る（例えば、米国特許第5,585,089号を参照のこと）。

【0072】

結合親和性：抗原に対する抗体の親和性。1つの実施形態において、親和性は、Frankelら、Mol. Immunol., 16:101-106, 1979に記載されたScatchard法の変法によって計算される。別の実施形態において、結合親和性は、抗原/抗体の解離速度によって測定される。別の実施形態において、高結合親和性は、競合ラジオイムノアッセイによって測定される。別の実施形態において、結合親和性は、ELISAによって測定される。別の実施形態において、抗体親和性は、フローサイトメトリーによって測定される。抗原（例えば、GPC3）に「特異的に結合」する抗体は、この抗原に高親和性で結合しかつ他の無関係の抗原に有意に結合しない抗体である。

【0073】

化学療法因子：異常な細胞成長を特徴とする疾患の処置における治療上の有用性を備えた任意の化学因子。そのような疾患としては、腫瘍、新生物およびがん、ならびに乾癬などの肥厚成長を特徴とする疾患が挙げられる。1つの実施形態において、化学療法因子は、肝臓がん（例えばHCC）または別の腫瘍（例えば、卵巣がんまたはメラノーマ）の処置において有用な薬剤である。1つの実施形態において、化学療法因子は、放射性化合物である。当業者は、有用な化学療法因子を容易に識別することができる（例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th editionにおけるSlapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86; Abeloff, Clinical Oncology 2<sup>nd</sup> ed., (著作権)2000 Churchill Livingstone, IncにおけるPerryら、Chemotherapy, Ch. 17; Baltzer, L., Berkery, R. (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd

10

20

30

40

50

ed. St. Louis, Mosby - Year Book, 1995; Fischer D.S., Knobf, M.F., Durivage, H.J. (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby - Year Book, 1993を参照のこと)。併用化学療法は、がんを処置するための2つ以上の薬剤の投与である。一例は、例えば、放射性化合物または化学的化合物と併用されるGPC3に結合する抗体の投与である。

【0074】

保存的バリエーション：「保存的」アミノ酸置換は、GPC3へのタンパク質（例えば抗体）の親和性に実質的に影響しないかまたはその親和性を低下させない置換である。例えば、GPC3に特異的に結合するモノクローナル抗体は、多くとも約1個、多くとも約2個、多くとも約5個、多くとも(most)約10個、または多くとも約15個の保存的置換を含み得、GPC3ポリペプチドに特異的に結合し得る。「保存的バリエーション」という用語は、抗体がGPC3に特異的に結合するのであれば、置換されていない親アミノ酸の代わりに、置換されたアミノ酸を使用することも含む。非保存的置換は、活性またはGPC3への結合性を低下させる置換である。

10

【0075】

機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換表は、当業者に周知である。以下の6つの群が、互いに保存的置換であると考えられるアミノ酸の例である：

- 1) アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)；
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；
- 4) アルギニン(R)、リジン(K)；
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；および
- 6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)。

20

【0076】

相補性決定領域(CDR)：天然のIg結合部位の天然のFv領域の結合親和性および特異性を一体となって規定するアミノ酸配列。Igの軽鎖および重鎖の各々は、それぞれL-CDR1、L-CDR2、L-CDR3およびH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3と命名された3つのCDRを有する。

【0077】

接触：直接的な物理的会合の配置；固体の形態と液体の形態での両方を含む。

30

【0078】

細胞傷害性：生物の残りの部分の細胞とは対照的に、標的化されるように意図された細胞に対する、免疫毒素などの分子の毒性。1つの実施形態において、対照的に、用語「毒性」は、免疫毒素の標的化部分によって標的化されるように意図された細胞である細胞以外の細胞に対する免疫毒素の毒性のことを指し、用語「動物毒性」は、免疫毒素によって標的化されるように意図された細胞以外の細胞に対する免疫毒素の毒性による動物に対する免疫毒素の毒性のことを指す。

【0079】

縮重バリエーション：本開示の文脈では、「縮重バリエーション」とは、遺伝暗号の結果として縮重した配列を含む、GPC3ポリペプチドまたはGPC3に結合する抗体をコードするポリヌクレオチドをいう。20種の天然のアミノ酸が存在し、そのほとんどが、2つ以上のコドンによって指定される。それゆえ、縮重ヌクレオチド配列によってコードされるGPC3ポリペプチドまたはGPC3に結合する抗体のアミノ酸配列が変更されない限り、そのヌクレオチド配列のすべてが、含まれる。

40

【0080】

診断：病理学的状態（例えば、肝臓がん、卵巣がん、メラノーマまたは肺がんであるがこれらに限定されない）の存在または性質を特定すること。診断方法は、その感度および特異性が異なる。診断アッセイの「感度」は、検査で陽性とする罹患個体のパーセンテージ（真陽性のパーセント）である。診断アッセイの「特異性」は、1 - 偽陽性率であり、

50

ここで、偽陽性率は、検査で陽性とする疾患を有しない個体の割合と定義される。特定の診断方法は、ある状態の確定診断を提供しない可能性があるが、その方法が、診断に役立つ陽性の指標を提供する場合、その方法で十分である。「予後」は、肝臓がんまたは転移などの病理学的状態の発生の確率（例えば、重症度）である。

【0081】

エフェクター分子：キメラ分子が標的としている細胞に対して所望の効果を有するように意図されたキメラ分子の一部。エフェクター分子は、エフェクター部分（EM）、治療薬もしくは診断薬、または類似の用語としても知られる。

【0082】

治療薬としては、核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸または誘導体、糖タンパク質、放射性同位体、脂質、炭水化物または組換えウイルスのような化合物が挙げられる。核酸の治療用部分および診断用部分は、アンチセンス核酸、一本鎖または二重鎖DNAとの共有結合性架橋のための誘導体化オリゴヌクレオチド、および三重鎖形成オリゴヌクレオチドを含む。あるいは、抗GPC3抗体などの標的化部分に連結された分子は、被包系（例えば、治療用組成物（例えば、薬物、核酸（例えば、アンチセンス核酸）または循環系への直接的な露出から保護され得る別の治療部分）を含むリポソームまたはミセル）であり得る。抗体に付着されたリポソームを調製する手段は、当業者に周知である（例えば、米国特許第4,957,735号；およびConnorら、Pharm. Ther. 28:341-365, 1985を参照のこと）。診断用剤または診断用部分は、放射性同位体および他の検出可能な標識を含む。そのような目的のために有用な検出可能な標識もまた、当該分野で周知であり、それらとしては、放射性同位元素（例えば、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^90\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{125}\text{I}$ ）、フルオロフォア、化学発光剤および酵素が挙げられる。

【0083】

エピトープ：抗原決定基。これらは、抗原性である、すなわち、特定の免疫応答を誘発する、分子上の特定の化学基またはペプチド配列である。抗体は、ポリペプチド（例えば、GPC3）上の特定の抗原性エピトープに特異的に結合する。

【0084】

フレームワーク領域：CDR間に挿入されるアミノ酸配列。フレームワーク領域としては、可変軽鎖フレームワーク領域および可変重鎖フレームワーク領域が挙げられる。フレームワーク領域は、抗原結合にとって適切な配向でCDRを保持するように働く。

【0085】

グリピカン-3（GPC3）：グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーにより細胞表面に付着しているヘパラン硫酸（HS）プロテオグリカンのグリピカンファミリーのメンバー（FilmusおよびSelleck、J Clin Invest 108:497-501, 2001）。GPC3遺伝子は、約70kDaのコアタンパク質をコードし、それは、フーリンによって切断され、N末端40kDaフラグメントおよびC末端30kDaフラグメントを生じ得る。2つのHS鎖は、GPC3のC末端部分に付着している。GPC3および他のグリピカンファミリータンパク質は、細胞分裂および細胞成長制御において役割を果たす。GPC3は、HCC、ならびにメラノーマ、肺の扁平上皮がん腫、および卵巣の明細胞がん腫を含むいくつかの他のヒトがんにおいて高度に発現しているが（HoおよびKim、Eur J Cancer 47(3):333-338, 2011）、正常組織においては発現していない。GPC3は、SGB、DGSX、MXR7、SDYS、SGBS、OCI-5、SGBS1、およびGTR2-2としても知られている。

【0086】

ヒトGPC3の4つの既知のアイソフォームがある（アイソフォーム1~4）。GPC3の4つのアイソフォームの核酸配列およびアミノ酸配列は知られており、GenBankアクセッション番号NM\_001164617およびNP\_001158089（アイ

10

20

30

40

50

ソフォーム1) ; NM\_\_004484およびNP\_\_004475 (アイソフォーム2) ; NM\_\_001164618およびNP\_\_001158090 (アイソフォーム3) ; ならびにNM\_\_001164619およびNP\_\_001158091 (アイソフォーム4) が挙げられる。本開示のいくつかの実施形態において、本明細書に開示された抗体は、4つのヒトGPC3アイソフォームまたはその保存的バリエーションのうちの1つまたは複数を含む。

【0087】

HAMA (ヒト抗マウス抗体) 応答: ヒト被験体に投与されたマウス抗体の可変領域および定常領域に対するその患者における免疫応答。抗体の反復投与によって、患者の血清からその抗体がクリアランスされる速度が増大し得、また、患者においてアレルギー反応が誘発され得る。

10

【0088】

肝細胞がん腫 (HCC) : 典型的には、ウイルス性肝炎、肝臓毒素、または肝硬変 (アルコール依存によって引き起こされる場合が多い) に起因する炎症性肝臓を有する患者において起こる、肝臓の原発性悪性疾患。HCCはまた悪性ヘパトーマとも呼ばれる。

【0089】

宿主細胞: ベクターが伝播され得、そのDNAが発現され得る、細胞。その細胞は、原核生物または真核生物の細胞であり得る。この用語は、対象の宿主細胞の任意の子孫も含む。複製中に生じる変異が存在し得るので、すべての子孫が、親細胞と同一でない可能性があることが理解される。しかしながら、用語「宿主細胞」が使用されるとき、そのような子孫も含まれる。

20

【0090】

免疫応答: 刺激に対する免疫系の細胞 (例えば、B細胞、T細胞または単球) の応答。1つの実施形態において、その応答は、特定の抗原に特異的である (「抗原特異的応答」)。1つの実施形態において、免疫応答は、T細胞応答 (例えば、CD4<sup>+</sup> 応答またはCD8<sup>+</sup> 応答) である。別の実施形態において、その応答は、B細胞応答であり、特定の抗体の産生をもたらす。

【0091】

免疫結合体: 抗体またはその機能的フラグメントへのエフェクター分子の共有結合。そのエフェクター分子は、検出可能な標識または免疫毒素であり得る。毒素の特定の非限定的な例としては、アブリン、リシン、シュードモナス (Pseudomonas) 外毒素 (PE、例えば、PE35、PE37、PE38およびPE40)、ジフテリア毒素 (DT)、ボツリヌス毒素もしくはそれらの改変された毒素、または直接もしくは間接的に細胞の成長を阻害するもしくは細胞を殺滅する他の毒性物質が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、PEおよびDTは、代表的には、肝臓毒性によって死をもたらす、高度に毒性の化合物である。しかしながら、PEおよびDTは、その毒素の天然の標的化構成要素 (例えば、PEのドメインIaおよびDTのB鎖) を除去し、それを抗体などの異なる標的化部分で置き換えることによって、免疫毒素として使用するための形態に改変され得る。「キメラ分子」は、エフェクター分子に結合体化 (連結) された、リガンドまたは抗体などの標的化部分である。用語「結合体化された」または「連結された」とは、2つのポリペプチドを1つの連続したポリペプチド分子にすることを指す。1つの実施形態において、抗体は、エフェクター分子に接続される。別の実施形態において、エフェクター分子に接続された抗体は、体内での半減期を延長するために、タンパク質またはペプチドに対して脂質または他の分子とさらに接続される。その連結は、化学的手段または組換え手段によるものであり得る。1つの実施形態において、その連結は、化学的であり、ここで、抗体部分とエフェクター分子との反応は、それらの2つの分子間に形成される共有結合を作製することにより、1つの分子を形成する。ペプチドリンカー (短いペプチド配列) が、必要に応じて、抗体とエフェクター分子との間に含まれ得る。本来、免疫結合体は、別個の機能性を備える2つの分子 (例えば、抗体およびエフェクター分子) から調製されたので、それらは、時折、「キメラ分子」とも称される。ゆえに、用語「キメラ

30

40

50

分子」は、本明細書中で使用されるとき、エフェクター分子に結合体化（連結）された、リガンドまたは抗体などの標的化部分のことを指す。

【0092】

単離：「単離された」生物学的構成要素（例えば、核酸、タンパク質（抗体を含む）または細胞小器官）は、その構成要素が天然に存在する環境（例えば、細胞）内の他の生物学的構成要素、すなわち、他の染色体のおよび染色体外のDNAおよびRNA、タンパク質ならびに細胞小器官から実質的に分離されているか、または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語は、宿主細胞内の組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質ならびに化学的に合成された核酸も包含する。

10

【0093】

標識：その分子の検出を容易にするために別の分子（例えば、抗体またはタンパク質）に直接または間接的に結合体化される検出可能な化合物または組成物。標識の特定の非限定的な例としては、蛍光タグ、酵素の連結および放射性同位元素が挙げられる。1つの例において、「標識された抗体」とは、抗体における別の分子の組み込みのことを指す。例えば、標識は、検出可能なマーカー（例えば、放射標識されたアミノ酸の組み込み、または標識されたアビジン（例えば、光学的方法または比色法によって検出され得る蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン）によって検出され得るビオチニル部分とポリペプチドとの結合）である。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法は、当該分野で公知であり、それらを使用してよい。ポリペプチドに対する標識の例としては、以下：放射性同位体または放射性ヌクレオチド（例えば、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{125}\text{I}$ ）、蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、ランタニド燐光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）または磁性物質（例えば、ガドリニウムキレート）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、標識は、潜在的な立体障害を減少させるために様々な長さのスペーサーアームによって結合される。

20

30

【0094】

リンカー：ある場合には、リンカーは、可変重鎖と可変軽鎖とを間接的に結合するように働く抗体結合フラグメント（例えば、Fvフラグメント）内のペプチドである。「リンカー」は、抗体などの標的化部分を、細胞毒素または検出可能な標識などのエフェクター分子に連結するように働くペプチドのことも指し得る。

【0095】

用語「結合体化する」、「接続する」、「結合する」または「連結する」とは、2つのポリペプチドを1つの連続したポリペプチド分子にすること、またはscFvなどのポリペプチドに放射性核種もしくは他の分子を共有結合的に結合することを指す。特定の文脈において、それらの用語は、抗体部分などのリガンドをエフェクター分子に接続することに対する言及を包含する。その連結は、化学的手段または組換え手段による連結であり得る。「化学的手段」とは、抗体部分とエフェクター分子との間の反応（それにより、それらの2つの分子の間に共有結合が形成されて1つの分子が形成される）のことを指す。

40

【0096】

哺乳動物：この用語は、ヒトと非ヒト哺乳動物の両方を包含する。同様に、用語「被験体」は、ヒト被験体と動物被験体の両方を包含する。

【0097】

メラノーマ：メラノサイト（メラニン色素を産生する細胞）から起こるがんの一形態。メラノサイトは、主に皮膚に見られるが、腸および眼にも存在する。皮膚におけるメラノーマとしては、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、末端部黒子様黒色腫および悪性黒子（

50

メラノーマ)が挙げられる。上記タイプのいずれもが、メラニンを産生し得るか、またはメラニン欠乏であり得る。同様に、任意のサブタイプが、高悪性度の挙動、および局所的な再発の傾向のマーカーである線維形成(神経親和性を有する高密度線維反応)を示し得る。他のメラノーマとしては、明細胞肉腫、粘膜黒色腫(mucosal melanoma)およびブドウ膜黒色腫が挙げられる。

【0098】

新形成、悪性疾患、がんまたは腫瘍：新形成は、過剰な細胞分裂から生じる組織または細胞の異常増殖である。新形成増殖は、腫瘍を生じ得る。個体内の腫瘍の量は、その腫瘍の数、体積または重量として測定され得る「腫瘍量」である。転移しない腫瘍は、「良性」と称される。周囲の組織を浸潤し、かつ/または転移し得る腫瘍は、「悪性」と称される。血液学的腫瘍の例としては、白血病(急性白血病(例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病、ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病)、慢性白血病(例えば、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ性白血病)を含む)、真性多血症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫(緩徐進行型および高悪性型)、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、ヘアリーセル白血病および骨髄形成異常が挙げられる。

【0099】

肉腫およびがん腫などの固形腫瘍の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫および他の肉腫、滑膜腫(synovialoma)、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん腫、リンパ系悪性腫瘍、膵がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞がん腫、扁平上皮がん腫、基底細胞がん腫、腺がん、汗腺がん腫、甲状腺髄様がん腫、甲状腺乳頭がん腫、褐色細胞腫、皮脂腺がん腫、乳頭状がん腫、乳頭状腺がん、髄様がん腫、気管支原性がん腫、腎細胞がん腫、ヘパトーマ、胆管がん腫、絨毛がん腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、セミノーマ、膀胱がん腫およびCNS腫瘍(例えば、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫(cranio-pharyngioma)、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫(meningioma)、メラノーマ、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫)が挙げられる。

【0100】

いくつかの例において、腫瘍は、HCCまたは肝芽腫などの肝臓がん、メラノーマ、肺の扁平上皮がん腫などの扁平上皮がん腫、卵巣の明細胞がん腫などの明細胞がん腫、甲状腺がん、ウィルムス腫瘍、神経芽腫、または精巣胚細胞性腫瘍である。

【0101】

作動可能に連結される：第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的関係性で配置されるとき、第1の核酸配列は、第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、CMVプロモーターなどのプロモーターは、そのプロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合、そのコード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されるDNA配列は、2つのタンパク質コード領域を接続する必要がある場合、同じ読み枠において連続している。

【0102】

卵巣明細胞がん腫：全ての卵巣悪性疾患の5%未満の発生率である、上皮卵巣がんの弁別的な組織病理学的亜型。顕微鏡下で見ると、この型の腫瘍の細胞の内部がはっきり見える。

【0103】

医薬品：被験体または細胞に適切に投与されたときに、所望の治療効果または予防効果を誘導することができる化学的化合物または組成物。

【0104】

薬学的に許容され得るキャリア：薬学的に許容され得る有用なキャリアは、従来のキャリアである。E.W.MartinによるRemington's Pharmaceu

10

20

30

40

50

tical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975には、本明細書中に開示される抗体の薬学的送達に適した組成物および製剤が記載されている。

【0105】

一般に、キャリアの性質は、使用される特定の投与様式に依存する。例えば、非経口用の製剤は、通常、薬学的かつ生理的に許容され得る流体（例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなど）をビヒクルとして含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤またはカプセルの形態）の場合、従来の無毒性固体キャリアとしては、例えば、薬学的グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムが挙げられ得る。投与される薬学的組成物は、生物学的に中性のキャリアに加えて、少量の無毒性補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート）を含み得る。

10

【0106】

疾患を予防する、処置するまたは回復させる：疾患を「予防する」とは、疾患の完全な発症を阻害することを指す。「処置する」とは、疾患または病理学的状態が発症し始めた後に、それらの徴候または症状を回復させる治療的介入（例えば、腫瘍量の減少、または転移の数もしくは（of）サイズの減少）のことを指す。「回復させる」とは、がんなどの疾患の徴候または症状の数または重症度の減少のことを指す。

【0107】

精製された：精製されたという用語は、絶対的純度を要求しない；むしろ、それは相対的用語として意図される。したがって、例えば、精製されたペプチド調製物は、そのペプチドまたはタンパク質が、その天然環境において細胞内にあるそのペプチドまたはタンパク質より、より濃縮されているものである。1つの実施形態において、調製物は、そのタンパク質またはペプチドが、その調製物の総ペプチド含量または総タンパク質含量の少なくとも50%に相当するように精製されている。実質的精製は、他のタンパク質または細胞構成要素からの精製を意味する。実質的に精製されたタンパク質は、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%、または少なくとも98%純粋である。したがって、一つの特定の非限定的例において、実質的に精製されたタンパク質は、他のタンパク質または細胞構成要素の90%を含まない。

20

30

【0108】

組換え：組換え核酸は、天然に存在しない配列を有するか、または2つの別途分離された配列のセグメントの人工的な組み合わせによって作製された配列を有する、核酸である。この人工的な組み合わせは、化学的合成によって、または単離された核酸のセグメントの人工的な操作によって、例えば、遺伝子操作法によって、達成されることが多い。

【0109】

組換え毒素：細胞標的化部分が毒素に融合されたキメラタンパク質（Pastanら、Science, 254: 1173 - 1177, 1991）。細胞標的化部分が、抗体のFv部分である場合、その分子は、組換え免疫毒素と呼ばれる（Chaudharyら、Nature, 339: 394 - 397, 1989）。その毒素部分は、ほとんどの正常細胞上に存在する毒素レセプターに結合できないように遺伝的に変更されている。組換え免疫毒素は、抗原結合ドメインによって認識される細胞を選択的に殺滅する。これらの組換え毒素および免疫毒素は、がん、例えば、GPC3を発現しているがんを処置するために使用され得る。

40

【0110】

試料（または生物学的試料）：被験体から得られる、ゲノムDNA、（mRNAを含む）RNA、タンパク質、またはそれらの組合せを含有する生物学的検体。例として、末梢血、組織、細胞、尿、唾液、組織バイオプシー、細針吸引物、外科検体、および剖検材料が挙げられるが、それらに限定されない。一例において、試料としては、HCC組織バイオプシーなどの腫瘍バイオプシーが挙げられる。

50

## 【0111】

配列同一性：アミノ酸配列間または核酸配列間の類似性は、別途、配列同一性と称される、配列間の類似性に関して表現される。配列同一性は、パーセンテージ同一性（または類似性もしくは相同性）に関して測定されることが多い；そのパーセンテージが高いほど、その2つの配列はより似ている。ポリペプチドまたは核酸分子のホモログまたはバリエーションは、標準的な方法を用いてアラインメントされたとき、比較的高い程度の配列同一性を有する。

## 【0112】

比較するために配列をアラインメントする方法は、当該分野で周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが：Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73: 237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151, 1989; Corpetら、Nucleic Acids Research 16: 10881, 1988; および Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444, 1988に記載されている。Altschulら、Nature Genet. 6: 119, 1994には、配列アラインメント法および相同性の計算に関する詳細な考察が提供されている。

## 【0113】

NCBIベーシックローカルアラインメントサーチツール(BLAST)(Altschulら、J. Mol. Biol. 215: 403, 1990)は、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと関連して使用するために、いくつかの供給源(National Center for Biotechnology Information(NCBI, Bethesda, MD)およびインターネット上を含む)から入手可能である。どのようにしてこのプログラムを用いて配列同一性を決定するのかの説明は、インターネット上のNCBIのウェブサイトにおいて入手可能である。

## 【0114】

GPC3ポリペプチドに特異的に結合する抗体のV<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>のホモログおよびバリエーションは、代表的には、デフォルトのパラメータに設定されたNCBI Blast2.0, gapped blastpを用いた抗体のアミノ酸配列との完全長のアラインメントに対してカウントされるとき、少なくとも約75%、例えば、少なくとも、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%の配列同一性を有することを特徴とする。約30アミノ酸より長いアミノ酸配列を比較する場合、デフォルトのパラメータ(11というギャップ存在コスト(gap existence cost)および1という1残基当たりのギャップコスト(per residue gap cost))に設定されたデフォルトのBLOSUM62行列を用いて、Blast2配列関数が使用される。短いペプチド(およそ30アミノ酸未満)をアラインメントするとき、そのアラインメントは、デフォルトのパラメータ(オープンギャップ9、伸長ギャップ1ペナルティ)に設定されたPAM30行列を使用するBlast2配列関数を用いて行われるべきである。参照配列に対してさらにより高い類似性を有するタンパク質は、この方法によって評価されるとき、高いパーセンテージ同一性(例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性)を示す。全体の配列より小さい配列が、配列同一性のために比較されるとき、ホモログおよびバリエーションは、代表的には、10~20アミノ酸という狭い範囲にわたって少なくとも80%の配列同一性を有し、参照配列との類似性に応じて、少なくとも85%または少なくとも90%または95%の配列同一性を有し得る。そのような狭い範囲に対して配列同一性を測定するための方法は、インターネット上のNCB

10

20

30

40

50

I ウェブサイトにおいて利用可能である。当業者は、これらの配列同一性の範囲が、単に指針として提供されることを認識する；提供される範囲に入らない非常に有意なホモログを得ることができることも全く可能である。

【0115】

扁平上皮がん腫：皮膚、眼、様々な内部器官の表面、ならびにいくつかの腺の中空器官および管の裏打ちを形成する薄い平らな細胞である扁平上皮細胞から起こる、がんの1タイプ。扁平上皮がん腫は、類表皮がん腫とも称される。扁平上皮がんの1タイプは、肺の扁平上皮がん腫である。

【0116】

被験体：ヒト被験体と動物被験体（ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む）の両方を含むカテゴリである、生存している多細胞脊椎動物。

10

【0117】

治療有効量：処置される被験体において所望の効果を達成するのに十分な特定の物質の量。例えば、これは、腫瘍の成長を阻害するかまたは抑制するのに必要な量であり得る。1つの実施形態において、治療有効量は、腫瘍を排除するか、腫瘍のサイズを減少させるか、または腫瘍の転移を防止するのに必要な量である。被験体に投与されたときに、所望のインビトロ効果を達成すると示された標的組織濃度（例えば、腫瘍において）を達成する投与量が一般に使用される。

【0118】

毒素：細胞に対して細胞傷害性である分子。毒素としては、アブリン、リシン、Pseudomonas 外毒素（PE）、ジフテリア毒素（DT）、ボツリヌス毒素、サポリン、レストリクトシン（restrictocin）もしくはゲロニン（gelonin）またはそれらの改変された毒素が挙げられる。例えば、PEおよびDTは、代表的には、肝臓毒性によって死をもたらす、高度に毒性の化合物である。しかしながら、PEおよびDTは、その毒素の天然の標的化構成要素（例えば、PEのドメインIaまたはDTのB鎖）を除去し、それを抗体などの異なる標的化部分で置き換えることによって、免疫毒素として使用するための形態に改変され得る。

20

【0119】

ベクター：宿主細胞に導入され、それにより、形質転換された宿主細胞をもたらす、核酸分子。ベクターは、宿主細胞においてその複製を可能にする核酸配列（例えば、複製起点）を含み得る。ベクターは、1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子および当該分野で公知の他の遺伝的エレメントも含み得る。

30

【0120】

別段説明されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。単数形の用語「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の指示対象を含む。「AまたはBを含む」は、A、またはB、またはAおよびBを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドに対して与えられたすべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、およびすべての分子量または分子質量の値が、近似値であり、説明のために提供されていることが、さらに理解されるべきである。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価の方法および材料が、本開示の実施または試験において使用され得るが、好適な方法および材料が、下記に記載される。本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献の全体が、参考として援用される。矛盾する場合、用語の説明を含む本明細書が優先するものとする。さらに、その材料、方法および例は、単なる例示であって、限定すると意図されない。

40

【0121】

III. 序論

肝細胞がん腫（HCC）および胆管がん腫（CCA）は、原発性肝臓がんの2つの主要な型である。グリピカン-3（GPC3）は、HCCおよび他のがんにおける新しい標的である。しかしながら、腫瘍細胞は、GPC3のそれらの発現において不均一である。低

50

G P C 3 発現レベルを示す細胞を標的にするために用いられ得る高親和性モノクローナル抗体 ( m A b ) が存在しないことにより、G P C 3 標的化がん治療は妨げられてきた。

【 0 1 2 2 】

細胞表面結合についてG P C 3 特異的m A b ( Y P 6、Y P 7、Y P 8、Y P 9、およびY P 9 . 1 ) のパネルを効率的に単離したハイスループットのフローサイトメトリースクリーニング方法が本明細書に開示されている。その抗体は、フローサイトメトリー、イムノプロットイング、および免疫組織化学法によりヒト肝臓がん ( H C C および C C A ) 細胞系および組織においてG P C 3 タンパク質発現を特徴づけるために用いられた。最も高い親和性の抗体 ( Y P 7 ) は、非H C C 細胞系においてG P C 3 発現を評価するために用いられ、マウスにおいて腫瘍異種移植片に対する抗腫瘍細胞傷害活性について評価された。

10

【 0 1 2 3 】

本明細書に開示されたm A b は、がん細胞上の天然型のG P C 3、ならびに可溶性G P C 3 に対して高親和性で結合する。Y P 7 は、細胞表面会合型G P C 3 を、平衡解離定数  $K_D = 0.3 \text{ nmol/L}$  で結合し、H C C に対して非常に特異的であったが、C C A または正常組織のいずれに対しても特異的ではなかった。Y P 7 抗体は、それが低発現がん細胞においてG P C 3 を検出した点において感受性が非常に高く、マウスにおいて有意なH C C 腫瘍成長阻害を示した。P E 3 8 に融合した、本明細書に開示された抗体 ( Y P 7、Y P 8、Y P 9 クローン 9、またはY P 9 . 1 ) を含む免疫毒素は、G P C 3 発現細胞に対して非常に高い結合親和性を示し、G P C 3 発現がん細胞成長を有意に阻害した。したがって、本明細書に開示された高親和性m A b は、G P C 3 発現がん診断および治療のために用いることができる。

20

【 0 1 2 4 】

I V . G P C 3 を結合する高親和性モノクローナル抗体

細胞表面および可溶性のG P C 3 タンパク質に高親和性で結合する、モノクローナル抗体のパネルが本明細書に開示されている。Y P 7 抗体、Y P 8 抗体、Y P 9 抗体、およびY P 9 . 1 抗体のV H ドメインおよびV L ドメインのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が下記に示されている。表 1 ~ 4 は、K a b a t および I M G T によって決定される場合の、各抗体についてのC D R のヌクレオチド位置およびアミノ酸位置を列挙する。図 5 ~ 8 は、抗体のV H ドメインおよびV L ドメインのヌクレオチドアラインメントおよびアミノ酸アラインメントを示す。

30

【 0 1 2 5 】

Y P 7 V H ヌクレオチド配列 ( 配列番号 7 )

GAGGTGCAGCTTGTGAGACTGGTGGAGGAATGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATT  
CACCTTCAATAAGAATGCCATGAATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAATA  
AACTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTAAAAGCCAGGTTTACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG  
CTCTATCTGCAAAATGAACAACCTTGAAAATTGAGGACACAGCCATGTAATTTGTGTGGCTGGTAACTCGTTTGCTTACTG  
GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

【 0 1 2 6 】

Y P 7 V H アミノ酸配列 ( 配列番号 8 )

EVQLVETGGGMVQPEGSLKLSAASGFTFNKNAMNWVRQAPGKGLEWVARIRNKTNNYATYYADSVKARFTISRDDSQSM  
LYLQMNLLKIEDTAMYYCVAGNSFAYWGQGLTIVTSA

40

【 0 1 2 7 】

Y P 7 V L ヌクレオチド配列 ( 配列番号 9 )

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGTTGTGTCAATTGGAGAGAAGGTTACTATGACCTGCAAGTCCAGTCA  
GAGCCTTTTATATAGCAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGA  
TTTACTGGGCATCCAGTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGTTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATACTATCCGCTCACGTTCCGGTCTGG  
GACCAAGTTGGAGCTGAAA

【 0 1 2 8 】

50

Y P 7 V L アミノ酸配列 (配列番号 10)

DI VMSQSPSSLVVS IGEKVTMTCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLL IYWASSRESGVPDRFTGSGSGTDFLT  
ISSVKAEDLAVYYCQQYYNYPLTFGAGTKLELK

【 0 1 2 9 】

【 表 1 A 】

表1A. YP7 VH配列中のCDRの位置 (Kabatによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号7)	タンパク質配列 (配列番号8)
CDR1	ヌクレオチド91~105	アミノ酸31~35
CDR2	ヌクレオチド148~204	アミノ酸50~68
CDR3	ヌクレオチド301~318	アミノ酸101~106

10

【 0 1 3 0 】

【 表 1 B 】

表1B. YP7 VH配列中のCDRの位置 (IMGTによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号7)	タンパク質配列 (配列番号8)
CDR1	ヌクレオチド76~99	アミノ酸26~33
CDR2	ヌクレオチド151~180	アミノ酸51~60
CDR3	ヌクレオチド295~318	アミノ酸99~106

【 0 1 3 1 】

【 表 1 C 】

表1C. YP7 VL配列中のCDRの位置 (Kabatによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号9)	タンパク質配列 (配列番号10)
CDR1	ヌクレオチド70~120	アミノ酸24~40
CDR2	ヌクレオチド166~186	アミノ酸56~62
CDR3	ヌクレオチド283~309	アミノ酸95~103

20

【 0 1 3 2 】

【 表 1 D 】

表1D. YP7 VL配列中のCDRの位置 (IMGTによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号9)	タンパク質配列 (配列番号10)
CDR1	ヌクレオチド79~114	アミノ酸27~38
CDR2	ヌクレオチド166~174	アミノ酸56~58
CDR3	ヌクレオチド283~309	アミノ酸95~103

30

【 0 1 3 3 】

Y P 9 . 1 V H D N A 配列 (配列番号 11)

GAGGTGCAGCTTGTGAGACTGGCGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAACTCTCATGTGCAACGTCTGGATT  
CAACTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCGTAAGAAATA  
AAACTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTGAGTAAAGACAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGAATG  
GTCTTTCTGCAAATGAATAACTTGAAAAGTGGAGACACAGCCATCTATTACTGTGTGGCGGGAACTCGTTTGTATTG  
GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTCTCT

【 0 1 3 4 】

Y P 9 . 1 V H タンパク質配列 (配列番号 12)

EVQLVETGGGLVQPEGLSLKLSCATSGFNFTNAMNWVRQAPGKGLEWVARVRNKTNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQR  
MFLQMNLLKTEDTAIYYCVAGNSFAYWGQGLTIVTSP

【 0 1 3 5 】

Y P 9 . 1 V L D N A 配列 (配列番号 13)

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAGGGTACTATGAACTGCAAGTCCAGTCA  
GAGTCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGA

40

50

TTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGTATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
 ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAACTATCCGCTCACGTTCCGGTCTGG  
 GACCAAGCTGGAGCTGAAA

【 0 1 3 6 】

Y P 9 . 1 V L タンパク質配列 ( 配列番号 1 4 )

DIVMSQSPSSLAVSVGERVTMCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPG  
 QSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSVSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCQQYYNYPLTFGAGTKLELK

【 0 1 3 7 】

【 表 2 A 】

表2A. YP9. 1 VH配列中のCDRの位置(Kabatによる)

10

CDR	DNA 配列 (配列番号11)	タンパク質配列 (配列番号12)
CDR1	ヌクレオチド <sup>91</sup> ~105	アミノ酸 <sup>31</sup> ~35
CDR2	ヌクレオチド <sup>148</sup> ~204	アミノ酸 <sup>50</sup> ~68
CDR3	ヌクレオチド <sup>301</sup> ~318	アミノ酸 <sup>101</sup> ~106

【 0 1 3 8 】

【 表 2 B 】

表2B. YP9. 1 VH配列中のCDRの位置(IMGJによる)

20

CDR	DNA 配列 (配列番号11)	タンパク質配列 (配列番号12)
CDR1	ヌクレオチド <sup>76</sup> ~99	アミノ酸 <sup>26</sup> ~33
CDR2	ヌクレオチド <sup>151</sup> ~180	アミノ酸 <sup>51</sup> ~60
CDR3	ヌクレオチド <sup>295</sup> ~318	アミノ酸 <sup>99</sup> ~106

【 0 1 3 9 】

【 表 2 C 】

表2C. YP9. 1 VL配列中のCDRの位置(Kabatによる)

30

CDR	DNA 配列 (配列番号13)	タンパク質配列 (配列番号14)
CDR1	ヌクレオチド <sup>70</sup> ~120	アミノ酸 <sup>24</sup> ~40
CDR2	ヌクレオチド <sup>166</sup> ~186	アミノ酸 <sup>56</sup> ~62
CDR3	ヌクレオチド <sup>283</sup> ~309	アミノ酸 <sup>95</sup> ~103

【 0 1 4 0 】

【 表 2 D 】

表2D. YP9. 1 VL配列中のCDRの位置(IMGJによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号13)	タンパク質配列 (配列番号14)
CDR1	ヌクレオチド <sup>79</sup> ~114	アミノ酸 <sup>27</sup> ~38
CDR2	ヌクレオチド <sup>166</sup> ~174	アミノ酸 <sup>56</sup> ~58
CDR3	ヌクレオチド <sup>283</sup> ~309	アミノ酸 <sup>95</sup> ~103

【 0 1 4 1 】

40

Y P 8 V H ヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 5 )

GAGGTGCAGCTTGTGGAAGTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTCAAGACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAATA  
 AAATAATAATTATGCAACATATTATGCCGACTCAGTGAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG  
 CTCTATCTGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACAGCCATGTATTTCTGTGTGGCCGGTAACTCGTTTGCTTACTG  
 GGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

【 0 1 4 2 】

Y P 8 V H アミノ酸配列 ( 配列番号 1 6 )

EVQLVGGSGGLVQPEGLSLKLSAASGFTFKTNAMNWRQAPGKLEWVARIRNKTNYYATYYADSVKDRFTISRDDSQSM  
 LYLQMNLLKTEDTAMYFCVAGNSFAYWQGTLVTVSA

50

## 【 0 1 4 3 】

Y P 8 V Lヌクレオチド配列 (配列番号 1 7)

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACTGTGAACTGCAAGTCCAGTCA  
 GAGCCTTTTATATAGTAACAATCAAAGAAGTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
 TTTACTGGGCATCAACTAGGGAATATGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACC  
 ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAACTATCCGCTCACGTTCCGGTCTGG  
 GACCAAGCTGGAGCTGAAA

## 【 0 1 4 4 】

Y P 8 V Lアミノ酸配列 (配列番号 1 8)

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTVNCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTREYGVDPDRFTGSGSGTDFLT  
 ISSVKAEDLAVYYCQQYYNYPLTFGAGTKLELK

10

## 【 0 1 4 5 】

## 【表 3 A】

表3A. YP8 VH配列中のCDRの位置 (Kabatによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号15)	タンパク質配列 (配列番号16)
CDR1	ヌクレオチド91~105	アミノ酸31~35
CDR2	ヌクレオチド148~204	アミノ酸50~68
CDR3	ヌクレオチド301~318	アミノ酸101~106

## 【 0 1 4 6 】

## 【表 3 B】

表3B. YP8 VH配列中のCDRの位置 (IMGTによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号15)	タンパク質配列 (配列番号16)
CDR1	ヌクレオチド76~99	アミノ酸26~33
CDR2	ヌクレオチド151~180	アミノ酸51~60
CDR3	ヌクレオチド295~318	アミノ酸99~106

20

## 【 0 1 4 7 】

## 【表 3 C】

表3C. YP8 VL配列中のCDRの位置 (Kabatによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号17)	タンパク質配列 (配列番号18)
CDR1	ヌクレオチド70~120	アミノ酸24~40
CDR2	ヌクレオチド166~186	アミノ酸56~62
CDR3	ヌクレオチド283~309	アミノ酸95~103

30

## 【 0 1 4 8 】

## 【表 3 D】

表3D. YP8 VL配列中のCDRの位置 (IMGTによる)

CDR	DNA 配列 (配列番号17)	タンパク質配列 (配列番号18)
CDR1	ヌクレオチド79~114	アミノ酸27~38
CDR2	ヌクレオチド166~174	アミノ酸56~58
CDR3	ヌクレオチド283~309	アミノ酸95~103

40

## 【 0 1 4 9 】

Y P 9 V Hヌクレオチド配列 (配列番号 1 9)

GAGGTCCAGCTTGTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATT  
 CACCTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCGTAAGAAATA  
 AAATAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCCGTGAAAGACAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG  
 CTCTATCTGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACGGCCATTTATTACTGTGTGGGGGGTAACTCGTTTGCTTACTG  
 GGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

50

## 【 0 1 5 0 】

Y P 9 V H アミノ酸配列 (配列番号 2 0 )

EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGLQWVARVRNKTNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSM  
LYLQMNNLKTEDTAIYYCVGGNSFAYWGQGLVTVSA

## 【 0 1 5 1 】

Y P 9 クローン 9 の V L ヌクレオチド配列 (配列番号 2 1 )

GACATTGTGATGTCCCAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCA  
GAGCCTTTTATATAGTAACAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCACCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
TTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCACTCACGTTCCGGTGTGG  
GACCAAGCTGGAGCTGAAA

10

## 【 0 1 5 2 】

Y P 9 クローン 9 の V L アミノ酸配列 (配列番号 2 2 )

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYHQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT  
ISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLELK

## 【 0 1 5 3 】

Y P 9 クローン 1 0 の V L ヌクレオチド配列 (配列番号 2 3 )

GACATTGTGATGTCCCAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCA  
GAGCCTTTTATATAGTAACAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCACCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
TTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATATCTATCCACTCACGTTCCGGTGTGG  
GACCAAGCTGGAGCTGAAA

20

## 【 0 1 5 4 】

Y P 9 クローン 1 0 の V L アミノ酸配列 (配列番号 2 4 )

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYHQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT  
ISSVKAEDLAVYYCQQYYIYPLTFGAGTKLELK

## 【 0 1 5 5 】

Y P 9 クローン 1 の V L ヌクレオチド配列 (配列番号 2 5 )

GACATTGTGATGTCCCAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCA  
GAGCCTTTTATATAGTAACAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCACCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
TTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCACTCACGTTCCGGTGTGG  
GACCAAGCTGGAAATAAAA

30

## 【 0 1 5 6 】

Y P 9 クローン 1 の V L アミノ酸配列 (配列番号 2 6 )

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYHQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT  
ISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK

## 【 0 1 5 7 】

## 【 表 4 A 】

表4A. YP9 VH配列中のCDRの位置(Kabatによる)

40

CDR	DNA配列(配列番号19)	タンパク質配列(配列番号20)
CDR1	ヌクレオチド91~105	アミノ酸31~35
CDR2	ヌクレオチド148~204	アミノ酸50~68
CDR3	ヌクレオチド301~318	アミノ酸101~106

## 【 0 1 5 8 】

## 【表 4 B】

表4B. YP9 VH配列中のCDRの位置 (IMGTによる)

CDR	DNA配列(配列番号19)	タンパク質配列(配列番号20)
CDR1	ヌクレオチド76~99	アミノ酸26~33
CDR2	ヌクレオチド151~180	アミノ酸51~60
CDR3	ヌクレオチド295~318	アミノ酸99~106

## 【 0 1 5 9】

## 【表 4 C】

表4C. YP9 VL配列中のCDRの位置 (Kabatによる)

CDR	DNA配列 (配列番号21、23および25)	タンパク質配列 (配列番号22、24および26)
CDR1	ヌクレオチド70~120	アミノ酸24~40
CDR2	ヌクレオチド166~186	アミノ酸56~62
CDR3	ヌクレオチド283~309	アミノ酸95~103

10

## 【 0 1 6 0】

## 【表 4 D】

表4D. YP9 VL配列中のCDRの位置 (IMGTによる)

CDR	DNA配列 (配列番号21、23および25)	タンパク質配列 (配列番号22、24および26)
CDR1	ヌクレオチド79~114	アミノ酸27~38
CDR2	ヌクレオチド166~174	アミノ酸56~58
CDR3	ヌクレオチド283~309	アミノ酸95~103

20

## 【 0 1 6 1】

YP6抗体のVLドメインのシーケンシングは、YP6 VLのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が、YP8 VLのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列(それぞれ、配列番号17および配列番号18)と同一であることを決定した。YP6抗体のVHドメインのシーケンシングは、クローン4およびクローン7と呼ばれる2つのクローンを同定した。YP6クローン4 VHドメイン配列は、YP8 VHドメインのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列(それぞれ、配列番号15および配列番号16)と同一である。YP6クローン7 VHドメイン配列は、クローン4配列と、H-CDR3のすぐ後の1アミノ酸残基だけ、異なる(トリプトファンからロイシンへの変化)。YP6 VHのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、本明細書において配列番号36および配列番号37として示す(図5および図6も参照のこと)。

30

## 【 0 1 6 2】

図6および図8に示されているように、各抗体のCDR配列は非常に類似している。したがって、VLおよびVHのCDRのコンセンサス配列(IMGTおよびKabatの両方)が決定された。

40

HCDR1 (IMGT):

GFX<sub>1</sub>FX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>NA、ここで、X<sub>1</sub>=TまたはN、X<sub>2</sub>=KまたはN、そしてX<sub>3</sub>=TまたはK(配列番号38)

HCDR2 (IMGT):

XRNKTNNYAT、ここで、X=IまたはV(配列番号39)

HCDR3 (IMGT):

VXGNSFAY、ここで、X=AまたはG(配列番号40)

HCDR1 (Kabat):

50

XNAMN、ここで、X=TまたはK (配列番号41)

HCDR2 (Kabat):

RX<sub>1</sub>RNKTNNYATYYADSVKX<sub>2</sub>、ここで、X<sub>1</sub>=IまたはV、そしてX<sub>2</sub>=DまたはA (配列番号42)

HCDR3 (Kabat):

GNSFAY (配列番号43)

LCDR1 (IMGT):

QSLLYSNNQKNY (配列番号44)

10

LCDR2 (IMGT):

WAS (配列番号14の残基56~58)

LCDR3 (IMGT):

QQYYXYPLT、ここで、X=S、IまたはN (配列番号45)

LCDR1 (Kabat):

KSSQSLLYSNNQKNYLA (配列番号46)

20

LCDR2 (Kabat):

WASX<sub>1</sub>REX<sub>2</sub>、ここで、X<sub>1</sub>=TまたはS、そしてX<sub>2</sub>=SまたはY (配列番号47)

LCDR3 (Kabat):

QQYYXYPLT、ここで、X=S、IまたはN (配列番号45)

### 【0163】

細胞表面または可溶性のGPC3などのGPC3を結合する(例えば、特異的に結合する)単離されたモノクローナル抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、抗体の重鎖は、IMGTによって決定された場合の配列番号8、12、16、20、または37由来の1つまたは複数(例えば、3つ全部)のCDR配列などの配列番号8(YP7)、配列番号12(YP9.1)、配列番号16(YP8およびVP6クローン4)、配列番号37(YP6クローン7)、または配列番号20(YP9)として本明細書に示されたアミノ酸配列の少なくとも一部を含む。他の実施形態において、抗体は、Kabab方法を用いて決定された場合の配列番号8、12、16、20、または37由来の1つまたは複数(例えば、3つ全部)のCDR配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体の軽鎖は、IMGTによって決定された場合の配列番号10、14、18、22、24、または26由来の1つまたは複数(例えば、3つ全部)のCDR配列などの配列番号10(YP7)、配列番号14(YP9.1)、配列番号18(YP8およびYP6)、配列番号22(YP9、クローン9)、配列番号24(YP9、クローン10)、または配列番号26(YP9、クローン1)として本明細書に示されたアミノ酸配列の少なくとも一部を含む。他の実施形態において、抗体は、Kabab方法を用いて決定された場合の配列番号10、14、18、22、24、または26由来の1つまたは複数(例えば、3つ全部)のCDR配列を含む。

30

40

### 【0164】

いくつかの実施形態において、GPC3を結合する抗体の重鎖は、配列番号8のアミノ酸残基26~33、51~60、および99~106を含む;ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号10のアミノ酸残基27~38、56~58、および95~103を含む。他の実施形態において、重鎖は、配列番号8のアミノ酸残基31~35、50~68、および101~106を含む;ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号10の

50

アミノ酸残基 24～40、56～62、および95～103を含む。いくつかの例において、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号8と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である；および/または軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号10と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である。特定の例において、抗体の重鎖は、配列番号8を含み、および/または抗体の軽鎖は配列番号10を含む。

**【0165】**

いくつかの実施形態において、GPC3を結合する抗体の重鎖は、配列番号12のアミノ酸残基26～33、51～60、および99～106を含む；ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号14のアミノ酸残基27～38、56～58、および95～103を含む。他の実施形態において、重鎖は、配列番号12のアミノ酸残基31～35、50～68、および101～106を含む；ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号14のアミノ酸残基24～40、56～62、および95～103を含む。いくつかの例において、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号12と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である；および/または軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号14と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である。特定の例において、抗体の重鎖は、配列番号12を含み、および/または抗体の軽鎖は配列番号14を含む。

**【0166】**

いくつかの実施形態において、GPC3を結合する抗体の重鎖は、配列番号16のアミノ酸残基26～33、51～60、および99～106を含む；ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号18のアミノ酸残基27～38、56～58、および95～103を含む。他の実施形態において、重鎖は、配列番号16のアミノ酸残基31～35、50～68、および101～106を含む；ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号18のアミノ酸残基24～40、56～62、および95～103を含む。いくつかの例において、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号16と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である；および/または軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号18と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である。特定の例において、抗体の重鎖は、配列番号16もしくは配列番号37を含み、および/または抗体の軽鎖は配列番号18を含む。

**【0167】**

いくつかの実施形態において、GPC3を結合する抗体の重鎖は、配列番号20のアミノ酸残基26～33、51～60、および99～106を含む；ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号22、24、もしくは26のアミノ酸残基27～38、56～58、および95～103を含む。他の実施形態において、重鎖は、配列番号20のアミノ酸残基31～35、50～68、および101～106を含む；ならびに/またはその抗体の軽鎖は、配列番号22、24、もしくは26のアミノ酸残基24～40、56～62、および95～103を含む。いくつかの例において、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号20と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である；および/または軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号22、24、もしくは26と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一である。特定の例において、抗体の重鎖は、配列番号20を含み、および/または抗体の軽鎖は配列番号22、24、もしくは26を含む。

**【0168】**

いくつかの実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号38、配列番号39、および配列番号40を含み、抗体の軽鎖は、配列番号44、配列番号14のアミノ酸残基56～5

10

20

30

40

50

8、および配列番号45を含む。他の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号41、配列番号42、および配列番号43を含み、抗体の軽鎖は、配列番号46、配列番号47、および配列番号45を含む。

【0169】

GPC3を結合する(例えば特異的に結合する)単離されたモノクローナル抗体であって、その抗体が、配列番号8、配列番号12、配列番号16、もしくは配列番号20のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)ドメイン、および/または配列番号10、配列番号14、配列番号18、配列番号22、配列番号24、もしくは配列番号26のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)ドメインを含む、モノクローナル抗体もまた提供される。

【0170】

いくつかの実施形態において、抗体のVHドメインは配列番号8を含み、および/または抗体のVLドメインは配列番号10を含む。

【0171】

いくつかの実施形態において、抗体のVHドメインは配列番号12を含み、および/または抗体のVLドメインは配列番号14を含む。

【0172】

いくつかの実施形態において、抗体のVHドメインは配列番号16を含み、および/または抗体のVLドメインは配列番号18を含む。

【0173】

いくつかの実施形態において、抗体のVHドメインは配列番号37を含み、および/または抗体のVLドメインは配列番号18を含む。

【0174】

いくつかの実施形態において、抗体のVHドメインは配列番号20を含み、および/または抗体のVLドメインは配列番号22、24、もしくは26を含む。

【0175】

いくつかの実施形態において、GPC3を結合する(例えば特異的に結合する)モノクローナル抗体は、ヒト化抗体である。

【0176】

いくつかの実施形態において、GPC3を結合する(例えば特異的に結合する)モノクローナル抗体は、VH単ドメイン抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)'<sub>2</sub>フラグメント、単鎖可変フラグメント(scFv)、またはジスルフィド安定化可変フラグメント(dsFv)である。他の実施形態において、抗体は免疫グロブリン分子である。特定の例において、抗体はIgGである。

【0177】

いくつかの実施形態において、開示された抗体は、GPC3(可溶性または細胞表面GPC3)を、約1nMまたはそれ未満の解離定数(K<sub>d</sub>)で結合する。いくつかの実施形態において、ヒトモノクローナル抗体は、約1nM、約0.9nM、約0.8nM、約0.7nM、約0.6nM、約0.5nM、約0.4nM、約0.3nM、約0.2nM、約0.15nM、約0.1nM、約0.05nM、約0.04nM、約0.03nM、約0.02nM、または約0.01nMの結合親和性でGPC3を結合する。

【0178】

本明細書に開示された、単離されたヒトモノクローナル抗体は、蛍光標識、酵素標識、または放射性標識などで標識することができる。

【0179】

治療的有効量の開示された抗体および薬学的に許容され得るキャリアを含む組成物がさらに本明細書で提供される。

【0180】

本明細書に開示されたヒトモノクローナル抗体およびエフェクター分子を含む免疫結合体もまた提供される。エフェクター分子は、例えば、毒素または検出可能な標識であり得る。いくつかの実施形態において、免疫結合体は、本明細書に開示された抗GPC3抗体

10

20

30

40

50

のうちの1つのVHおよびVLドメイン、ならびにPE、またはPE38などのそのバリエーションなどの毒素を含む。いくつかの例において、免疫結合体は、PE38に融合した、YP7のVHおよびVL、YP8のVHおよびVL、YP9 クローン9のVHおよびVL、またはYP9.1のVHおよびVLを含む。非限定的例において、免疫結合体のアミノ酸配列は、配列番号28の残基2～597、配列番号31の残基2～597、配列番号33の残基2～597、または配列番号35の残基2～597を含む。免疫結合体の例は、下記のセクションVIにおいて、より詳細に論じられている。治療的有効量の、本明細書に開示された免疫結合体、および薬学的に許容され得るキャリアを含む組成物もまた提供されている。

#### 【0181】

開示されたモノクローナル抗体をコードする単離された核酸分子がさらに本明細書で提供されている。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列番号7、11、15、19、または36のうちの1つまたは複数のCDRをコードする部分などの配列番号7、11、15、19、または36の少なくとも一部を含む。いくつかの例において、ヒトモノクローナル抗体の重鎖は、配列番号7、11、15、19、または36のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列番号9、13、17、21、23、または25のうちの1つまたは複数のCDRをコードする部分などの配列番号9、13、17、21、23、または25の少なくとも一部を含む。いくつかの例において、ヒトモノクローナル抗体の軽鎖は、配列番号9、13、17、21、23、または25のヌクレオチド配列を含む。

#### 【0182】

いくつかの例において、単離された核酸分子は、プロモーターに作動可能に連結されている。

#### 【0183】

本明細書に開示された単離された核酸分子を含む発現ベクターもまた提供される。その核酸分子またはベクターを含む単離された宿主細胞もまた本明細書に提供される。いくつかの例において、宿主細胞は、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)などのT細胞である。

#### 【0184】

#### V. 抗体および抗体フラグメント

本明細書に開示されたモノクローナル抗体は、任意のアイソタイプであり得る。モノクローナル抗体は、例えば、IgM、またはIgG<sub>1</sub>もしくはIgG<sub>2</sub>などのIgG抗体であり得る。GPC3を特異的に結合する抗体のクラスは、周知の手順に従って、別のクラスとスイッチすることができる(例えば、IgGはIgMへスイッチすることができる)。クラススイッチングはまた、IgG<sub>1</sub>からIgG<sub>2</sub>へなど、あるIgGサブクラスから別のサブクラスへ変換するために用いることもできる。

#### 【0185】

抗体フラグメント(例えば、単ドメイン抗体(例えば、VHドメイン抗体)、Fab、F(ab')<sub>2</sub>およびFv)もまた、本開示によって包含される。これらの抗体フラグメントは、その抗原に選択的に結合する能力を保持する。これらのフラグメントとしては

(1) Fab(抗体分子の一価の抗原結合フラグメントを含み、ホール抗体をパイン酵素で消化することによって作製され、インタクトな軽鎖および一方の重鎖の一部をもたらすことができる、フラグメント)；

(2) Fab'(抗体分子のこのフラグメントは、ホール抗体をペプシンで処理した後、還元することにより得られ、インタクトな軽鎖および重鎖の一部をもたらすことができる；抗体分子1つあたり2つのFab'フラグメントが得られる)；

(3) (Fab')<sub>2</sub>(ホール抗体をペプシン酵素で処理することによって(その後の還元は行わない)得ることができる、抗体のフラグメント；F(ab')<sub>2</sub>は、2つのジスルフィド結合によって保持される2つのFab'フラグメントの二量体である)；

10

20

30

40

50

(4) F<sub>v</sub> (2本の鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝的に操作されたフラグメント) ;

(5) 単鎖抗体 (例えば、s c F<sub>v</sub>) (遺伝的に融合された一本鎖分子として、好適なポリペプチドリンカーによって連結された軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含む、遺伝的に操作された分子) ;

(6) 単鎖抗体の二量体 (s c F<sub>v</sub>)<sub>2</sub> (s c F<sub>v</sub>の二量体として定義される) (「ミニ抗体」としても公知) ; および

(7) V<sub>H</sub>単一ドメイン抗体 (重鎖可変ドメインからなる抗体フラグメント) が挙げられる。

#### 【0186】

これらのフラグメントを作製する方法は、当該分野で公知である (例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照のこと)。

#### 【0187】

いくつかの場合には、抗体フラグメントは、抗体のタンパク分解性加水分解によって、またはそのフラグメントをコードするDNAの宿主細胞 (例えば、大腸菌) 内での発現によって、調製され得る。抗体フラグメントは、従来の方法によるホール抗体のペプシン消化またはバイン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントは、ペプシンによる抗体の酵素的切断によって生成され、それにより、F (a b')<sub>2</sub> と表される5 Sフラグメントがもたらされ得る。このフラグメントは、チオール還元剤、および必要に応じて、ジスルフィド結合の切断から生じるスルフヒドリル基に対するブロック基を用いてさらに切断され、それにより、3 . 5 S F a b' 一価フラグメントがもたらされ得る。あるいは、ペプシンを用いた酵素的切断は、2つの一価F a b' フラグメントおよびF cフラグメントを直接生成する (米国特許第4, 036, 945号および米国特許第4, 331, 647号を参照のこと)。

#### 【0188】

それらのフラグメントが、インタクトな抗体によって認識される抗原に結合する限り、抗体を切断する他の方法 (例えば、一価の軽鎖 - 重鎖フラグメントを形成する重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素的、化学的もしくは遺伝的手法) も使用してよい。

#### 【0189】

当業者は、抗体の保存的バリエーションが作製され得ることを了解する。d s F<sub>v</sub>フラグメントまたはs c F<sub>v</sub>フラグメントなどの抗体フラグメントにおいて使用されるそのような保存的バリエーションは、正しいフォールディングおよびV<sub>H</sub>領域とV<sub>L</sub>領域との間の安定化のために必要とされる不可欠なアミノ酸残基を保持し、その分子の低pIおよび低毒性を保つために残基の電荷特性を保持する。収量を高めるために、アミノ酸置換 (例えば、多くとも1つ、多くとも2つ、多くとも3つ、多くとも4つ、または多くとも5つのアミノ酸置換) が、V<sub>H</sub>領域および/またはV<sub>L</sub>領域において行われ得る。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換表は、当業者に周知である。以下の6つの群が、互いに保存的置換であると考えられるアミノ酸の例である :

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T) ;
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) ;
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q) ;
- 4) アルギニン (R)、リジン (K) ;
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) ; および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

#### 【0190】

V I . 免疫結合体

G P C 3 に特異的な開示されるモノクローナル抗体は、治療薬またはエフェクター分子

10

20

30

40

50

に結合体化され得る。免疫結合体としては、抗体への治療薬の共有結合が存在する分子が挙げられるが、これらに限定されない。治療薬は、特定の標的分子または標的分子を有する細胞に向けられた特定の生物学的活性を有する薬剤である。当業者は、治療薬が、様々な薬物（例えば、ピンプラスチン、ダウノマイシンなど）、細胞毒（例えば、天然のまたは改変された *Pseudomonas* 外毒素またはジフテリア毒素）、それ自体が薬理的組成物を含む被包剤（例えば、リポソーム）、放射性物質（例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ および $^{35}\text{S}$ ）ならびに他の標識、標的部分およびリガンドを含み得ることを認識する。

#### 【0191】

特定の治療薬の選択は、特定の標的分子または標的細胞、および所望の生物学的作用に依存する。したがって、例えば、その治療薬は、特定の標的細胞（例えば、腫瘍細胞）の死をもたらすために使用される細胞毒であり得る。逆に、非致死性の生物学的応答の惹起が望まれる場合、その治療薬は、非致死性の薬理的物質、または非致死性の薬理的物質を含むリポソームに結合体化され得る。

10

#### 【0192】

本明細書に記載された治療薬および抗体に関して、当業者は、配列が異なるが、同じエフェクター部分または抗体配列をコードする核酸などの機能的に等価の核酸を含有する様々なクローンを容易に構築することができる。したがって、本開示は、抗体ならびにその結合体および融合タンパク質をコードする核酸を提供する。

#### 【0193】

エフェクター分子は、当業者に公知の任意の数の手段を用いて、目的の抗体に連結され得る。共有結合性の結合手段と非共有結合性の結合手段の両方を使用してよい。エフェクター分子を抗体に結合させるための手順は、エフェクターの化学構造に応じて変化する。ポリペプチドは、代表的には、抗体上の好適な官能基との反応のために利用可能な種々の官能基；例えば、カルボン酸（ $\text{COOH}$ ）、遊離アミン（ $-\text{NH}_2$ ）またはスルフヒドリル（ $-\text{SH}$ ）基を含み、それにより、エフェクター分子の結合がもたらされる。あるいは、抗体は、さらなる反応性の官能基を露出するためにまたは結合するために誘導体化される。その誘導体化は、いくつかの公知のリンカー分子のうちのいずれかの結合を含み得る。そのリンカーは、抗体をエフェクター分子に接続するために使用される任意の分子であり得る。そのリンカーは、抗体とエフェクター分子の両方と共有結合を形成することができる。好適なリンカーは、当業者に周知であり、それらとしては、直鎖もしくは分枝鎖の炭素リンカー、複素環式炭素リンカーまたはペプチドリリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。抗体およびエフェクター分子がポリペプチドである場合、リンカーは、その側基を介して（例えば、システインとのジスルフィド結合を介して）、構成要素であるアミノ酸に、または末端のアミノ酸のアルファ炭素アミノ基およびカルボキシル基に、接続され得る。

20

30

#### 【0194】

いくつかの状況では、免疫結合体はその標的部位に達したときに、エフェクター分子が抗体から取り除かれることが望ましい。それゆえ、これらの状況では、免疫結合体は、標的部位の近傍で切断可能な結合を含む。抗体からエフェクター分子を放出するリンカーの切断は、酵素活性、または免疫結合体が標的細胞内もしくは標的部位の近傍において供される条件によって促され得る。

40

#### 【0195】

種々の放射性診断化合物、放射性治療化合物、標識（例えば、酵素または蛍光分子）薬物、毒素および他の物質を抗体に結合させることについて報告されている多数の方法に照らして、当業者は、所与の物質を抗体または他のポリペプチドに結合させるために適した方法を決定することができる。

#### 【0196】

本明細書中に開示される抗体または抗体フラグメントは、誘導体化され得るか、または別の分子（例えば、別のペプチドまたはタンパク質）に連結され得る。一般に、それらの

50

抗体またはその一部は、標的抗原への結合が誘導体化または標識によって悪影響を受けないように、誘導体化される。例えば、その抗体は、1つ以上の他の分子実体（例えば、別の抗体（例えば、二重特異性抗体またはダイアボディ）、検出物質、医薬品、および/またはその抗体もしくは抗体部分と別の分子（例えば、ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグ）との会合を媒介し得るタンパク質もしくはペプチドに機能的に連結され得る（化学的結合、遺伝的融合、非共有結合性会合またはその他によって）。

【0197】

誘導体化抗体の1タイプは、2つ以上の抗体（二重特異性抗体を作製するような、同じタイプまたは異なるタイプの抗体）を架橋することによって作製される。好適な架橋剤としては、適切なスペーサーによって分離された2つの識別可能で反応性の基を有するヘテロ二官能性である架橋剤（例えば、*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、またはホモ二官能性である架橋剤（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）が挙げられる。そのようなリンカーは、市販される。

10

【0198】

GPC3に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体は、検出可能な部分で標識され得る。有用な検出物質としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル（naphthalenesulfonyl）クロリド、フィコエリトリン、ランタニド燐光体などをはじめとした蛍光性の化合物が挙げられる。ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）などの生物発光マーカもまた有用である。抗体は、検出に有用な酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなど）でも標識され得る。抗体が検出可能な酵素で標識されるとき、識別され得る反応産物を産生するためにその酵素が使用する追加の試薬を加えることによってその抗体は検出され得る。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼという物質が存在するとき、過酸化水素およびジアミノベンジジンを加えることにより、視覚的に検出可能な有色の反応産物がもたらされる。抗体は、ビオチンでも標識され得、そしてそれは、アビジンまたはストレプトアビジンの結合を間接的に測定することによって検出され得る。アビジン自体が、酵素または蛍光標識で標識され得ることに注意すべきである。

20

【0199】

抗体は、ガドリニウムなどの磁性物質で標識され得る。抗体は、ランタニド（例えば、ユウロピウムおよびジスプロシウム）およびマンガンでも標識され得る。超常磁性酸化鉄などの常磁性粒子もまた、標識として有用である。抗体は、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）でも標識され得る。いくつかの実施形態において、標識は、潜在的な立体障害を減少させるために様々な長さのスペーサーアームによって結合される。

30

【0200】

抗体は、放射標識されたアミノ酸でも標識され得る。その放射標識は、診断目的と治療目的の両方のために使用され得る。例えば、その放射標識は、X線、発光スペクトルまたは他の診断法によって、GPC3を検出するために使用され得る。ポリペプチドに対する標識の例としては、以下の放射性同位体または放射性ヌクレオチド： $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0201】

また、抗体は、化学基（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、メチル基もしくはエチル基または炭水化物基）を用いて誘導体化され得る。これらの基は、その抗体の生物学的特徴を改善するため（例えば、血清半減期を延長するため、または組織結合性を高めるため）に有用であり得る。

【0202】

50

毒素を本明細書に記載されたモノクローナル抗体と共に用いて、免疫毒素を作製することができる。例示的な毒素としては、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、およびそれらのサブユニット、ならびに、ボツリヌス毒素A型～F型が挙げられる。これらの毒素は、商業的供給源（例えば、Sigma Chemical Company、St. Louis、MO）から容易に入手することができる。企図される毒素としてはまた、本明細書に記載された毒素のバリエーションも挙げられる（例えば、米国特許第5,079,163号および第4,689,401号参照）。1つの実施形態において、毒素は、Pseudomonas外毒素（PE）である（米国特許第5,602,095号）。本明細書で用いられる場合、「Pseudomonas外毒素」は、完全長の天然（天然に存在する）PE、または改変されているPEを指す。そのような改変としては、ドメインIaの除去、ドメインIb、II、およびIIIの様々なアミノ酸欠失、単一アミノ酸置換、ならびにカルボキシル末端における1つまたは複数の配列の付加が挙げられ得るが、それらに限定されない（例えば、Siegalら、J. Biol. Chem. 264:14256～14261、1989参照）。

10

## 【0203】

本明細書に記載されたモノクローナル抗体と共に用いられるPEとしては、天然配列、天然配列の細胞傷害性フラグメント、ならびに天然PEおよびその細胞傷害性フラグメントの保存的に改変されたバリエーションが挙げられ得る。PEの細胞傷害性フラグメントとしては、標的細胞におけるその後のタンパク質分解性または他のプロセッシングが有るかまたは無い、細胞傷害性であるものが挙げられる。PEの細胞傷害性フラグメントとしては、PE40、PE38、およびPE35が挙げられる。PEおよびそのバリエーションの追加の説明について、例えば、米国特許第4,892,827号；第5,512,658号；第5,602,095号；第5,608,039号；第5,821,238号；および第5,854,044号；PCT公開第WO 99/51643号；Païら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 88:3358-3362、1991；Kondoら、J. Biol. Chem. 263:9470-9475、1988；Pastanら、Biochim. Biophys. Acta 1333:C1-C6、1997を参照されたい。

20

## 【0204】

完全長PE配列は配列番号29として本明細書に示されている：

30

```

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPAIADTNGQGVLYHYSMVLEGGNDALKLAI
DNALSITSDGLTIRLEGGVE
PNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIVKVIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNE
MQPTLAI SHAGVSVVMAQTQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCLDDTWEQKIYRVLAGNPAKHDLDIK
PTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPG
SGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAANADVSLTCPVAAGCAGPADSGDALLERNYPTGAEF
LGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSVFVGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYG
YAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPL
AERTVVIIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIIPDKEQAI SALPDYASQPGKPPREDLK

```

## 【0205】

いくつかの例において、PEは、以下のアミノ酸配列を含むPE38である：

40

```

GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQ
PEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEF LGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQ
LEERGYVFGYHGTFLAAQSVFVGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSL
PGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIIP
DKEQAI SALPDYASQPGKPPREDLK(配列番号1)

```

## 【0206】

非限定的に、PE-LR、PE-6X、PE-8X、PE-LR/6X、およびPE-LR/8Xなどの、プロテアーゼ抵抗性PEバリエーションおよび免疫原性が低下したPEバリエーションもまた本明細書で企図される（例えば、Weldonら、Blood 113(16):3792-3800、2009；Ondaら、Proc Natl Acad

50

Sci USA 105(32):11311-11316、2008; ならびに PCT 公開第 WO 2007/016150 号、同第 WO 2009/032954 号、および同第 WO 2011/032022 号参照(それらは、参照により本明細書に組み入れられている)。

【0207】

いくつかの例において、PE は、以下のアミノ酸配列を有する PE-LR (Weldonら、Blood 113(16):3792-3800、2009; PCT 公開第 WO 2009/032954 号) などのリソソーム分解に抵抗性であるバリエーションである:  
RHRQPRGWEQLPTGAEFLDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEEGYVFGYHGTFLCAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVI PSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK(配列番号 2)

10

【0208】

他の例において、PE は、以下のアミノ酸配列を有する PE-LR/6X (PCT 公開第 WO 2011/032022 号) と名付けられたバリエーションである:  
RHRQPRGWEQLPTGAEFLDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEEGYVFGYHGTFLCAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWAGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAAAGIRNGALLRVYVPRSSLPGFYATSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEESGGRLETILGWPLAERTVVI PSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDSEQAISALPDYASQPGKPPREDLK(配列番号 3)

【0209】

他の例において、PE バリエーションは、以下の配列を有する PE などの免疫原性が低下した PE である:

20

RHRQPRGWEQLPTGAEFLDGGXVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEEXGYVFGYHGTFLCAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWXGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAXGIRNGALLRVYVPRSSLPGFYXTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEXGGRLETILGWPLAERTVVI PSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDXEXAISALPDYASQPGKPPREDLK(X=G、A または S; 配列番号 4)

【0210】

他の例において、PE は、以下のアミノ酸配列を有する PE-LR/8M (PCT 公開特許第 WO 2011/032022 号) と名付けられたバリエーションである:  
RHRQPRGWEQLPTGAEFLDGGAVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEEGYVFGYHGTFLCAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWAGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAAAGIRNGALLRVYVPRSSLPGFYATSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEESGGRLETILGWPLAERTVVI PSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDSEAAISALPDYASQPGKPPREDLK(配列番号 5)

30

【0211】

PE の置換は、配列番号 29 として本明細書に示された完全長 PE のアミノ酸配列を参照して本明細書に定義される。PE の置換は、特定の位置に存在するアミノ酸残基、続いて、その残基がその特定の置換において取って代わられているアミノ酸という表示により本明細書に記載される。このことにおいて、PE の特定の実施形態のアミノ酸配列の位置は、その特定の実施形態のアミノ酸配列の位置として、または配列番号 29 によって定義された場合の位置として、本明細書で言及される。したがって、置換は、それぞれのアミノ酸配列における実際の位置が異なる場合があるという理解を以て、配列番号 29 の 613 アミノ酸配列の示された位置に対応する PE の特定の実施形態のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の置き換えを指す。2 つまたはそれより多くの位置における複数の置換の場合、その 2 つまたはそれより多くの置換は同じ場合もあるし、異なる場合もある - 置換されることになっているその 2 つまたはそれより多くのアミノ酸残基の各アミノ酸残基は、明確に他に指示がない限り、同じかまたは異なるアミノ酸残基で置換することができる。

40

【0212】

PE の改変は、PE の細胞傷害性フラグメントを含む、任意の以前に記載されたバリエーション(例えば、PE38、PE-LR、および PE-LR/8M) において存在してもよ

50

い。改変されたPEは、PEの1つまたは複数のT細胞エピトープおよび/またはB細胞エピトープ内の1つまたは複数のアミノ酸残基について、上記のような任意の置換(複数可)を含んでもよい。

#### 【0213】

本明細書に記載された抗体は、表面上にGPC3を発現する細胞へ、いくつでも異なる診断用または治療用化合物を標的化するためにも用いることができる。したがって、本開示の抗体は、細胞表面GPC3を発現する細胞に直接送達されるべきである薬物に直接的に、またはリンカーを介して、付着することができる。これは、治療、診断、または研究を目的として行うことができる。治療薬としては、核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸または誘導體、糖タンパク質、放射性同位体、脂質、炭水化物、または組換えウイルスのような化合物が挙げられる。核酸治療用および診断用の部分としては、アンチセンス核酸、一本鎖または二重鎖DNAとの共有結合性架橋のための誘導體化オリゴヌクレオチド、および三重鎖形成オリゴヌクレオチドが挙げられる。

10

#### 【0214】

あるいは、抗GPC3抗体に連結された分子は、好ましくは循環系への直接的曝露から防御される薬物、核酸(例えば、アンチセンス核酸)、または別の治療用部分などの治療用組成物を含有するリポソームまたはミセルなどの封入系であり得る。抗体に付着したりリポソームを調製する手段は、当業者に周知である(例えば、米国特許第4,957,735号; Connorら、Pharm. Ther. 28:341-365、1985参照)。

20

#### 【0215】

また、本明細書中に記載される抗体は、検出可能な標識に共有結合的または非共有結合的に連結され得る。そのように使用するのに適した検出可能な標識としては、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的な手段によって検出可能な任意の組成物が挙げられる。有用な標識としては、磁気ビーズ、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など)、放射標識(例えば、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>Cまたは<sup>32</sup>P)、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAにおいて通常使用されるその他のもの)および比色標識(例えば、コロイド金または色ガラス)、またはプラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)のビーズが挙げられる。

30

#### 【0216】

そのような標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、放射標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを用いて検出され、蛍光マーカは、光検出器を用いて検出されることにより、放射された照度が検出され得る。酵素標識は、代表的には、その酵素に基質を提供し、その基質に対する酵素の作用によって産生された反応産物を検出することによって検出され、比色標識は、単純に有色の標識を可視化することによって検出される。

#### 【0217】

##### VII. 組成物および使用方法

40

キャリア中にGPC3に結合する(例えば、特異的に結合する)開示される抗体のうちの1つまたは複数を含む組成物が提供される。免疫結合体または免疫毒素を含む組成物も提供される。それらの組成物は、被験体に投与するための単位剤形で調製され得る。投与の量およびタイミングは、所望の結果を達成するために、処置している臨床医の判断による。その抗体は、全身性投与または局所(例えば、腫瘍内)投与のために製剤化され得る。1つの例において、抗体は、静脈内投与などの非経口投与のために製剤化される。

#### 【0218】

投与するための組成物は、水性キャリアなどの薬学的に許容され得るキャリアに溶解された抗体の溶液を含み得る。種々の水性キャリア、例えば、緩衝食塩水などが使用され得る。これらの溶液は、滅菌されており、通常、望ましくない物質を含まない。これらの組

50

成物は、従来の周知の滅菌法によって滅菌され得る。それらの組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容され得る補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含み得る。これらの製剤における抗体の濃度は、広く変動し得、選択される特定の投与様式および被験体の要望に従って、主に液量、粘度、体重などに基づいて選択され得る。

【0219】

静脈内投与用の代表的な薬学的組成物は、1日あたり被験体1人あたり約0.1~10mgの抗体を含む。特に、その薬剤が隔離された部位に投与される場合、および循環系またはリンパ系（例えば、体腔または器官の管腔）に投与されない場合、1日あたり被験体1人あたり0.1から約100mgまでの投薬量が使用され得る。投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者に公知であるかまたは明らかであり、Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995)のような刊行物に詳細に記載されている。

【0220】

抗体は、凍結乾燥された形態で提供され得、投与前に滅菌水で再水和され得るが、それらは、既知濃度の滅菌された溶液としても提供される。次いで、その抗体溶液は、0.9%塩化ナトリウム、USPを含む輸液バッグに加えられ、そしていくつかの場合には、0.5~15mg/kg体重の投与量で投与される。1997年のRITUXAN（登録商標）の承認以来、米国で販売されている抗体薬の投与について当該分野においてかなりの経験が入手可能である。抗体は、静脈内プッシュまたはボラスではなく緩徐な注入によって投与され得る。1つの例において、より多い負荷用量が投与され、続いて、低レベルの維持用量が投与される。例えば、4mg/kgという最初の負荷用量が、およそ90分間にわたって注入された後、先の用量が十分に許容されていた場合、4~8週間にわたって1週間に1回、2mg/kgという維持用量が、30分間にわたって注入され得る。

【0221】

制御放出の非経口製剤が、埋没物、油性注射剤または微粒子系として作製され得る。タンパク質送達系の概観については、Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995)を参照のこと。微粒子系としては、ミクロスフェア、微小粒子、マイクロカプセル、ナノカプセル、ナノスフェアおよびナノ粒子が挙げられる。マイクロカプセルは、細胞毒または薬物などの治療用タンパク質を中央のコアとして含む。ミクロスフェアでは、治療薬は、粒子全体に分散されている。約1μmより小さい粒子、ミクロスフェアおよびマイクロカプセルは、一般にそれぞれナノ粒子、ナノスフェアおよびナノカプセルと称される。毛細血管は、およそ5μmの直径を有するので、ナノ粒子だけが静脈内に投与される。微小粒子は、代表的には、直径がおよそ100μmであり、皮下または筋肉内に投与される。例えば、Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 219-342 (1994); および Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 315-339, (1992)を参照のこと。

【0222】

本明細書中に開示される抗体組成物のイオン制御放出のために、ポリマーが使用され得る。制御された薬物送達において使用するための様々な分解可能および分解不可能な重合体マトリックスが当該分野で公知である(Langer, Accounts Chem. Res. 26: 537-542, 1993)。例えば、ブロック共重合体であるポロキサ

マー (polaxamer) 407 は、低温では粘稠性であるが流動性の液体として存在するが、体温では半固体のゲルを形成する。それは、組換えインターロイキン - 2 およびウレアーゼの製剤化および持続性送達にとって有効なビヒクルであると示されている (Johnstonら、Pharm. Res. 9: 425 - 434, 1992; および Pecら、J. Parent. Sci. Tech. 44 (2): 58 - 65, 1990)。あるいは、ヒドロキシアパタイトは、タンパク質の制御放出のためのマイクロキャリアとして使用されている (Ijntemaら、Int. J. Pharm. 112: 215 - 224, 1994)。さらに別の態様では、リポソームは、脂質のカプセルに入っている薬物の制御放出ならびに薬物標的化のために使用される (Betageriら、Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993))。治療用タンパク質の制御された送達のためのさらなる系が数多く知られている (米国特許第 5, 055, 303 号; 米国特許第 5, 188, 837 号; 米国特許第 4, 235, 871 号; 米国特許第 4, 501, 728 号; 米国特許第 4, 837, 028 号; 米国特許第 4, 957, 735 号; 米国特許第 5, 019, 369 号; 米国特許第 5, 055, 303 号; 米国特許第 5, 514, 670 号; 米国特許第 5, 413, 797 号; 米国特許第 5, 268, 164 号; 米国特許第 5, 004, 697 号; 米国特許第 4, 902, 505 号; 米国特許第 5, 506, 206 号; 米国特許第 5, 271, 961 号; 米国特許第 5, 254, 342 号および米国特許第 5, 534, 496 号を参照のこと)。

10

## 【0223】

20

## A. 治療方法

本明細書に開示された抗体、組成物、および免疫結合体は、HCC、メラノーマ、卵巣明細胞がん腫、または肺腫瘍細胞の扁平上皮がん腫などの腫瘍細胞の成長を遅らせるかもしくは阻害するために、または腫瘍細胞の転移を阻害するために投与することができる。これらの適用において、治療的有効量の抗体が、がん細胞の成長、複製、もしくは転移を阻害するのに、またはがんの徴候もしくは症状を阻害するのに十分な量で被験体に投与される。好適な被験体としては、非限定的にHCC、メラノーマ、卵巣明細胞がん腫、または肺の扁平上皮がん腫などの、GPC3を発現するがんと診断された被験体が挙げられる。

## 【0224】

30

一つの非限定的実施形態において、GPC3を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、本明細書に開示された抗体、組成物、または免疫結合体とその被験体に投与する工程により、がんを有する被験体を処置する方法が本明細書に提供される。

## 【0225】

GPC3を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、本明細書に開示された抗体、組成物、または免疫結合体とその被験体に投与する工程により、腫瘍の成長または転移を阻害する方法もまた本明細書に提供される。

## 【0226】

治療的有効量のヒトGPC3特異的抗体または免疫結合体は、疾患の重症度および患者の健康の一般的な状態に依存する。抗体の治療的有効量は、症状(複数可)の自覚的軽減かまたは臨床医もしくは他の有資格オブザーバーによって認められるような客観的に同定可能な改善のいずれかを提供する量である。

40

## 【0227】

本明細書に開示された抗体および免疫結合体の投与はまた、他の抗がん剤または治療的処置(例えば、腫瘍の外科的切除)の投与を伴うことができる。任意の好適な抗がん剤は、本明細書に開示された抗体、組成物、および免疫結合体と組み合わせて投与することができる。例示的な抗がん剤としては、例えば有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、インターカレート抗生物質、成長因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生存剤、生物学的応答調節物質、抗ホルモン(例えば、抗アンドロゲン)、

50

および抗血管新生剤などの化学療法因子が挙げられるが、それらに限定されない。他の抗がん処置としては、放射線治療、およびがん細胞を特異的に標的にする他の抗体が挙げられる。

【0228】

アルキル化剤の非限定的例としては、ナイトロジェンマスタード（例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、ウラシルマスタード、またはクロラムブシル）、スルホン酸アルキル（例えば、ブスルファン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、またはダカルバジン）が挙げられる。

【0229】

代謝拮抗剤の非限定的例としては、葉酸類似体（例えば、メトトレキサート）、ピリミジン類似体（例えば、5-FUまたはシタラビン）、およびプリン類似体、例えば、メルカプトプリンまたはチオグアニンが挙げられる。

【0230】

天然産物の非限定的例としては、ピンカアルカロイド（例えば、ピンブラスチン、ピンクリスチン、またはビンデシン）、エピポドフィロトキシン（例えば、エトポシドまたはテニポシド）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン、またはマイトマイシンC）、および酵素（例えば、L-アスパラギナーゼ）が挙げられる。

【0231】

種々の作用物質の非限定的例としては、白金配位錯体（例えば、シスプラチンとしても知られているシス-ジアミン-ジクロロ白金II）、置換尿素（例えば、ヒドロキシウレア）、メチルヒドラジン誘導体（例えば、プロカルバジン）、および副腎皮質（adrenocortical）抑制剤（例えば、ミトタンおよびアミノグルテチミド）が挙げられる。

【0232】

ホルモンおよびアンタゴニストの非限定的例としては、副腎皮質ステロイド（例えば、プレドニゾン）、プロゲステロン（例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、および酢酸メゲストロール（mestrol acetate））、エストロゲン（例えば、ジエチルスチルベストールおよびエチニルエストラジオール）、抗エストロゲン剤（例えば、タモキシフェン）、およびアンドロゲン（例えば、プロピオン酸テストステロン（testosterone propionate）およびフルオキシメステロン）が挙げられる。最も一般的に用いられる化学療法薬の例としては、アドリアマイシン、アルケラン、Ara-C、BicNU、ブスルファン、CCNU、カルボプラチナム、シスプラチナム、シトキサン、ダウノルピシン、DTIC、5-FU、フルダラビン、ハイドレア、イダルピシン、イホスファミド、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、タキソール（またはドセタキセルなどの他のタキサン）、ベルバン、ピンクリスチン、VP-16が挙げられるが、いくつかのより新しい薬物としては、ゲムシタピン（ジェムザール）、ハーセプチン、イリノテカン（カンプトサル、CPT-11）、ロイスタチン、ナベルピン、リツキサンSTI-571、タキソテル、トポテカン（ハイカムチン）、ゼローダ（カペシタピン）、ゼベリン、およびカルシトリオールが挙げられる。

【0233】

用いることができる免疫調節物質の非限定的例としては、AS-101（Wyeth-Ayerst Labs.）、プロピリミン（Upjohn）、 $\alpha$ -インターフェロン（Genentech）、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；Genetics Institute）、IL-2（CetusまたはHoffman-La Roche）、ヒト免疫グロブリン（Cutter Biological）、IMREG（New Orleans, La.のImregより）、SK&F 106528、およびTNF（腫瘍壊死因子；Genentech）が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0234】

いくつかの型のがんについての別の一般的な処置は、外科的処置、例えば、がんまたはその一部の外科的切除である。処置の別の例は、放射線療法、例えば、外科的切除の前に腫瘍を根絶させるかまたはそれを縮小させるのを助けるための腫瘍部位への放射性物質またはエネルギー（例えば、外部ビーム療法）の投与である。

## 【0235】

## B. 診断方法および検出方法

GPC3の発現をインビトロまたはインビボで検出するための方法が本明細書中に提供される。いくつかの場合には、GPC3発現は、生物学的サンプルにおいて検出される。そのサンプルは、任意のサンプルであり得、それらとしては、バイオプシー、オートプシーおよび病理検体由来の組織が挙げられるがこれらに限定されない。生物学的サンプルには、組織の切片、例えば、組織学的目的のために採取された凍結切片も含まれる。生物学的サンプルには、さらに、血液、血清、血漿、痰、髄液または尿などの体液が含まれる。生物学的サンプルは、代表的には、哺乳動物、例えばヒトまたは非ヒト霊長類から得られる。

10

## 【0236】

1つの実施形態において、被験体由来の試料を、本明細書に開示されたモノクローナル抗体に接触させる工程、およびその抗体のその試料への結合を検出する工程により、被験体がんを有するかどうかを決定する方法が提供される。抗体の対照試料への結合と比較して、抗体の試料への結合が増加していることにより、被験体がんを有すると同定される。

20

## 【0237】

別の実施形態において、がんを診断された被験体由来の試料を、本明細書に開示されたモノクローナル抗体に接触させる工程、およびその抗体のその試料への結合を検出する工程により、被験体におけるがんの診断を確認する方法が提供される。抗体の対照試料への結合と比較して、抗体の試料への結合が増加していることにより、被験体におけるがんの診断が確認される。

## 【0238】

開示された方法のいくつかの例において、モノクローナル抗体は直接的に標識されている。

30

## 【0239】

いくつかの例において、方法は、そのモノクローナル抗体を特異的に結合する二次抗体を試料に接触させる工程、および二次抗体の結合を検出する工程をさらに含む。二次抗体の対照試料への結合と比較して、二次抗体の試料への結合が増加していることにより、被験体におけるがんが検出されるか、または被験体におけるがんの診断が確認される。

## 【0240】

いくつかの例において、がんは、HCC、メラノーマ、卵巣明細胞がん腫、もしくは肺の扁平上皮がん腫、またはGPC3を発現する任意の他の型のがんである。

## 【0241】

いくつかの例において、対照試料は、がんを有しない被験体由来の試料である。特定の例において、試料は血液または組織試料である。

40

## 【0242】

いくつかの場合には、GPC3に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体は、検出可能な標識で直接標識される。別の実施形態において、GPC3に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体（一次抗体）は、標識されず、GPC3に特異的に結合する抗体に結合し得る二次抗体または他の分子が、標識される。当業者に周知であるように、特定の種およびクラスの一次抗体に特異的に結合することができる二次抗体が選択される。例えば、一次抗体が、ヒトIgGである場合、二次抗体は、抗ヒトIgGであり得る。抗体に結合し得る他の分子としては、プロテインAおよびプロテインG（この両方ともが商業的に入手可能である）が挙げられるがこれらに限定されない。

50

## 【0243】

上記抗体または二次抗体に適した標識は、上に記載されており、それらとしては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、磁性物質および放射性材料が挙げられる。好適な酵素の非限定的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な補欠分子族複合体の非限定的な例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる。好適な蛍光材料の非限定的な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる。非限定的かつ例示的な発光材料は、ルミノールであり；非限定的かつ例示的な磁性物質は、ガドリニウムであり、非限定的かつ例示的な放射性標識としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

10

## 【0244】

代替の実施形態において、GPC3は、検出可能な物質で標識されたGPC3標準物質およびGPC3に特異的に結合する標識されていない抗体を利用する競合イムノアッセイによって、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このアッセイでは、生物学的サンプル、標識されたGPC3標準物質およびGPC3に特異的に結合する抗体が混合され、標識されていない抗体に結合した標識されたGPC3標準物質の量が測定される。生物学的サンプル中のGPC3の量は、GPC3に特異的に結合する抗体に結合した標識されたGPC3標準物質の量に反比例する。

20

## 【0245】

本明細書中に開示されるイムノアッセイおよび方法は、いくつかの目的のために使用され得る。1つの実施形態において、GPC3に特異的に結合する抗体は、細胞培養物中の細胞内のGPC3の産生を検出するために使用され得る。別の実施形態において、その抗体は、生物学的サンプル（例えば、組織サンプルまたは血液もしくは血清サンプル）中のGPC3の量を検出するために使用され得る。いくつかの例では、GPC3は、細胞表面GPC3である。他の例では、GPC3は、可溶性GPC3である。

## 【0246】

1つの実施形態において、生物学的サンプル（例えば、血液サンプルまたは組織サンプル）中のGPC3を検出するためのキットが提供される。例えば、被験体におけるがんの診断を確認するために、組織学的検査用の組織サンプルを得るためにバイオプシーが行われ得る。あるいは、可溶性GPC3タンパク質またはフラグメントの存在を検出するために、血液サンプルを得てもよい。ポリペプチドを検出するためのキットは、代表的には、GPC3に特異的に結合するモノクローナル抗体（例えば、本明細書中に開示される抗体のいずれか）を備える。いくつかの実施形態において、抗体フラグメント（例えば、scFvフラグメント、VHドメインまたはFab）がそのキットに含まれる。さらなる実施形態において、その抗体は、標識される（例えば、蛍光標識、放射性標識または酵素標識で）。

30

## 【0247】

1つの実施形態において、キットは、GPC3に結合する抗体を使用する手段を開示している指示材料を備える。その指示材料は、書面、電子的形態（例えば、コンピュータディスクまたはコンパクトディスク）、または視覚によるもの（例えば、ビデオファイル）であり得る。そのキットは、そのキットが意図されている特定の用途を容易にする追加の構成要素も備え得る。したがって、例えば、そのキットは、標識を検出する手段（例えば、酵素標識に対する酵素基質、蛍光標識を検出するためのフィルターセット、二次抗体などの適切な二次標識など）をさらに備え得る。そのキットは、特定の方法を実施するために日常的に使用されるバッファーおよび他の試薬をさらに備え得る。そのようなキットおよび適切な内容物は、当業者に周知である。

40

## 【0248】

1つの実施形態において、診断キットは、イムノアッセイを含む。イムノアッセイの詳

50

細胞は、使用される特定の形式によって変化し得るが、生物学的サンプル中のGPC3を検出する方法は、通常、免疫学的に反応性の条件下でGPC3ポリペプチドと特異的に反応する抗体とその生物学的サンプルとを接触させる工程を包含する。その抗体は、免疫学的に反応性の条件下で特異的に結合することが可能になることで免疫複合体を形成し、その免疫複合体（結合した抗体）の存在が、直接または間接的に検出される。

#### 【0249】

細胞表面マーカーの存在または非存在を判定する方法は、当該分野で周知である。例えば、上記抗体が、他の化合物（酵素、磁気ビーズ、コロイド状の磁気ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物または薬物を含むがこれらに限定されない）に結合体化され得る。その抗体は、免疫アッセイ（例えば、ラジオ免疫アッセイ（RIA）  
10、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）または免疫組織化学的アッセイであるがこれらに限定されない）においても利用され得る。その抗体は、蛍光励起細胞分取（FACS）のためにも使用され得る。FACSは、細胞を分離するためまたは分取するために、他の洗練された検出レベル中でも複数のカラーチャンネル、小角光散乱検出チャンネルおよび鈍角光散乱検出チャンネル、ならびにインピーダンスチャンネルを使用する（米国特許第5,061,620号を参照のこと）。本明細書中に開示されるようなGPC3に結合するいずれのモノクローナル抗体も、これらのアッセイにおいて使用することができる。したがって、それらの抗体は、従来の免疫アッセイ（ELISA、RIA、FACS、組織免疫組織化学、ウェスタンブロットまたは免疫沈降を含むがこれらに限定されない）において使用され得る。  
20

#### 【0250】

##### C. 操作された細胞傷害性Tリンパ球（CTL）

開示されたモノクローナル抗体はまた、キメラ抗原受容体（CAR：キメラT細胞受容体、人工T細胞受容体、またはキメラ免疫受容体としても知られている）を発現するように操作されたCTLを産生するために用いることができる。一般的に、CARは、結合部分、細胞外ヒンジおよびスペーサーエレメント、膜貫通領域、およびシグナル伝達機能を果たす内部ドメインを含む（Cartellierら、J Biomed Biotechnol 2010：956304、2010）。多くの場合、結合部分は、scFvなどのモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントである。いくつかの異なる内部ドメインが、CARを作製するために用いられている。例えば、内部ドメインは、CD3 またはFcRIなどの免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を有するシグナル伝達鎖からなり得る。場合によっては、内部ドメインは、CD28および/またはCD137などの少なくとも1つの追加の補助刺激性ドメインの細胞内部分をさらに含む。  
30

#### 【0251】

CARを発現するCTLは、腫瘍細胞などの特定の細胞型を標的にするために用いることができる。したがって、本明細書に開示されたモノクローナル抗体は、GPC3特異的抗体の抗原結合フラグメントを含有するCARを発現するCTLを操作するために用いることができ、それにより、その操作されたCTLを、GPC3発現腫瘍細胞へ標的化することができる。操作されたT細胞は、いくつかの型のがんについての養子治療のために以前に用いられている（例えば、Parkら、Mol Ther 15（4）：825-833、2007参照）。CARを発現するCTLは、HLAに拘束されないので、CARを発現するT細胞の使用は、標準的なCTLに基づいた免疫療法より万能であり、それゆえに、その標的抗原を発現した腫瘍を有するいかなる患者についても用いることができる。  
40

#### 【0252】

したがって、scFvなどのGPC3特異的抗体結合フラグメントを含むCARが本明細書に提供される。そのCARをコードする単離された核酸分子およびベクター、ならびにその核酸分子またはベクターを含む、CTLなどの宿主細胞もまた提供される。GPC3特異的抗体結合フラグメントで構成されるCARを発現するCTLは、HCC、メラノ  
50

ーマ、卵巣明細胞がん腫、または肺の扁平上皮がん腫などのGPC3を発現するがんの処置のために用いることができる。したがって、GPC3を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、GPC3標的化CARを発現するCTLを被験体に投与する工程により、がんを有する被験体を処置する方法が本明細書に提供される。

#### 【0253】

##### D. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、2つの異なるモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントで構成される組換えタンパク質である。したがって、二重特異性抗体は、2つの異なる抗原を結合する。二重特異性抗体は、CTL（例えば、CD3などのCTL受容体構成要素）と腫瘍抗原との両方を同時に標的にすることにより、がん免疫療法のために用いることができる。本明細書に開示されたGPC3特異的モノクローナル抗体は、GPC3とCTLとの両方を標的にする二重特異性抗体を作製するために用いることができ、それにより、GPC3発現がんを処置するための手段を提供することができる。

#### 【0254】

GPC3特異的モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む二重特異性モノクローナル抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、二重特異性モノクローナル抗体は、CD3などのT細胞受容体の構成要素を特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントをさらに含む。二重特異性抗体をコードする単離された核酸分子およびベクター、ならびにその核酸分子またはベクターを含む宿主細胞もまた提供される。GPC3特異的抗体またはその抗原結合フラグメントを含む二重特異性抗体は、HCC、メラノーマ、卵巣明細胞がん腫、または肺の扁平上皮がん腫などのGPC3を発現するがんの処置のために用いることができる。したがって、GPC3を発現するがんを有する被験体を選択する工程、および治療的有効量の、GPC3標的化二重特異性抗体をその被験体に投与する工程により、がんを有する被験体を処置する方法が本明細書に提供される。

#### 【0255】

以下の実施例は、ある特定の特徴および/または実施形態を例証するために提供される。これらの実施例は、本開示を、記載された特定の特徴または実施形態に限定するものと解釈されるべきではない。

#### 【実施例】

#### 【0256】

##### (実施例1)

##### 材料および方法

この実施例は、実施例2に記載された研究についての材料および実験方法を記載する。

#### 【0257】

##### 細胞系

6つのヒトHCC細胞系(SK-Hep1、HepG2、Hep3B、Huh-1、Huh-4、およびHuh-7)および5つのヒトCCA細胞系(HuCC1、OZ、Mz-ChA-1、KMBC、およびKMCH)を、下記の研究に用いた。TOV-21G細胞系(ヒト卵巣明細胞がん腫細胞系)をAmerican Type Culture Collection(Manassas, Virginia)から入手した。A431/G1は、ヒトGPC3を安定的に発現する、トランスフェクションされたA431ヒト上皮がん腫細胞系である。Yuら(J Cancer 1:141-149, 2010)に記載されているように、それらの細胞系を培養した。

#### 【0258】

##### モノクローナル抗体作製

マウスハイブリドーマテクノロジーは、ペプチド合成、マウス免疫、マウス脾臓細胞の細胞融合、ハイブリドーマ選択および増殖、ならびにペプチドまたはタンパク質を用いる上清スクリーニングを含んだ(E. Harlow, D. Lane (1988) Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Ha

10

20

30

40

50

rbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。簡単に述べれば、50個の残基からなるペプチド(DGM I K V K N Q L R F L A E L A Y D L D V D D A P G N S Q Q A T P K D N E I S T F H N L G N V H S ; 配列番号6)を合成し(GenScript USA, Piscataway, NJ)、キャリアタンパク質である、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に、N末端に導入されるシステイン残基を介するマレイミド化学作用により結合体化した。5匹のBALB/cマウスを免疫し、続いて、2回目および3回目の免疫後、試験採血し、マウスに実施された2つの融合体は、最高抗体価(GPC3発現がん細胞において>10,000)を示した。ハイブリドーマ細胞を、フローサイトメトリーによって(下記のように)スクリーニングした。最も陽性が強い5個のクローンを、サブクローニングのために選択し、免疫グロブリン(Ig)アイソタイプを決定し、クローンをさらに増殖させた。最も高い親和性および最も特異性の高い結合を示したYP7クローンを、BALB/cマウスにおける腹水産生およびプロテインA精製を経ての精製(E. Harlow, D. Lane (1988) Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)のために選択した。

#### 【0259】

##### ハイスループットフローサイトメトリー

1  $\mu$ g/mlの各mAbを含有するマウスハイブリドーマ上清と共に細胞をインキュベートした。フィコエリトリン(PE)と結合体化されたヤギ抗マウスIgG(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いて、結合を検出した。肝臓細胞に会合した蛍光を、FACSCalibur(BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて測定した。ハイブリドーマのスクリーニングについて、A431細胞とA431/G1細胞との1:1混合物(96ウェルプレート中のウェルあたり10,000個の細胞)を、マウスハイブリドーマ上清の1:5希釈液とともにインキュベートした。PEと結合体化されたヤギ抗マウスIgG(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いて、結合を検出した。内蔵型オートサンプラーを備えたGuava EasyCyte Plus装置(Millipore, Billerica, MA)を用いて、蛍光を測定した。A431/G1およびA431についての幾何平均値を、Guava Express Pro Softwareを用いて、個々のクローンについて同時に測定した。15またはそれより高い結合比を有するクローンを、細胞会合型GPC3タンパク質に特異的であるとみなし、HepG2細胞を用いるさらなるフローサイトメトリーのために選択した。

#### 【0260】

スキャッチャードプロットおよび $K_D$ 値を、以前に記載されているように(Hoら、J Biol Chem 280:607-617, 2005)、Prism(Graph Pad Software Inc., San Diego, CA)を用いて計算した。

#### 【0261】

##### 酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)

Nunc MaxiSorp 96ウェル平底プレートを、1  $\mu$ g/mlの野生型または突然変異体GPC3(ヘパラン硫酸を含まないGPC3突然変異体であるGPC3 HS)タンパク質と共に、PBS中、4で一晩、インキュベートし、続いて、SuperBlockバッファー(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL)でブロッキングした。組換えGPC3タンパク質を作製し(Yuら、J Cancer 1:141-149, 2010)、組換えGPC1タンパク質および組換えGPC5タンパク質を購入した(R&D Systems, Minneapolis, MN)。マウス血清を、PBSTバッファー(0.05% Tween 20)中に1:5希釈し、同じプレート内で、室温で1時間、インキュベートした。結合した抗体を検出するために、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP, Invitrogen, Carlsbad, CA)と結合体化されたヤギ抗マウスIgGの1:10,000希

10

20

30

40

50

积液を加えた。アッセイを、記載されているように開発した (Hōら、J Biol Chem 280:607-617、2005)。

#### 【0262】

##### 免疫沈降およびウェスタンブロット分析

培養細胞の上清を、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の精製されたマウスハイブリドーマ抗体またはマウスモノクローナルIgG対照と4で一晚、回転させながらインキュベートした。新鮮なブロテインAビーズ (Roche, Mannheim, Germany) を、あらかじめ、2% SDSおよびプロテアーゼインヒビター (「Complete Mini-EDTA Free」プロテアーゼインヒビター錠剤、Roche, Mannheim, Germany) を含有する免疫沈降アッセイバッファーで、3回洗浄した。ビーズを、試料混合物とインキュベートし、4で2時間、回転させ、3回洗浄し、ローディングバッファーおよび免疫沈降アッセイバッファーを含有する溶液とインキュベートし、99で5分間、還元した。上清を、SDS-PAGEにより分離し、続いて、標準方法を用いてウェスタンブロットを行った (Yūら、J Cancer、1:141-149、2010)。

10

#### 【0263】

凍結かつ固定された肝臓腫瘍試料を、Cooperative Human Tissue Network (Charlottesville, VA) (Yūら、J Cancer、1:141-149、2010) から入手し、ウェスタンブロットを実施した。

#### 【0264】

##### 免疫組織化学法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を、 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ のYP7を用いて、以前に公開されたプロトコール (ManおよびTavassoli, Appl Immunohistochem 4:139-141、1996) に従って、免疫組織化学染色に供した。免疫染色を、以前に記載されているように、YP7およびアイソタイプ対照マウスIgG (Southern Biotech, Birmingham, AL) を用いて行った。免疫染色された切片は、2人の研究者により独立的に評価された。

20

#### 【0265】

##### 動物試験

National Institutes of Health (NIH) における Institutional Animal Care and Use Committee により承認されたプロトコールの下、全てのマウスを飼育し、処置した。動物試験の前にHepG2細胞系について、2ラウンドのインビボ継代を実施した。1千万個の細胞を $200\mu\text{l}$ のPBS中に懸濁し、4~6週齢の雌BALB/c nu/nuヌードマウス (NCI-Frederick, Frederick, MD) の皮下に接種した。腫瘍体積が、約 $100\text{mm}^3$  ( $V = ab^2/2$ 、式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長さおよび幅を表す) に達した時、マウスに $5\text{mg}/\text{kg}$ のYP7を週2回、2週間半、静脈注射した。

30

#### 【0266】

##### (実施例2)

##### GPC3発現細胞に高親和性で結合するモノクローナル抗体

この実施例は、GPC3の発現が低レベルであるがん細胞を検出する能力がある高親和性のGPC3特異的モノクローナル抗体の同定を記載する。

40

#### 【0267】

##### マウス免疫のための免疫原としてのペプチドの設計

免疫のためのペプチドを設計するために、3D構造が入手できないため、GPC3タンパク質の一次構造を分析した。細胞表面上の成熟GPC3タンパク質は、ヘパラン硫酸鎖によって修飾されており、GPIアンカーによって細胞膜に付着している (図1A)。GPC3遺伝子は、ヒトX染色体上 (Xq26) に位置し、転写され、4つのmRNAアイソフォームへ選択的にスプライスされる (HōおよびKim, Eur J Cancer 47:333-338、2011)。全てのアイソフォームは、同じC末端サブユニッ

50

トを共有するが、それらのN末端サブユニットはわずかに異なる。それらの分布および機能的意義は確立されていない。最も一般的なアイソフォーム（アイソフォーム2、GenBankアクセッション番号NP\_004475およびJQ943686）は、580個のアミノ酸を有する70kDaのコアタンパク質をコードする（Ho、BioDrugs 25:275-284、2011；HoおよびKim、Eur J Cancer 47:333-338、2011）。アイソフォーム1（NP\_001158089）、アイソフォーム3（NP\_001158090）、およびアイソフォーム4（NP\_001158091）と名付けられた選択的にスプライスされたフォームをコードする3つのバリエーションが、GenBankにおいて同定されている。

#### 【0268】

GPC3のC末端サブユニットは、長さが約30kDaである。big-PI Predictorを用いたタンパク質配列に基づいて、セリン560が、GPIについての切断部位と予想された（AllegrettaおよびFilmus、Anticancer Agents Med Chem 11:543-548、2011）。各アイソフォームの認識を可能にする、細胞表面GPC3のC末端に対応する50マーペプチド（残基511~560）を合成した。追加のシステイン残基を、そのペプチドのN末端に導入した。したがって、このペプチドに対して惹起されたmAbは、膜結合型GPC3のC末端を結合する。

#### 【0269】

細胞表面会合型GPC3に対するモノクローナル抗体のスクリーニング

5匹のBALB/cマウスを3回、免疫し、ペプチド-KLH結合体でブーストした。細胞表面上のGPC3の天然立体構造に対する血清抗体価を、実施例1に記載されているように、GPC3発現細胞を用いるフローサイトメトリーにより測定した。全てのマウスについての抗体価は、3回の免疫後、 $> 10,000$ であり、非染色細胞のピークと共に、血清の1:10,000希釈液における、重複していない染色細胞ピークとして観察された。脾臓細胞融合を、その2匹の最良のマウスに関して行った。

#### 【0270】

細胞表面会合型GPC3タンパク質を認識するmAbの10枚の96ウェルプレートの一次スクリーニングを実施するために、各上清試料について試験するための抗原としてGPC3陰性細胞（A431）とGPC3陽性細胞（G1、またはGPC3で安定的にトランスフェクションされたA431であるA431/G1）との混合物が用いられる、フローサイトメトリーに基づいたアッセイを開発した（図1B）。この迅速なスクリーニング方法の使用により、Guava EasyCytometer上で960個のクローンを24時間以内にスクリーニングすることが可能になった。15またはそれより高い結合比（G1/A431）をもつクローンを、HepG2細胞を用いるフローサイトメトリー分析のために選択した。12個のクローンを、限界希釈によりサブクローニングした。それらの中で、5個（YP6、YP7、YP8、YP9、およびYP9.1）を回収し、IgG1（ $1 \cdot$ ）とアイソタイプを決定した。標準ELISAにおいてそのペプチドに対して最高の結合シグナルをもつmAbは、細胞表面会合型GPC3に対して非常に弱い結合を示すかまたは全く結合しない。まとめて考えると、その新しい方法は、細胞表面GPC3に対する高い結合親和性をもつmAbを単離するのに成功した。

#### 【0271】

細胞上のGPC3 mAbの親和性および特異性

5個の選択されたmAb（YP6、YP7、YP8、YP9、およびYP9.1）を、 $1 \mu\text{g/ml}$ での4つの細胞系（A431、A431/G1、HepG2、およびHep3B）を用いて、結合について分析した。図1Cに示されているように、全部が、試験された2つのGPC3発現細胞系（A431/G1およびHep3B）に結合した。逆に、GPC3陰性A431細胞系にはどれも結合せず、それがGPC3特異性であること、および細胞表面GPC3に対する結合が1G12より一般的に高かったことを示唆した（CapurroおよびFilmus、Cancer Res 65:372、2005）。

10

20

30

40

50

その後、組換えGPC3およびGPC3 HS（ヘパラン硫酸を含まない突然変異体）タンパク質との反応性をELISAにおいて試験した。GPC3コアタンパク質単独であるGPC3 HSと比較して、野生型GPC3においてより強い結合シグナルが観察されたが、1G12は、どちらも同じように結合した（図1D）。この結果は、これらの新しいmAbが、細胞表面上のヘパラン硫酸を有する天然型のGPC3タンパク質を認識することを示唆している。

#### 【0272】

図1Eは、A431/G1細胞系において発現した組換えGPC3タンパク質とのYP7およびYP9の強い免疫反応性、およびA431細胞系溶解産物における他の細胞タンパク質とは反応しないことを示すウェスタンブロット分析を示す。これらのmAbはまた、HCC細胞系における内因性GPC3タンパク質と、様々な程度で反応した。（1G12を含む）試験されたそれらの中で、YP7は、両方のHCC細胞系（HepG2およびHep3B）におけるGPC3タンパク質との最も強い反応性を示し、それは、HCC細胞系およびCCA細胞系のパネルを用いるさらなる分析のために選択された。

#### 【0273】

図2Aに示されているように、YP7は、フローサイトメトリー分析において、全てのHCC細胞系（HepG2、Hep3B、Huh4、およびHuh7）を結合する。対照的に、YP7は、SK-Hep-1細胞系（最初、HCC細胞系と報告されたが、最近、非HCC細胞系と再定義された）と反応しなかった（Yura、J Cancer、1:141-149、2010）。図2Aはまた、YP7が、試験されたCCA系（HuCC1、KMBC、KMCH、およびMz-ChA-1）のいずれとも結合しなかったことを示している。YP7の高いnM以下の結合親和性（ $K_D = 0.3 \text{ nM}$ ）が、細胞上に発現した天然型のGPC3タンパク質に関して決定された（図4B）。特徴的な構造を共有する6個のグリピカン（GPC1~6）が、哺乳動物において同定されている（HoおよびKim、Eur J Cancer 47:333-338、2011）。YP7が他のグリピカンと交差反応性であるかどうかを評価するために、それを、ELISAによりGPC1、GPC5、およびGPC3を用いて試験した。YP7はGPC3を結合したが、GPC1もGPC5も結合しなかった（図2C）。

#### 【0274】

肝臓がん細胞に関するYP7の結合特異性を評価するために、イムノブロットングを、HCC細胞およびCCA細胞のパネルに関して実施した（図3A）。YP7は、5つのうちの5つ（100%）（HepG2、Hep3B、Huh1、Huh4、およびHuh7）のHCC細胞系において強いGPC3シグナルを示した。SK-Hep-1は、GPC3陰性であった。4つのCCA細胞系（KMCH、KMBC、Mz-ChA-1、およびOz）のいずれにおいてもGPC3タンパク質が検出されなかった。ウェスタンブロットングにおけるYP7の反応性プロファイルは、フローサイトメトリーデータ（図2A）とよく一致し、YP7が、内因性GPC3タンパク質を特異的かつ同等に検出することを示唆した。YP7は、卵巣明細胞がん腫（CCC）であるTOV-21Gにおいて発現したGPC3を検出したが、1G12は、それを明らかに検出しなかった（図3B）。その1G12の難点は以前に報告されており、TOV-21G細胞における非常に低い発現レベルのGPC3に起因しており（Suzukiら、Cancer Sci、102:1622-1629、2011）、したがって、1G12を凌ぐ、高親和性mAbの有用性を描き出している。総合すれば、これらの結果は、YP7がHCCおよび他のGPC3発現がん（例えば、卵巣CCC）における天然型のGPC3に対する優れた結合親和性および特異性をもち、かつ非常に低い発現レベルでの内因性GPC3を検出することができることを実証している。

#### 【0275】

YP7による可溶性および組織GPC3タンパク質の検出

以前の研究により、培養上清および患者血清における可溶性GPC3タンパク質の存在が示された（Capurroら、Gastroenterology 125:89-9

10

20

30

40

50

7、2003; Hippoら、Cancer Res、64:2418-2423、2004)。その診断可能性を調べるために、YP7を、培養上清および患者試料における可溶性GPC3タンパク質を用いて試験した。YP7を用いて、4つの細胞系(A431、A431/G1、HepG2、およびHep3B)由来の培養上清において可溶性タンパク質をブルダウンス、かつ探索した(図3C)。A431/G1およびHep3Bブルダウンスタンパク質において、可溶性GPC3タンパク質がスミア化バンドとして検出され、様々な数のヘパラン硫酸鎖で修飾されたGPC3タンパク質に対応する広範囲な高分子量タンパク質を示した(Capurroら、Gastroenterology 125:89-97、2003; CapurroおよびFilmus、Cancer Res 65:372、2005; Hippoら、Cancer Res、64:2418-2423、2004)。ヘパラン硫酸を有するGPC3(スミア)に加えて、30kDaバンドが、両方の培養上清において検出され、C末端サブユニット単独が、可溶性GPC3タンパク質において存在することを示した。

#### 【0276】

YP7を免疫組織化学的適用について評価するために、9つのHCCおよび9つのCCA患者組織(Yuら、J Cancer、1:141-149、2010)をウェスタンブロッティングに用いた(図3D)。高GPC3タンパク質発現が、9つのうちの4つ(44%)のHCC組織において、約70kDの予想されたサイズをもつバンドとして見出された。9つのいずれの(0%)CCA組織においてもGPC3発現は見出されなかった。

#### 【0277】

以前の研究より、卵巣明細胞がん腫、メラノーマ、および非小細胞肺腺がんなどの他のがんにおいてGPC3発現が示されたが、その発現プロファイリングは一般的に確証的ではなかった(HoおよびKim、Eur J Cancer 47:333-338、2011)。公開のマイクロアレイデータに基づいたNCI-60セットにおけるGPC3陽性細胞系の全部においてYP7を試験した(表5)。非HCCがん細胞におけるGPC3タンパク質発現は全体として一貫性があるが、非HCC細胞における細胞表面発現は、一般的に、HCC細胞のそれより低いことが決定された。YP7は、ヒトメラノーマ細胞系である、UACC-62を結合した。GPC3は、メラノーマについての可能性のある治療標的として示唆されている(Ho、BioDrugs 25:275-284、2011; HoおよびKim、Eur J Cancer 47:333-338、2011)。しかしながら、GPC3発現メラノーマについての細胞系モデルは確立されておらず、メラノーマに対するGPC3標的化抗体治療は、おそらく良い細胞モデルおよび高親和性抗GPC3 mAbの欠如のせいで、調べられていない。これらのデータは、UACC-62が、メラノーマにおいてGPC3を研究するための有用な細胞モデルであり得ること、およびYPがメラノーマ治療のための好適な抗体であることを示している。

10

20

30

【表5】

## NCI-60セット内の非HCCにおけるGPC3発現の特徴づけ

ヒト細胞系	腫瘍型	遺伝子発現(マイクロアレイ)*	タンパク質発現(イムノブロットィング) <sup>®</sup>	表面発現(フローサイトメトリー) <sup>®</sup>
NCI-H522	非小細胞肺癌	+++	+++	+/-
MALME-3M	メラノーマ	++	-	-
SK-MEL-5	メラノーマ	++	+	+/-
UACC-62	メラノーマ	++	+++	+(図2Aに示されたヒストグラム)
IGROV-1	卵巣がん	++	++	-
OVCAR-8	卵巣がん	++	+	-
NCI-ADR-RES	卵巣がん	++	+++	+/-

\*dtp. nci. nih. gov/mtwebでのオンライン; <sup>®</sup>YP7により探索された

## 【0278】

YP7のヒト肝臓組織への結合もまた、免疫組織化学法(IHC)によって調べた。図3Eに示されているように、浸潤性HCCは、GPC3の明瞭な膜または細胞質発現を示し、一方、正常細胞は、明瞭な免疫染色を欠いた(図3E)。この観察は、YP7によって染色されたGPC3が肝臓腫瘍、特にHCCのIHCについての好適なマーカーであるという信念を支持している。総合すれば、HCC細胞および組織のウェスタンブロット分析により、YP7が、細胞表面型と可溶性(脱落)型の両方における内因性GPC3タンパク質に対して特異性および感受性が非常に高いことが示されており、YP7が、血清GPC3タンパク質およびHCC組織におけるGPC3発現を評価するための診断剤として用いられ得ることを示している。

## 【0279】

## YP7の抗腫瘍活性

YP7を可能性のあるがん治療用物質として探求するために、HepG2細胞を用いてヌードマウスにおけるモデルを確立することにより、HCCマウス異種移植片において腫瘍成長阻害を調べた(図4)。腫瘍が7日目に100mm<sup>3</sup>の平均体積に達した時、マウスに5mg/kgのYP7を週2回、2週間、投与した。YP7は、HepG2腫瘍の成長を有意に阻害し、測定された腫瘍体積は2週間の間にわたってほとんど一定の値であったが、非処置マウスへ接種された腫瘍は、この期間中、急速に成長し続けた。したがって、YP7は、マウスにおけるHepG2異種移植片に対して強い抗腫瘍活性を示した。

## 【0280】

## 考察

本明細書に記載されているように、GPC3発現腫瘍細胞および組織に非常に特異性が高い、GPC3に対する高親和性mAbを作製した。YP7は、HCC(例えば、HepG2およびHuh-4)、卵巣明細胞がん腫(例えば、TOV-21G)、およびメラノーマ細胞(例えば、UACC-62)における低発現レベルのGPC3を検出した。これらの結果は、YP7が、GPC3発現腫瘍細胞を標的にするがん診断法および治療のための非常に有望な候補であることを示している。

## 【0281】

mAb産生のためのハイブリドーマテクノロジーは、この37年間、十分確立されており(KoehlerおよびMilstein, Nature 256:495-497, 1975)、リツキシマブのデビュー以来、11個のmAbががん治療用に承認されている(ShuptrineおよびSurana, Semin Cancer Biol 22:3-13, 2012)。しかしながら、治療抗体のハイスループット開発における大

10

20

30

40

50

きな障害は、短い時間枠（24～48時間）内で何百個から何千個というハイブリドーマ上清をスクリーニングすることの実行可能性に関わる（ChiarellaおよびFazio、Biotechnol Lett 30:1303-10、2008）。ELISAは、ペプチドバックボーンまたは部分的に変性したタンパク質抗原に特異的なmAbを単離するための好適な方法であるが、がん細胞上の天然型の抗原を認識するmAbを捕らえるのに常に実用的とは限らない（Yokoyamaら、Current Protocols in Immunology、2.5.1-2.5.25、2006）。インタクテナ細胞会合型抗原との抗体反応性を評価するために、フローサイトメトリー方法が理想的であるが、伝統的な装置は、ハイスループットアクセス用に設計されていない。この点を踏まえ、本明細書に開示された研究についての最初のスクリーニングの間、オートサンプラーを有するフローサイトメーターを用いた。

10

## 【0282】

これらの新しいmAbは、GPC3発現がん処置および診断のための大きな潜在的可能性を秘めている。ヒト化（Gettsら、MAbs 2:682-694、2010）および抗体毒素/薬物結合体の開発（Pastanら、Nat Rev Cancer 6:559-565、2006）は、がん治療のためにそれらを発展させることができる。免疫毒素などの免疫結合体は、一般的に、毒素送達のために非常に高い親和性Fvを必要とし、なぜなら、患者は、毒素媒介性副作用を避けるために、ホールIgG抗体単独よりずっと低い用量で、かつより少ないサイクル数で処置されるからである（Pastanら、Nat Rev Cancer 6:559-565、2006）。さらに、抗体Fvは、キメラ抗原受容体（CAR）-T細胞および抗体Fvに基づいた遺伝子治療において適用することができる。本明細書に開示されたmAb抗体はまた、血清GPC3の測定、がん検出および処置フォローアップのためのIHC、インビボ腫瘍画像化、ならびに循環腫瘍細胞の単離などの診断方法において有用性がある。

20

## 【0283】

## （実施例3）

## GPC3特異的免疫毒素

4個の組換え免疫毒素を、標準技術に従って、Pseudomonas外毒素フラグメントPE38（配列番号1）に融合したYP7、YP8、YP9（クローン9）、またはYP9.1 scFvを用いて作製した。簡単に述べれば、各免疫毒素構築物において、抗体VHドメインを、VLドメインに、ペプチド（Gly<sub>4</sub>Ser）<sub>3</sub>（配列番号28のアミノ酸残基119～133）をコードするリンカー配列を用いて融合した。抗体VLドメインを、PE38に、短いリンカー配列（ASGG；配列番号28のアミノ酸残基247～250）を用いて融合した。図9A～9Dは、それぞれ、YP7ScFv-PE38、YP8ScFv-PE38、YP9ScFv-PE38、およびYP9.1ScFv-PE38免疫毒素（YP7IT、YP8IT、YP9IT、およびYP9.1ITとも呼ばれる）のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。免疫毒素のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、配列番号27、28、および30～35として本明細書で示されている。

30

## 【0284】

GPC3を発現する細胞（G1、HepG2、およびHep3B細胞）に対する免疫毒素の結合親和性を、フローサイトメトリーにより評価した。細胞を収集し、培養培地（10% FBS、1% GIBCO（登録商標）GlutaMAX（商標）、および抗生物質を追加したDMEM）中に再懸濁した。細胞を、培養培地中に段階希釈された免疫毒素とのインキュベーション前に、氷上で冷却した。次に、細胞を、冷PBSで1回洗浄し、培養培地中に200倍希釈されたウサギ抗PE38抗体（Sigma-Aldrich）と氷上で60分間、インキュベートした。その後、細胞を、冷PBSで1回洗浄し、培地中に200倍希釈されたRPE-ヤギ抗ウサギ抗体（Invitrogen P-2771MP）とともに氷上で60分間、インキュベートした。細胞を、PBS中で再び、1回洗浄し、FACSCalibur機械（BD Biosciences）において分析を

40

50

行った。Cell Questソフトウェア(BD Biosciences)を用いてデータを取得し、FlowJo(商標)で分析した。図10に示されているように、4つ全ての免疫毒素は、GPC3発現がん細胞に対する非常に高い結合親和性を示した。例えば、YP9.1ScFv-PE38は、Hep3BおよびHepG2細胞に対するピコモル濃度の結合親和性( $K_d = 40 \sim 50 \text{ pM}$ )を有する。各免疫毒素の結合親和性は、下記の表6に要約されている。

【0285】

GPC3発現細胞に対する高い結合親和性を確認した後、免疫毒素を細胞傷害性について評価した。細胞(G1細胞、HepG2細胞、およびHep3B細胞)を、培養培地(10% FBS、1% GIBCO(登録商標)GlutaMAX(商標)、および抗生物質を追加したDMEM)中2000細胞/180 $\mu\text{l}$ /ウェルの濃度で、96ウェルプレートに蒔いた。免疫毒素を培養培地中に段階希釈し、生じた混合物の20 $\mu\text{l}$ を、各ウェルに加えた。プレートを37 $^{\circ}\text{C}$ で3日間、インキュベートした。細胞増殖を、Cell Counting Kit-8(Dojindo Molecular Technologies、Gaithersburg、MD)を用いてWST-8変換により評価した。10 $\mu\text{l}$ の体積のWST-8(5mm WST-8、0.2mm 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルスルファート、および150mm NaCl)を各ウェルに加え、インキュベーションを、37 $^{\circ}\text{C}$ で4時間、行った。試料の450nmにおける吸光度を、650nmの参照波長と共に測定した。図11に示されているように、全ての免疫毒素は、3つ全てのGPC3発現細胞系の細胞増殖を有意に阻害した。G1細胞、Hep3B細胞、およびHepG2細胞についての各免疫毒素の阻害濃度50( $\text{IC}_{50}$ )は表6に要約されている。

【0286】

【表6】

表6. 抗GPC3免疫毒素の増殖阻害および細胞結合親和性

	G1		Hep3B		HepG2	
	$\text{IC}_{50} (\text{ng ml}^{-1})$	$K_d (\text{nM})$	$\text{IC}_{50} (\text{ng ml}^{-1})$	$K_d (\text{nM})$	$\text{IC}_{50} (\text{ng ml}^{-1})$	$K_d (\text{nM})$
YP7ScFv-PE38	15	$\geq 10.53$	304	$\geq 8.65$	92	0.10
YP8ScFv-PE38	68	0.14	383	0.07	120	$\geq 2.41$
YP9ScFv-PE38	73	0.22	233	$\geq 15.53$	122	0.15
YP9.1ScFv-PE38	10	0.05	192	0.04	61	0.03

$\text{IC}_{50}$ : 細胞の増殖阻害(WSTアッセイ)

$K_d$ : 細胞上での結合親和性(フローサイトメトリー)

【0287】

これらのデータは、YP7、YP8、YP9、およびYP9.1の免疫毒素の全てが、GPC3発現細胞に対する非常に高い結合親和性を有し、かつGPC3発現がん細胞の増殖を有意に阻害する能力があることを示している。特に、YP9.1ScFv-PE38免疫毒素は、最も高い結合親和性およびがん細胞増殖の最も大きい阻害を示した。

【0288】

(実施例4)

被験体においてがんを検出し、または被験体における癌の診断を確認するためのGPC3特異的モノクローナル抗体

この実施例は、被験体におけるがんの検出のための、GPC3を結合するモノクローナル抗体の使用を記載する。この実施例はさらに、被験体におけるがんの診断を確認するためのこれらの抗体の使用を記載する。

【0289】

試料(例えば、バイオプシー)を、GPC3陽性がん(すなわち、HCC、メラノーマ、肺の扁平上皮がん腫、または卵巣明細胞がん腫などのGPC3を発現または過剰発現するがん)を有すると診断されたかまたは有するのではないかと疑われる患者から得る。が

10

20

30

40

50

んを有しない患者から採取された試料は、対照として用いることができる。試料において G P C 3 発現細胞の存在を検出するために免疫組織化学法 ( I H C ) を実施する。I H C 方法は、当該分野において周知である。例えば、蛍光マーカーに結合体化された G P C 3 特異的抗体は、G P C 3 を直接検出するために用いることができる。対照試料と比較しての患者試料の蛍光強度の増加により、その試料における G P C 3 発現細胞の存在が検出される。試料における G P C 3 陽性細胞の検出により、その患者が G P C 3 陽性がんを有することが示されるか、またはその被験体におけるがんの診断が確認される。

【 0 2 9 0 】

( 実施例 5 )

がんの処置のための G P C 3 特異的モノクローナル抗体

10

この実施例は、H C C、メラノーマ、肺の扁平上皮がん腫、または卵巣明細胞がん腫などの G P C 3 を発現または過剰発現するがんの処置のための G P C 3 特異的モノクローナル抗体の使用を記載する。G P C 3 陽性がんとして診断された患者は、当該分野における標準手順に従って処置することができる。

【 0 2 9 1 】

この実施例では、G P C 3 陽性がんとして診断された患者に、P s e u d o m o n a s 外毒素 ( P E ) に連結された G P C 3 特異的モノクローナル抗体を含む免疫結合体が投与される。P E 免疫結合体の調製法は、当該分野において以前に報告されており ( 例えば、米国特許第 7 , 0 8 1 , 5 1 8 号および米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 1 4 3 0 4 号を参照のこと ) そして実施例 3 において上記されている。一部の患者では、その免疫結合体は、静脈内ボラス注射によって 1 日おきに合計 3 ~ 6 回投与される。他の患者では、その免疫結合体は、1 0 日間にわたって連続的な静脈内注入によって投与される。患者に投与される免疫結合体の用量は、患者の体重および性別、ならびに投与の様式および時間経過に応じて変動する。処置の後、がんの進行 ( 腫瘍の成長および転移を含む ) および疾病の他の臨床的徴候について患者を評価する。

20

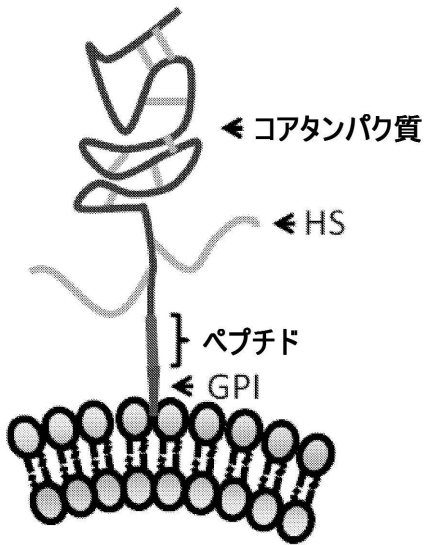
【 0 2 9 2 】

開示された本発明の原理が適用され得る多数の可能な実施形態を考えれば、例証された実施形態が、本発明の好ましい例だけにすぎず、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないことは認識されるはずである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲の範囲および精神内に入る全てを本発明者らの発明と主張する。

30

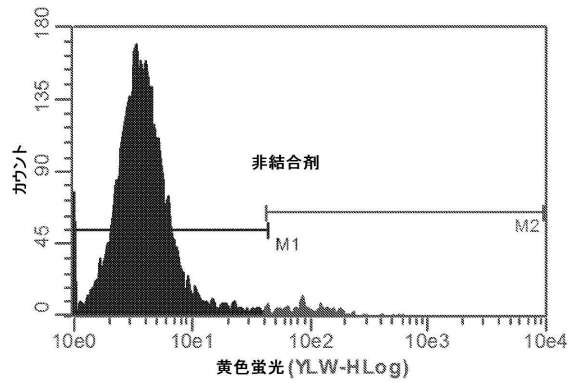
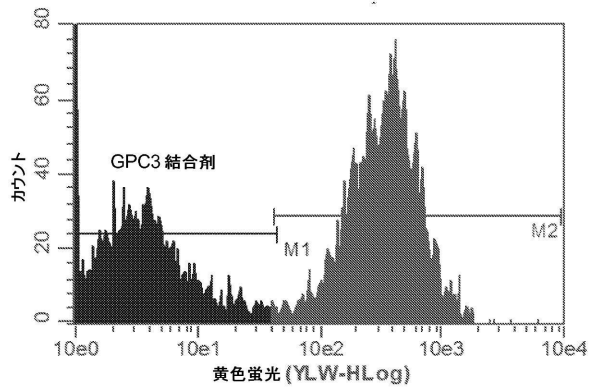
【 図 1 A 】

FIG. 1A

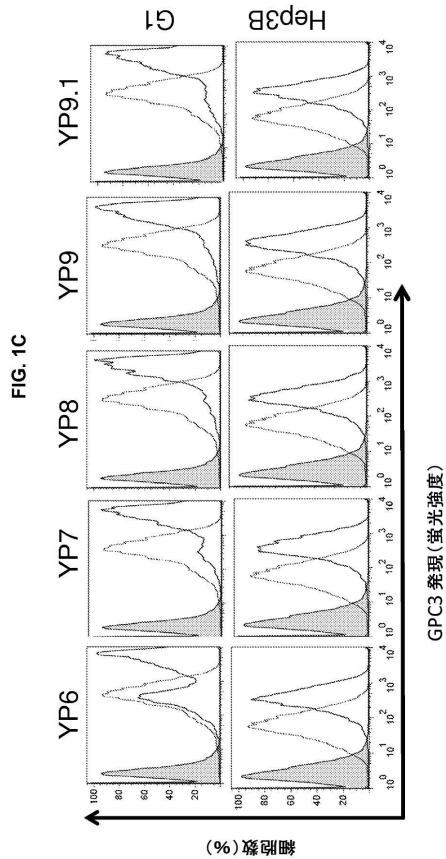


【 図 1 B 】

FIG. 1B

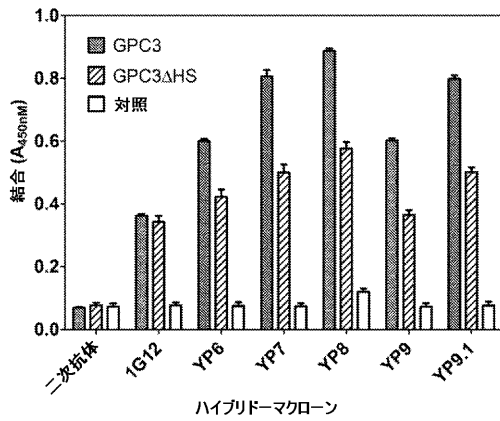


【 図 1 C 】



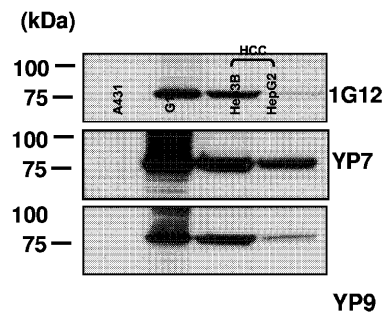
【 図 1 D 】

FIG. 1D

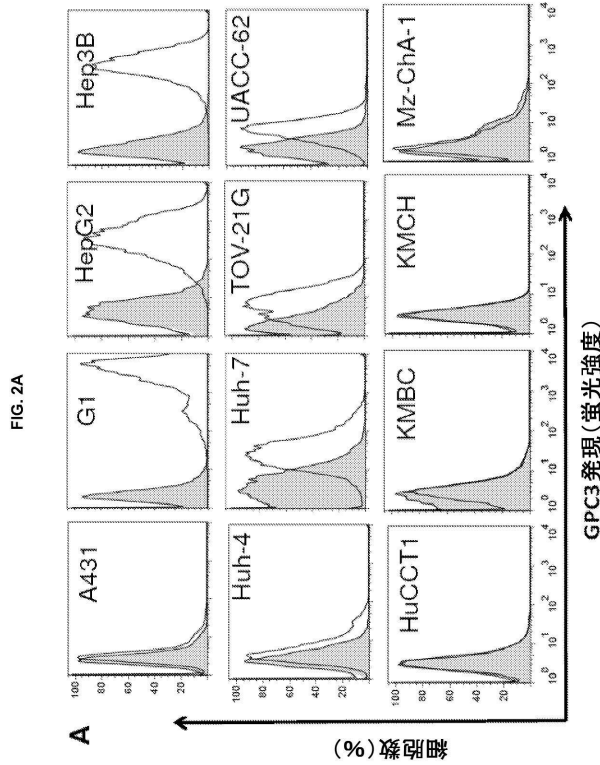


【 図 1 E 】

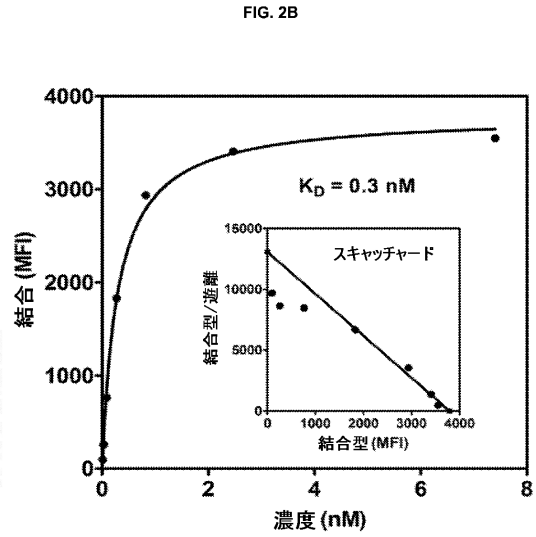
FIG. 1E



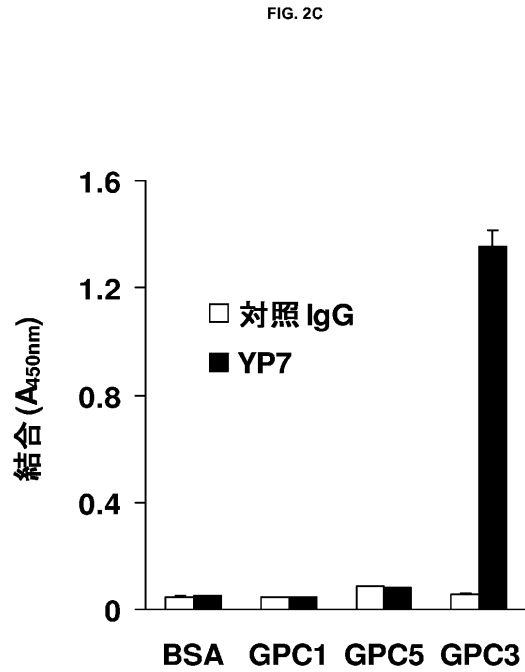
【 図 2 A 】



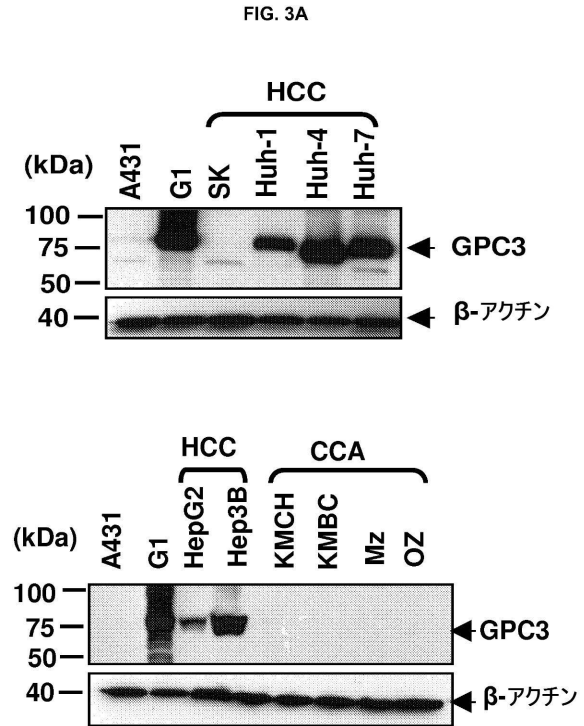
【 図 2 B 】



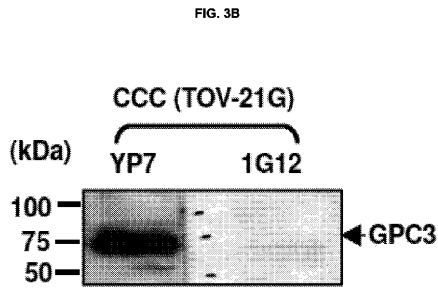
【 図 2 C 】



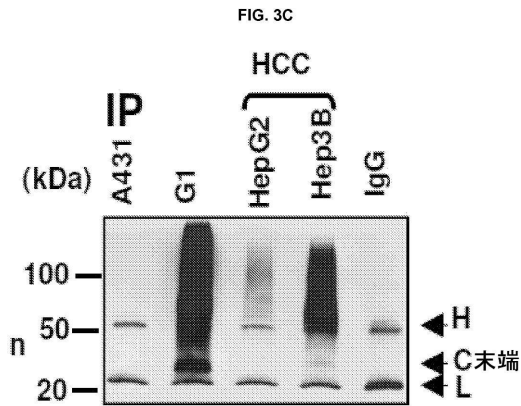
【 図 3 A 】



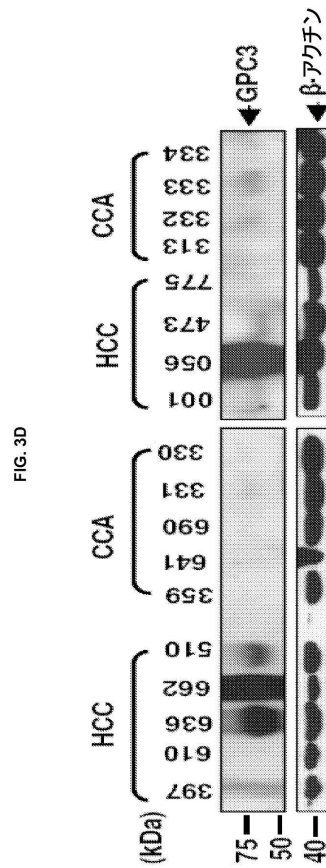
【 図 3 B 】



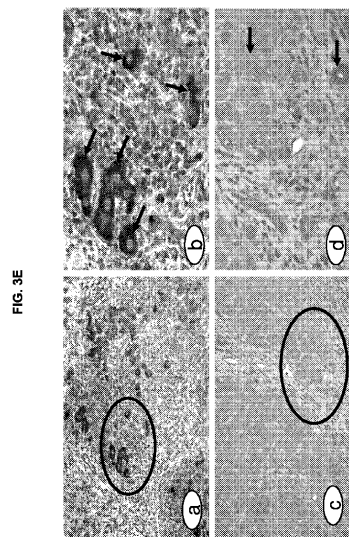
【 図 3 C 】



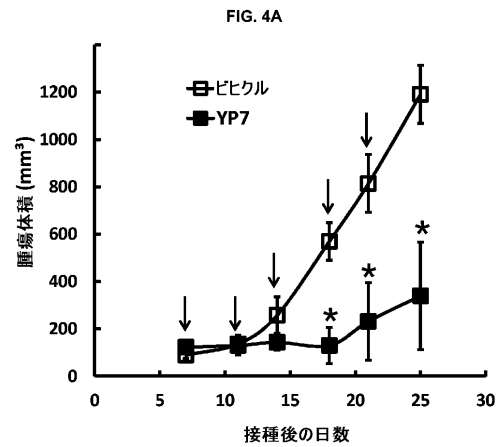
【 図 3 D 】



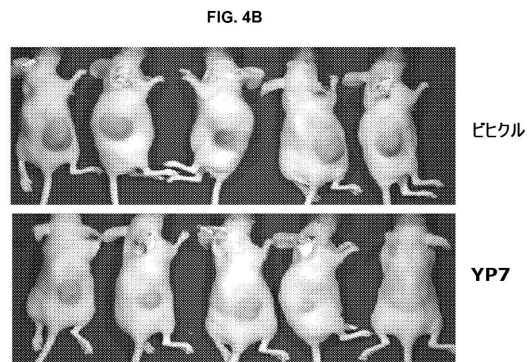
【 図 3 E 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 5 】

FIG. 5

Yp6\_VH\_クローン4 GAGGTGCAGCTTGTGGAAGTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAAACTC 60  
 Yp6\_VH\_クローン7 GAGGTGCAGCTTGTGGAAGTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAAACTC 60  
 Yp8\_VH GAGGTGCAGCTTGTGGAAGTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAAACTC 60  
 Yp7\_VH GAGGTGCAGCTTGTGGAAGTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAAACTC 60  
 Yp9\_VH GAGGTGCAGCTTGTGGAAGTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAAACTC 60  
 Yp9.1\_VH GAGGTGCAGCTTGTGGAAGTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTGAAGGGTCATTGAAACTC 60  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VH\_クローン4 TCATGTGCAGCCTCGGATTCACTCAAGACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT 120  
 Yp6\_VH\_クローン7 TCATGTGCAGCCTCGGATTCACTCAAGACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT 120  
 Yp8\_VH TCATGTGCAGCCTCGGATTCACTCAAGACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT 120  
 Yp7\_VH TCATGTGCAGCCTCGGATTCACTCAAGACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT 120  
 Yp9\_VH TCATGTGCAGCCTCGGATTCACTCAAGACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT 120  
 Yp9.1\_VH TCATGTGCAGCCTCGGATTCACTCAAGACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT 120  
 \*\*\*\*\*

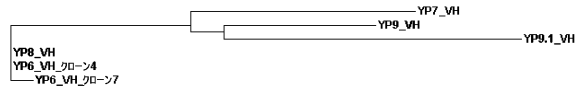
Yp6\_VH\_クローン4 CCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGCTCCGATAAGAAATAAACTAATAATTATGCAACA 180  
 Yp6\_VH\_クローン7 CCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGCTCCGATAAGAAATAAACTAATAATTATGCAACA 180  
 Yp8\_VH CCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGCTCCGATAAGAAATAAACTAATAATTATGCAACA 180  
 Yp7\_VH CCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGCTCCGATAAGAAATAAACTAATAATTATGCAACA 180  
 Yp9\_VH CCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGCTCCGATAAGAAATAAACTAATAATTATGCAACA 180  
 Yp9.1\_VH CCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGCTCCGATAAGAAATAAACTAATAATTATGCAACA 180  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VH\_クローン4 TATTATGCCGACTCAGTGAAGAAGCAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG 240  
 Yp6\_VH\_クローン7 TATTATGCCGACTCAGTGAAGAAGCAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG 240  
 Yp8\_VH TATTATGCCGACTCAGTGAAGAAGCAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG 240  
 Yp7\_VH TATTATGCCGACTCAGTGAAGAAGCAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG 240  
 Yp9\_VH TATTATGCCGACTCAGTGAAGAAGCAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG 240  
 Yp9.1\_VH TATTATGCCGACTCAGTGAAGAAGCAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG 240  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VH\_クローン4 CTCCTATCGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACAGCCATGTTATCTGTGGCC 300  
 Yp6\_VH\_クローン7 CTCCTATCGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACAGCCATGTTATCTGTGGCC 300  
 Yp8\_VH CTCCTATCGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACAGCCATGTTATCTGTGGCC 300  
 Yp7\_VH CTCCTATCGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACAGCCATGTTATCTGTGGCC 300  
 Yp9\_VH CTCCTATCGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACAGCCATGTTATCTGTGGCC 300  
 Yp9.1\_VH CTCCTATCGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAAGACACAGCCATGTTATCTGTGGCC 300  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VH\_クローン4 GCTAACTCGTTGCTTACGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 351  
 Yp6\_VH\_クローン7 GCTAACTCGTTGCTTACGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 351  
 Yp8\_VH GCTAACTCGTTGCTTACGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 351  
 Yp7\_VH GCTAACTCGTTGCTTACGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 351  
 Yp9\_VH GCTAACTCGTTGCTTACGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 351  
 Yp9.1\_VH GCTAACTCGTTGCTTACGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 351  
 \*\*\*\*\*

Kabat CDR  
IMGT CDR



【 図 7 A 】

FIG. 7A

Yp6\_VL GACATTTGTGATGTCACAGTCTCCATCTCCCTAGCTGTGTGAGTGGAGAGAAGGTTACT 60  
 Yp8\_VL GACATTTGTGATGTCACAGTCTCCATCTCCCTAGCTGTGTGAGTGGAGAGAAGGTTACT 60  
 Yp9\_VL\_クローン9 GACATTTGTGATGTCACAGTCTCCATCTCCCTAGCTGTGTGAGTGGAGAGAAGGTTACT 60  
 Yp9\_VL\_クローン10 GACATTTGTGATGTCACAGTCTCCATCTCCCTAGCTGTGTGAGTGGAGAGAAGGTTACT 60  
 Yp9.1\_VL GACATTTGTGATGTCACAGTCTCCATCTCCCTAGCTGTGTGAGTGGAGAGAAGGTTACT 60  
 Yp7\_VL GACATTTGTGATGTCACAGTCTCCATCTCCCTAGCTGTGTGAGTGGAGAGAAGGTTACT 60  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VL GTGAAGTGCAGCTCAGTCAAGCCCTTTTATATAGTAACTCAAAGAAGTACTTGGCC 120  
 Yp8\_VL GTGAAGTGCAGCTCAGTCAAGCCCTTTTATATAGTAACTCAAAGAAGTACTTGGCC 120  
 Yp9\_VL\_クローン9 ATGAGCTGCAGCTCAGTCAAGCCCTTTTATATAGTAACTCAAAGAAGTACTTGGCC 120  
 Yp9\_VL\_クローン10 ATGAGCTGCAGCTCAGTCAAGCCCTTTTATATAGTAACTCAAAGAAGTACTTGGCC 120  
 Yp9.1\_VL ATGAGCTGCAGCTCAGTCAAGCCCTTTTATATAGTAACTCAAAGAAGTACTTGGCC 120  
 Yp7\_VL ATGAGCTGCAGCTCAGTCAAGCCCTTTTATATAGTAACTCAAAGAAGTACTTGGCC 120  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VL TGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCAACTAGG 180  
 Yp8\_VL TGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCAACTAGG 180  
 Yp9\_VL\_クローン9 TGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCAACTAGG 180  
 Yp9\_VL\_クローン10 TGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCAACTAGG 180  
 Yp9.1\_VL TGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCAACTAGG 180  
 Yp7\_VL TGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCAACTAGG 180  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VL SAATATGGGGTCCCTGATGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCAC 240  
 Yp8\_VL SAATATGGGGTCCCTGATGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCAC 240  
 Yp9\_VL\_クローン9 SAATATGGGGTCCCTGATGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCAC 240  
 Yp9\_VL\_クローン10 SAATATGGGGTCCCTGATGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCAC 240  
 Yp9.1\_VL SAATATGGGGTCCCTGATGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCAC 240  
 Yp7\_VL SAATATGGGGTCCCTGATGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCAC 240  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VL ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTAACTAT 300  
 Yp8\_VL ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTAACTAT 300  
 Yp9\_VL\_クローン9 ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTAACTAT 300  
 Yp9\_VL\_クローン10 ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTAACTAT 300  
 Yp9.1\_VL ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTAACTAT 300  
 Yp7\_VL ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTAACTAT 300  
 \*\*\*\*\*

【 図 6 】

FIG. 6

Yp6\_VH\_クローン4 EVQLVGGSGGLVQPEGSLKLSCAASGFTFRNINAVRQAPGKLEWVARIRNKTNRYAT 60  
 Yp6\_VH\_クローン7 EVQLVGGSGGLVQPEGSLKLSCAASGFTFRNINAVRQAPGKLEWVARIRNKTNRYAT 60  
 Yp8\_VH EVQLVGGSGGLVQPEGSLKLSCAASGFTFRNINAVRQAPGKLEWVARIRNKTNRYAT 60  
 Yp7\_VH EVQLVGGSGGLVQPEGSLKLSCAASGFTFRNINAVRQAPGKLEWVARIRNKTNRYAT 60  
 Yp9\_VH EVQLVGGSGGLVQPEGSLKLSCAASGFTFRNINAVRQAPGKLEWVARIRNKTNRYAT 60  
 Yp9.1\_VH EVQLVGGSGGLVQPEGSLKLSCAASGFTFRNINAVRQAPGKLEWVARIRNKTNRYAT 60  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VH\_クローン4 YYADSVKDRFTISRDDSQSMYLYQMNNLKTEDTAMFYCVAGNSPAYWGQGLVTVSA 117  
 Yp6\_VH\_クローン7 YYADSVKDRFTISRDDSQSMYLYQMNNLKTEDTAMFYCVAGNSPAYWGQGLVTVSA 117  
 Yp8\_VH YYADSVKDRFTISRDDSQSMYLYQMNNLKTEDTAMFYCVAGNSPAYWGQGLVTVSA 117  
 Yp9\_VH YYADSVKDRFTISRDDSQSMYLYQMNNLKTEDTAMFYCVAGNSPAYWGQGLVTVSA 117  
 Yp9.1\_VH YYADSVKDRFTISRDDSQSMYLYQMNNLKTEDTAMFYCVAGNSPAYWGQGLVTVSP 117  
 \*\*\*\*\*

Kabat CDR  
IMGT CDR



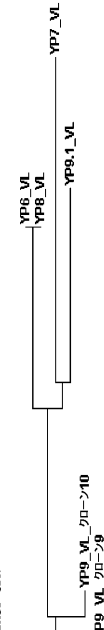
【 図 7 B 】

FIG. 7B

Yp6\_VL CGGTCAAGTTCGGTCTGGGCAAGCTGGAGCTGAAA 339  
 Yp8\_VL CGGTCAAGTTCGGTCTGGGCAAGCTGGAGCTGAAA 339  
 Yp9\_VL\_クローン9 CGGTCAAGTTCGGTCTGGGCAAGCTGGAGCTGAAA 339  
 Yp9\_VL\_クローン10 CGGTCAAGTTCGGTCTGGGCAAGCTGGAGCTGAAA 339  
 Yp9.1\_VL CGGTCAAGTTCGGTCTGGGCAAGCTGGAGCTGAAA 339  
 Yp7\_VL CGGTCAAGTTCGGTCTGGGCAAGCTGGAGCTGAAA 339  
 \*\*\*\*\*

Yp6\_VL Yp8\_VL Yp7\_VL Yp9\_VL\_クローン10 Yp9\_VL\_クローン9 Yp9.1\_VL Yp7\_VL

Kabat CDR  
IMGT CDR





【 図 9 D 】

FIG. 9D

```

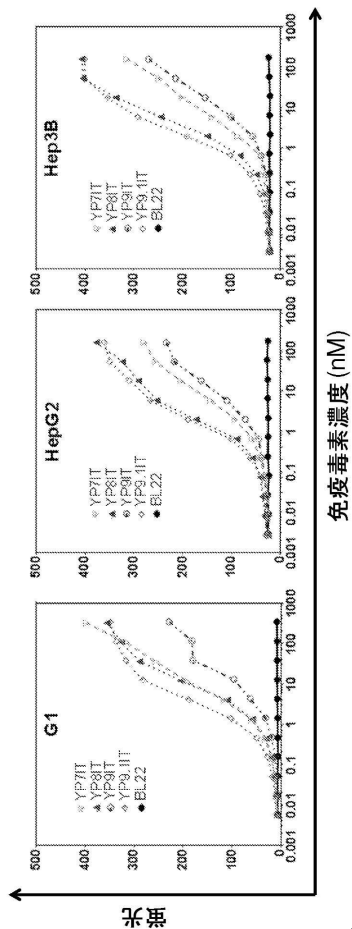
atgagatgacacttctggaactgagagagattgggacccctgaaggtcattg
M E V Q L V E T G S G L V I V I A P E G S T
aaactcctgctgacagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
K L S C A T S G F N F N T N A M R W V R
aggtctccagaaaggttggatcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
G A F G K G L F W V A E V I R N E T N V Y
gcacacattatgagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q
aaactcctgctgacagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
R M V F L Q M N N L K T D T F A Y V G
gtgagcagaaactcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
V A G N G T A Y W G Q G T T V F A Y V G
gagagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
G G S G G G G G S G G G G S D I V M S Q
tctcactcctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
S F S S L A V Y S V G R V W T M R C K S
cagagcttttatagtgacacaaagaactctgctcagctcagctcagctcagctc
Q S L L Y S S N Q K N Y L A W Y Q R P
ggagctcctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
G Q S P K L L I Y W A S T R E S S V P D
cagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
R F T G S V S G T D F T T T S S V E A
gagagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
E D L A V Y Y C Q Q Y Y N Y P L T F G A
ggagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
G T K L E L K A S G C P E G C S L A A I
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
T A H Q A C H L P L E T F R R R Q P R
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
G N B Q L E Q C G Y P V D R L V A L Y L
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
A A R L S F W N Q Y D Q V D F S P F
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
G S G G D L G E A I R E D P E Q A R L A
ctgagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
L T L A A A E S E R F V R Q G T G N D R
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
A C A A N W G P A D S G D A F F R N Y R
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
T G A E F L G D G D V S P S T R G T D
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
N W T V E R L L Q A H R Q L S E S G Y V
ctgagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
F U G Y H S I F E A D D D
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
R A R S Q D L D A I W R G P Y I A G D P
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
A L A Y G Y A Q D Q G P D A F R I R W
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
G A L L R V Y V P R S S L P C F Y R T S
ctgagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
L T L A A P E A A G E V E R L I G H P L
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
P F R S D A I T G P R E D F G L D G I
ctgagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
L G N P L A E R T V Y I P S A I P T D P
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
R N V G C D L D P S S T F R K Q A I S
agcagcagcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc
A L P D Y A S Q P G K P F R E D L R

```

VII  
VL  
PK38

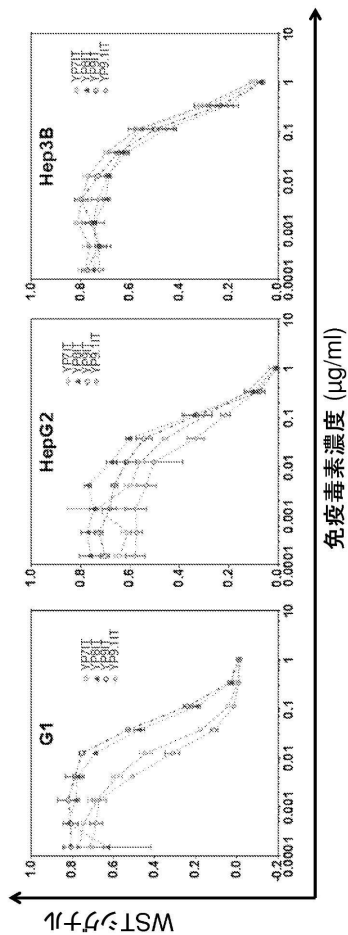
【 図 1 0 】

FIG. 10



【 図 1 1 】

FIG. 11



【配列表】

0006494507000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 L
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 N
		G 0 1 N	33/577 B

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ホー, ミッチェル

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 7 0 4 - 7 3 8 8 , アーバナ, トッテナム コート 4 0 0 9

(72)発明者 フォン, イェン ティー.

アメリカ合衆国 バージニア 2 2 0 0 3 , アナンデール, バンフ ストリート 4 5 0 0

(72)発明者 ガオ, ウェイ

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 2 , ロックビル, コングレッションナル レーン 2 6 3 , アpartment 7 1 2

(72)発明者 ジャン, イーファン

アメリカ合衆国 バージニア 2 0 1 6 9 , ハイマーケット, チャフィンス ファーム コート 5 3 4 6

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 特表2010-533498(JP,A)

特開2009-108047(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S  
( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

U n i P r o t / G e n e S e q

专利名称(译)	抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的高亲和力单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP6494507B2</a>	公开(公告)日	2019-04-03
申请号	JP2015515243	申请日	2013-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	美国卫生及公共服务部		
申请(专利权)人(译)	美利坚合众国, 如丽局局长介绍泰德, 健康和人类Sabishizu系		
当前申请(专利权)人(译)	美利坚合众国, 如丽局局长介绍泰德, 健康和人类Sabishizu系		
[标]发明人	ホーミツチエル フォンイエンティー ガオウェイ ジャンイーファン		
发明人	ホー, ミツチエル フォン, イエンティー. ガオ, ウエイ ジャン, イーファン		
IPC分类号	C07K16/30 C07K19/00 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/13 C12N15/62 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/45 A61K2039/505 A61P1/16 A61P11/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P35/00 A61P35/04 A61K47/6851 A61K47/6869 C07K16/303 C07K2317/73 C07K2317/92 C12Y204/02036 C07K16/30 C07K16/3069 C07K2317/24 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/569 C07K2317/622 C07K2317/76 G01N33/57423 G01N33/57438 G01N33/57449 G01N33/57492 G01N2333/705 G01N2458/00		
FI分类号	C07K16/30.ZNA C07K19/00 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15 /13 C12N15/62.Z A61K39/395.T A61K39/395.L A61P35/00 G01N33/53.N G01N33/577.B		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/654232 2012-06-01 US		
其他公开文献	JP2015526387A5 JP2015526387A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本文描述了一组结合GPC3的高亲和力单克隆抗体的鉴定。所公开的抗体识别癌细胞表面上的天然GPC3以及可溶性GPC3。最高亲和力抗体 ( YP7 ) 被进一步表征并显示出非常敏感, 因为它能够检测具有低表达GPC3的癌细胞。YP7还在体内显示出显著的HCC肿瘤生长抑制。包含与PE38融合的本文公开的抗体的免疫毒素表现出对表达GPC3的细胞的非常高的结合亲和力并显著抑制表达GPC3的癌细胞生长。因此, 本文公开的高亲和力单克隆抗体可用于表达GPC3的癌症的诊断和治疗。

(45) 発行日 平成31年4月3日 (2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日 (2019.3.15)

(5) Int. Cl.		F I		
C O 7 K	16/30	(2006.01)	C O 7 K	16/30
C O 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K	19/00
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K	16/46
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15

請求項の数 31 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-515243 (P2015-515243)	(73) 特許権者	508285606
(86) (22) 出願日	平成25年5月31日 (2013.5.31)		
(65) 公表番号	特表2015-526387 (P2015-526387A)		
(43) 公表日	平成27年9月10日 (2015.9.10)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/043633		
(87) 国際公開番号	W02013/181543		
(87) 国際公開日	平成25年12月5日 (2013.12.5)		
審査請求日	平成28年4月4日 (2016.4.4)		
(31) 優先権主張番号	61/654,232		
(32) 優先日	平成24年6月1日 (2012.6.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査		(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策 100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリビカン-3 に対する高親和性モノクローナル抗体およびその使用