

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7667857号
(P7667857)

(45)発行日 令和7年4月23日(2025.4.23)

(24)登録日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46 Z N A
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
請求項の数 21 (全74頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-533881(P2023-533881)	(73)特許権者	520488148
(86)(22)出願日	令和3年12月2日(2021.12.2)		康諾亜生物医薬科技(成都)有限公司
(65)公表番号	特表2023-552765(P2023-552765 A)		KEYMED BIOSCIENCES (CHENGDU) CO., LTD.
(43)公表日	令和5年12月19日(2023.12.19)		中華人民共和国610219四川省成都市双流区成都天府国際生物城中路18号D2号楼
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/135153	(74)代理人	110000729
(87)国際公開番号	WO2022/117050		弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(87)国際公開日	令和4年6月9日(2022.6.9)	(72)発明者	陳 博
審査請求日	令和5年6月2日(2023.6.2)		中華人民共和国、610219、四川省成都市双流区成都天府国際生物城中路18号D2号楼
(31)優先権主張番号	202011402162.X	(72)発明者	徐 剛
(32)優先日	令和2年12月2日(2020.12.2)		中華人民共和国、610219、四川省
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な腫瘍エンゲージ剤治療剤の開発及び使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 標的細胞表面のGPC3抗原に特異的に結合する第1の抗原結合部分又はその抗原結合断片であって、

前記第1の抗原結合部分は、第1の重鎖及び第1の軽鎖を含み、前記第1の抗原結合部分は、第1の抗原に特異的に結合する第1の結合ドメインを含み、

前記第1の結合ドメインは、重鎖及び軽鎖の相補性決定領域(CDR)の組み合わせを含む、第1の抗原結合部分又はその抗原結合断片、及び、

(b) T細胞表面のCD3抗原に特異的に結合する第2の抗原結合部分又はその抗原結合断片であって、前記第2の抗原結合部分は、第2の重鎖及び第2の軽鎖を含み、前記第2の抗原結合部分は、第2の抗原に結合する第2の結合ドメインを含み、

第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3は、それぞれSEQ ID NO:11、106、13に示されるアミノ酸配列を含み、及び第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3は、それぞれSEQ ID NO:60、17、61に示されるアミノ酸配列を含む、二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項2】

前記第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO:111の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO:88の第1の軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項3】

前記第2の結合ドメインは、それぞれSEQ ID NO:134、135、136に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、それぞれSEQ ID NO:115、116、128に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む、請求項1に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項4】

前記第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO:158の第2の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO:126の第2の軽鎖可変領域を含む、請求項3に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項5】

前記第1の抗原結合部分の第1の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列の43番目が元々Glnであったことを条件として、Gln43Lys突然変異(VKGPC3:Gln43Lys)を有し、および／または

前記第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域は、アミノ酸配列の39番目が元々Glnであったことを条件として、Gln39Glu(VHGPC3:Gln39Glu)突然変異を有する、請求項2に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項6】

前記第2の抗原結合部分の第2の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列の40番目が元々Glnであったことを条件として、Gln40Glu突然変異(VλCD3:Gln40Glu)を有し、前記第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域は、アミノ酸配列の39番目が元々Glnであったことを条件として、Gln39Lys突然変異(VHCD3:Gln39Lys)を有する、請求項4に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項7】

前記二重特異的抗体の第1の抗原結合部分と第2の抗原結合部分のFc部分は、ヒトIgG4 knob-into-hole構造を含むknob-into-hole構造を採用する、請求項1に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項8】

前記第1の重鎖は、アミノ酸配列SEQ ID NO:164から選ばれる重鎖を含み、前記第1の軽鎖は、アミノ酸配列SEQ ID NO:162から選ばれる軽鎖を含み、または

前記第1の重鎖は、アミノ酸配列SEQ ID NO:172から選ばれる重鎖を含み、前記第1の軽鎖は、アミノ酸配列SEQ ID NO:170から選ばれる軽鎖を含み、および／または

前記第2の重鎖は、アミノ酸配列SEQ ID NO:168の重鎖を含み、前記第2の軽鎖は、アミノ酸配列SEQ ID NO:166の軽鎖を含む、請求項1に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分。

【請求項9】

請求項1に記載の第1の抗原結合部分を含む、GPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分。

【請求項10】

請求項1に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分、或いは、請求項9に記載のGPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸。

【請求項11】

前記第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO:112であり、及び、前記第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO:89である、請求項10に記載の核酸。

【請求項12】

前記二重特異的抗体の前記第1の抗原結合部分の第1の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO:165であり、及び、前記第1の抗原結合部分の第1の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO:163であり、前記第2の抗原結

10

20

30

40

50

合部分の第2の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 169であり、及び、前記第2の抗原結合部分の第2の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 167であり、または

前記二重特異的抗体の前記第1の抗原結合部分の第1の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 173であり、及び、前記第1の抗原結合部分の第1の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 171であり、前記第2の抗原結合部分の第2の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 169であり、及び、前記第2の抗原結合部分の第2の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 167である、

請求項10または11に記載の核酸。

10

【請求項13】

請求項10に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項14】

請求項10に記載の核酸又は請求項12に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項15】

請求項1に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分、又は請求項9に記載のGPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分、又は請求項10に記載の核酸、又は請求項13に記載のベクター、又は請求項14に記載の細胞を含む、組成物。

【請求項16】

治療部分に共有結合する請求項1に記載の二重特異的抗体又はその抗原結合部分、或いは、請求項9に記載のGPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分を含む抗体-薬物コンジュゲート。

20

【請求項17】

前記治療部分は、細胞毒性部分、化学療法剤、細胞因子、免疫阻害剤、免疫刺激剤、分解ペプチド又は放射性同位体から選ばれる、請求項16に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項18】

前記細胞毒性部分は、タタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン (Cephaeline)、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、チューブリン阻害剤、有糸分裂阻害剤、ドラスタチン10若しくは15、イリノテカン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD (actinomycin D)、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン (Puromycin)、カリケアミシン、代謝拮抗剤、アルキル化剤、シスプラチンまたはカルボプラチン、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、ラケルマイシン (CC-1065)、抗生物質、ピロロ[2,1-c][1,4]-ベンゾジアゼピン (PDB)、ジフテリア毒素及び関連分子、リシン、コレラ毒素、シガ様毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ボウマン・バーク大豆プロテアーゼ阻害剤、シュードモナス外毒素、アロリン、サポリン (Saporin)、モデシン (modeccin)、ゲラニン、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質、ツルレイシ (momordica charantia) 阻害剤、クルシン、クロチン (crotin)、サボナリアコン (sapaonarria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン及びエノマイシン毒素、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、ブドウ球菌エンドトキシンA、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ジフテリア毒素、シュードモナスエンドトキシンから選ばれ、

30

40

前記細胞因子は、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-

50

28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム、及び、TNF α から選ばれ、

前記放射性同位体は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 及び ^{227}Th から選ばれるものである、

請求項17に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項19】

前記チューブリン阻害剤は、マイタンシンから選択され、

前記有糸分裂阻害剤は、モノメチルアウリスタチンE若しくはFから選択され、

前記代謝拮抗剤は、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン又はクラドリビンから選択され、

前記アルキル化剤は、メクロレタミン、チオプリン(thiopurine)、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジンから選択され、

前記抗生物質は、ブレオマイシン、イダルビシン、プリマイシン(primycin)、アントラマイシン(AMC)から選択され、

前記ジフテリア毒素及び関連分子は、ジフテリアA鎖及びその活性断片及びハイブリッド分子から選択され、

前記リシンはリシンA又は脱グリコシル化リシンA鎖毒素から選択され、

前記シガ様毒素はSLTI、SLTII、SLTIIIV、LT毒素、C3毒素、シガ毒素から選択され、

前記アメリカヤマゴボウタンパク質はPAPI、PAPII及びPAP-Sから選択される、請求項18に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項20】

請求項1に記載の特異的抗体又はその抗原結合部分、又は請求項9に記載のGPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分、又は請求項10に記載の核酸分子、又は請求項13に記載のベクター、又は請求項14に記載の細胞、又は請求項15に記載の組成物、又は請求項16に記載の抗体-薬物コンジュゲートを含む、キット。

【請求項21】

GPC3関連疾患の診断、治療或予防に使用されるための、請求項1に記載の特異的抗体又はその抗原結合部分、請求項9に記載のGPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分、請求項10に記載の核酸分子、請求項12に記載のベクター、請求項14に記載の細胞、請求項15に記載の組成物及び／又は請求項16に記載の抗体-薬物コンジュゲートであって、

前記GPC3関連疾患は、腫瘍を含み、前記腫瘍は、がんであり、前記がんは、GPC3陽性がんであり、前記GPC3陽性がんは、GPC3陽性肝臓がん、GPC3陽性肝細胞がん、GPC陽性膵臓がん、GPC陽性肺がん、GPC陽性大腸がん、GPC陽性乳がん、GPC陽性前立腺がん、又はGPC陽性リンパ腫から選択され、

または、前記GPC3関連疾患は、GPC陽性白血病である、請求項1に記載の特異的抗体又はその抗原結合部分、請求項9に記載のGPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分、請求項10に記載の核酸分子、請求項13に記載のベクター、請求項14に記載の細胞、請求項15に記載の組成物及び／又は請求項16に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、二重特異的抗体及びその使用、特に新規な腫瘍エンゲージャ治療剤の開発及

10

20

30

40

50

び使用に関する。

【背景技術】

【0002】

グリピカン3 (Glypican-3、GPC3、DGSX、GTR2-2、MXR7、OCI-5、SDYS、SGB、SGBS又はSGBS1とも称される)は、ホスファチジルイノシトールプロテオグリカンであり、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) ファミリーに属し、グリコシルホスファチジルイノシトール (Glycosyl phosphatidyl inositol, GPI) により細胞膜の外面にアンカーされている。GPC3タンパク質のコアは 580個のアミノ酸からなり、分子量が約65kDaであり、プロテイナーゼFurinが358Arg-359Ser (355R-356Q-357Y-358R-359S) の間に切断され、2つのサブユニットを形成し、2つのヘパラン硫酸多糖鎖は、近膜のC末端サブユニットに接続され、細胞外マトリックスの重要な部分であり、Wnt、Hh (Hedgehog)、線維芽細胞増殖因子fibroblast growth factor (FGF) などの複数のシグナル伝達経路による細胞の活性化に寄与する可能性がある (Lin et al, Glypicans as Cancer Therapeutic Targets, Trends Cancer. 2018)。GPC3は、様々な胎児組織 (肝臓、肺、腎臓及び胎盤) に発現され、出生後、DNAメチル化修飾の故に、GPC3遺伝子は、発現されなくなるが、さまざまな腫瘍組織、例えば、肝細胞がんの66~90%、肺扁平上皮がんの54~65%、小細胞肺がんの16~64%、消化道腫瘍 (食道がん、胃がん、噴門がん) の20~30%及び他のタイプのがん細胞の一部では、GPC3遺伝子の発現は、回復する (Kawaida M et al, Diffuse and canalicular patterns of glypican-3 expression reflect malignancy of hepatocellular carcinoma, Pathol Int. 2019 Mar; 69 (3) : 125-134; Yu X et al, Differential expression of glypican-3 (GPC3) in lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma and its clinical significance, Genet Mol Res. 2015 Aug 28; 14 (3) : 10185-92; Ishiguro T et al, An anti-glypican3/CD3 bispecific T cell-redirecting antibody for treatment of solid tumors, Sci Transl Med. 2017 Oct 4; 9 (410) : eaal4291; Baumhoer D et al, Glypican3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples, Am J Clin Pathol. 2008 Jun; 129 (6) : 899-906)。病理切片では、GPC3のびまん性発現は、HCC細胞の低分化の程度及び疾患の予後に関連している。最近、GPC3は、腫瘍幹細胞マーカーであり、GPC3に特異的な細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) により、効果的に腫瘍幹細胞を殺傷し、マウス体内の腫瘍の増殖を抑制できることが報告されている (Okada Met al, Selective elimination of undifferentiated human pluripotent stem cells using pluripotent state-specific immunogenic antigen Glypican-3, Biochem Biophys Res Commun. 2019 Apr 9; 511 (3) : 711-717)。

【0003】

T細胞二重特異性抗体 (又はT細胞アダプターと呼ばれる) は、その一端を介して標的細胞の表面抗原 (抗原アーム) を認識し、他端を介してT細胞のCD3受容体 (CD3ア

10

20

30

40

50

ーム)に結合し、TCR／ペプチド／HLAと類似する方式で、T細胞のCD3を凝集させることで、T細胞を活性化させ、腫瘍を殺傷する特別な抗体分子である。BCMA×CD3ε鎖(CD3ε)を標的とするT細胞二重特異的(TCB)抗体である。BCMA×CD3二重特異的分子の作用機序は、同時にBCMA⁺骨髄腫細胞とCD3⁺T細胞に結合してT細胞の活性化とT細胞を介した細胞殺傷作用を引き起こすことを含む。

【0004】

コドリツズマブ(Codrituzumab)は、最初のGPC3を標的とする治療用モノクローナル抗体であり、マウス腫瘍モデルにおいて有意な腫瘍抑制活性を示すが、第II相臨床試験(NCT01507168)では、コドリツズマブ(Codrituzumab)群は、対照群と比較して疾患無増悪期間及び全生存期間に有意差がない(Abo-Alpha GK et al, Randomized phase II placebo controlled study of codrituzumab in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma, J Hepatol. 2016 Aug; 65(2):289-95)。研究では、コドリツズマブ(Codrituzumab)は、高GPC3発現やCD16の高親和性変異を有する腫瘍を有する患者に臨床的利益をもたらす可能性があることが示されている(Chen G et al, Combining expression of GPC3 in tumors and CD16 on NK cells from peripheral blood to identify patients responding to codrituzumab, Oncotarget. 2018 Jan 2; 9(12):10436-10444)。ERY974は、抗GPC3／CD3二重特異的抗体であり、T細胞による殺傷エフェクターにより様々なGPC3陽性腫瘍細胞を効果的に殺傷することができ、活性においてモノクローナル抗体に優れているが、副作用が比較的に強いため、2018年に臨床研究が中断され、2019年に第I相臨床試験が再開された後、サイトカイン放出症候群を回避するために、IL-6抗体トシリズマブ(Tocilizumab)と併用されていた。

【発明の概要】

【0005】

従来技術に存在する問題を解決するために、本開示は、GPC3タンパク質に対して高親和性を有する新規なGPC3抗体を提供する。また、本開示は、GPC3抗体及びCD3抗体で形成される新規なGPC3-CD3κλ二重特異的抗体をさらに提供する。GPC3抗体は、標的細胞に対する抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)を媒介することができ、GPC3抗体はGPC3誘導エンドサイトーシスを抑制することができる。GPC3-CD3κλ二重特異的抗体は、全長IgG配置を採用し、電荷を導入し、親和力を最適化することで、κλ二重特異的抗体を優先的にGPC3+腫瘍組織に局在し、低濃度で活性化T細胞を募集し、標的細胞に対して効果的な殺傷を生じることができ、標的細胞が存在しない場合では、T細胞を活性化させず、また、κλ二重特異的抗体は、FcγRI、FcγRIIA及びFcγRIIIA等の受容体に結合しないため、サイトカインストームのリスクを低減する。薬効試験では、このような新規なGPC3-CD3κλ二重特異的抗体は、非常に低用量で腫瘍成長を阻害し、免疫再構築マウス移植腫瘍の成長を効果的に阻害することができ、カニクイザルの体内で実施された毒理学的な研究も、動物が新規なGPC3-CD3κλ二重特異的抗体に対して良好な容認性を持ち、新規なGPC3-CD3κλ二重特異的抗体の有効性及び安全性は、いずれも同種類の抗体に優れていることを示す。

【0006】

一の態様において、本開示は、GPC3に結合する抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【0007】

一の態様において、本開示は、二重特異的抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【0008】

一の態様において、本開示は、前記態様に係る二重特異的抗体又はその抗原結合部分をコードする、核酸を提供する。

【0009】

一の態様において、本開示は、前記態様に係る核酸を含む、ベクターを提供する。

【0010】

一の態様において、本開示は、前記態様に係る核酸又はベクターを含む、細胞を提供する。

【0011】

前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分によれば、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化されたものである。

10

【0012】

一の態様において、本開示は、前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分或いはそのコード核酸、及び、薬学的に許容される担体を含む、薬物組成物又はキットを提供する。

【0013】

一の態様において、本開示は、治療部分に共有結合する前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分、二重特異的又は多重特異的分子を含む、抗体-薬物コンジュゲートを提供する。

【0014】

一の態様において、本開示は、治療有効量で前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片、核酸、ベクター、細胞及び／又は薬物組成物を哺乳動物に投与するステップを含む、GPC3関連病症を治療する方法を提供する。

20

【0015】

一の態様において、本開示は、哺乳動物のGPC3関連病症を治療するための薬物又はキットの製造における、前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片、核酸、ベクター、細胞、及び／又は、薬物組成物の使用を提供する。

【0016】

本開示に係る抗体は、GPC3タンパク質の検出、GPC3関連疾患の診断、治療又は予防などを含む様々な使用に用いられる。

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】GPC3組換えタンパク質の非還元SDS-PAGE結果を示す図である。

【図2】GPC3安定トランスフェクト細胞のフローサイトメトリー検出結果を示す図である。

【図3】CD3εγ-Fc組換えタンパク質のSDS-PAGE結果を示す図である。

【図4】GPC3抗体及びヒトGPC3安定トランスフェクト細胞のフローサイトメトリー結果を示す図である。

【図5】抗体49G8の異なる種GPC3抗原への結合を示す図である。

【図6】抗体49G8によるADCC作用を示す図である。

40

【図7】ヒト化抗体のGPC3抗原への結合を示す図である。

【図8】ヒト化抗体のGPC3安定トランスフェクト細胞への結合を示す図である。

【図9】ヒト化抗体のOctet親和力測定を示す図である。

【図10】ヒト化抗体のSPR親和力測定を示す図である。

【図11】ヒト化抗体の細胞エンドサイトーシス結果を示す図である。

【図12】CD3ヒト化抗体のヒトCD3εγ抗原への結合を示す図である。

【図13】CD3ヒト化抗体のJurkat細胞への結合を示す図である。

【図14】CD3ヒト化抗体のヒト及びサルCD3εγ抗原への親和力比較を示す図である。

【図15】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のGPC3安定トランスフェクト細胞へ

50

の結合を示す図である。

【図16】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のHepG2細胞への結合を示す図である。

【図17】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のJurkat細胞への結合を示す図である。

【図18】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体の末梢血T細胞への結合を示す図である。

【図19】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体によるTDC作用を示し、図19Aは、HepG2細胞に対する殺傷を示し、図19Bは、T細胞に対する活性化を示す図である。

【図20】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のT細胞NFATシグナル経路に対する作用を示す図である。

10

【図21】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体によるPBMの活性化作用を示す図である。

【図22】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のFcγR活化性受容体への結合を示す図である。

【図23】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体の免疫再構築マウスHepG2移植腫瘍モデルにおける抑制作用を示す図である。

【図24】GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のCD3ヒト化マウスHepa1-6/hGPC3移植腫瘍モデルにおける抑制作用を示す図である。

【発明を実施するための形態】

20

【0018】

I. 定義

本開示では、特に断らない限り、本明細書で使用される科学的及び技術的用語は、当業者に一般的に理解される意味を有する。また、本明細書で使用されるタンパク質及び核酸化学、分子生物学、細胞及び組織培養、微生物学、免疫学に関連する用語及び実験室の操作手順は、対応する分野で広く使用される用語及び日常手順である。一方、本発明をよりよく理解するために、関連用語の定義及び説明を以下に提供する。

【0019】

本明細書で使用される用語「GPC3」は、動物、好ましくはヒトに存在するGPC3自体及びその任意の変異体、アイソフォーム及びパラログを集合的に指す概念を指すことができる。

30

【0020】

「ヒトGPC3」という用語は、ヒト由来のGPC3を意味する。

【0021】

「抗GPC3抗体」及び「GPC3に結合する抗体」という用語は、当該抗体を診断剤及び／又は治療剤としてGPC3を標的することに有用であるように、十分な親和力でGPC3に結合することができる抗体を指す。一の実施形態において、抗GPC3抗体は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)により測定された無関係な非GPC3タンパク質に対する抗GPC3抗体の結合度が、GPC3に対する当該抗体の結合度の約10%より低い。いくつかの実施形態において、GPC3に結合する抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は、 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$)の解離定数(K_d)を有する。いくつかの実施形態において、抗GPC3抗体は、異種からのGPC3同士における保存的GPC3エピトープに結合する。

40

【0022】

「CD3」とは、特に断らない限り、霊長動物(例えば、ヒト)、非ヒト霊長動物(例えば、カニクイザル)及びげっ歯動物(例えば、マウス及びラット)のような哺乳動物を含む、任意の脊椎動物に由来の任意の天然CD3を指す。この用語は、「全長」で未加工のCD3、及び細胞内で処理された任意の形態のCD3に由来するものをカバーする。この用語は、スプライス変異体又は対立変異体などのCD3の自然発生変異体をさらにカバ

50

一する。一の実施形態において、CD3は、ヒトCD3であり、特にヒトCD3の ϵ サブユニット(CD3 ϵ)である。ヒトCD3 ϵ のアミノ酸配列は、UniProt(www.uniprot.org)登録番号P07766(バージョン144)、又はNCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeq NP_000724.1に示される。カニクイザル[Macaca fascicularis]CD3 ϵ のアミノ酸配列は、NCBI GenBank no. BAB71849.1に示される。

【0023】

「細胞表面」という用語は、当分野におけるその通常の意味に従って使用され、そこで、タンパク質や他の分子への結合によりアクセス可能な細胞外部を含む。

【0024】

本明細書で使用されている「約」又は「およそ」という用語は、特に断らない限り、所定値又は範囲の $\pm 10\%$ 以内である。整数であると要求されている場合、当該用語は、所定値又は範囲の $\pm 10\%$ 以内で最も近い整数に切り上げ又は切り捨てなるものである。

【0025】

抗体鎖ポリペプチド配列に関して、「実質的に同一」という用語は、参照ポリペプチド配列に対して、 60% 以上、 65% 以上、 70% 以上、 75% 以上、 80% 以上、 85% 以上、 90% 以上、 95% 以上、 96% 以上、 97% 以上、 98% 以上、 99% 以上の配列同一性を示す抗体鎖として理解され得る。核酸配列に関して、前記用語は、参照核酸配列に対して少なくとも 60% 超え、 65% 超え、 70% 超え、 75% 超え、 80% 超え、 85% 超え、 90% 超え、 95% 超え、 96% 超え、 97% 超え、 98% 超え、 99% 超え、又はより高い配列同一性を示すヌクレオチド配列であると理解され得る。

【0026】

配列の「相同性」又は「同一性」は、本分野で周知の意味を有し、開示された技術を使用して、2つの核酸又はポリペプチド分子又は領域間の配列同一性の百分率を計算することができる。ポリヌクレオチド又はポリペプチドの全長に沿って、又は当該分子の領域に沿って配列同一性を測定することができる。2つのポリヌクレオチド又はポリペプチド間の相同性を測定する方法は、複数あるが、「相同性」という用語は、当業者に周知である(Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988))。

【0027】

「置換型」変異体は、天然配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、その同じ位置に異なるアミノ酸が挿入された変異体である。前記置換は、分子内で1つのアミノ酸のみが置換されている単一の置換、又は同じ分子に2つ以上のアミノ酸が置換されている複数の置換であり得る。複数の置換は、連続する部位に存在する。同様に、1つのアミノ酸は、複数の残基に置換されてもよく、そのような変異体は、置換及び挿入の両方を含む。「挿入型」変異体は、1つ以上のアミノ酸が天然配列の特定の位置にあるアミノ酸に直接隣接して挿入された変異体である。アミノ酸に直接隣接することは、当該アミノ酸の α -カルボキシル又は α -アミノ官能基に結合することを意味する。「欠失型」変異体は、天然アミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸が除去された変異体である。通常、欠失型変異体は、分子の特定の領域に1つ又は2つのアミノ酸が欠失しているものである。

【0028】

抗体の可変ドメインに関して、「可変」という用語は、特定の標的に対する特定の抗体の特異的認識及び結合に使用される、抗体の間で配列が大きく異なる関連する分子の特定の部分を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均等に分布していない。可変性は、すべての軽鎖及び重鎖の可変ドメイン内にある、相補性決定領域(CDRs、即ちCDR1、CDR2、及びCDR3)又は超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメイン内でより高い程度に保存される部分は、フレームワーク(FR)領域又はフレームワークシーケンスと呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の各可変ドメインは、それぞれ、3つのCDRsによって連結し、 β -シート配置を主にする4つのFR領域を含み、CDRsは、 β -シート構造に連結するループを形成し、前記ループは、

ある場合にはβシート構造の一部を形成する。各鎖のCDRsは、通常、FR領域によって隣接して連結されており、他の鎖からのCDRにより、抗体の標的結合部位（エピトープ又は決定基）の形成に寄与する。本明細書で使用される免疫グロブリンアミノ酸残基の番号付けは、特に断らない限り、Kabattらの免疫グロブリンアミノ酸残基番号付けシステムに従う。1つのCDRは、関連するエピトープに特異的に結合する能力を有し得る。
【0029】

本明細書で使用される抗体の「抗体断片」又は「抗原結合断片」とは、全長未満であるが、抗原に結合する前記抗体の可変領域（例えば、1つ又は複数のCDR及び／又は1つ又は複数の抗体結合部位）の少なくとも一部を含むことで、結合特異性及び前記全長の抗体の特異的結合能力の少なくとも一部が保持されている全長抗体の任意の部分を目指す。従って、抗原結合断片とは、抗体断片が由来する抗体と同一の抗原に結合する抗原結合部分を含む抗体断片を指す。抗体断片は、全長抗体の酵素触媒処理に産生された抗体誘導体、ならびに合成的に産生された誘導体、例えば、組換えに産生された誘導体を含む。抗体は、抗体断片を含む。抗体断片の実例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖Fv（scFv）、Fv、dsFv、ダイアボディ、Fd、及びFd'断片、並びに修飾断片を含む他の断片が挙げられるが、これらに限定されない。前記断片は、例えば、ジスルフィド結合及び／又はペプチドリinkerによって連結された複数の鎖を含み得る。抗体断片は、通常、50個以上のアミノ酸又は約50個のアミノ酸を含み、典型的には200個以上のアミノ酸又は約200個のアミノ酸を含む。抗原結合断片は、抗体フレームワーク（例えば、対応する領域を置換することで）に挿入されるときに免疫特異的に（即ち、少なくとも $10^7 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ のKa又は少なくとも約 $10^7 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ のKaを示す）抗原に結合する抗体をもたらす任意の抗体断片を含む。「機能的断片」又は「抗GPC3抗体のアナログ」は、前記受容体がりガンドに結合する能力又はシグナル伝達を開始する能力を抑制する又は実質的に低下させる断片又はアナログである。本明細書で使用される機能的断片は、通常、「抗体断片」と同じ意味を有し、抗体に関して、前記受容体のりガンドに結合する能力又はシグナル伝達を開始する能力を抑制する又は実質的に低下させる断片、例えば、Fv、Fab、F(ab')₂などを指し得る。「Fv」断片は、1つの重鎖の可変ドメイン及び1つの軽鎖の可変ドメインの非共有結合によって形成された二量体（V_H-V_L二量体）からなる。該立体配置では、インタクトな抗体の場合と同様に、各可変ドメインの3つのCDRsが相互作用し、V_H-V_L二量体の表面の標的結合部位を決定する。前記の6つのCDRsは、インタクトな抗体に標的結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は標的に特異的な3つのCDRsのみを含むFvの半分）でも、標的を認識し、結合する機能を持つことができる。

【0030】

本明細書で使用される「二重特異的抗体」（Bispecific antibody、BsAb）という用語は、2つの異なる抗原決定基に特異的に結合することができる抗体及び／又は抗原結合分子を指し、通常、二重特異性抗体及び／又は抗原結合分子は、それぞれが異なる抗原決定基に対して特異性を有する、2つの抗原結合部位を含む。いくつかの実施形態において、前記二重特異性抗体及び／又は抗原結合分子は、2つの抗原決定基、特に2つの異なる細胞に発現される2つの抗原決定基に同時に結合することができる。

【0031】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」とは、同一の抗体の集団を指し、モノクローナル抗体集団中の個々の抗体分子各々が、他の抗体分子と同一であることを意味する。この特性は、複数の異なる配列を持つ抗体を含む抗体のポリクローナル群の特性と逆である。モノクローナル抗体は、多くの周知の方法で調製することができる（Smith et al. (2004) J. Clin. Pathol. 57, 912-917、及び、Nelson et al., J Clin Pathol (2000), 53, 111-117）。例えば、モノクローナル抗体は、B細胞を不死化することで調製でき、例えば、骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞株を産生することで、又はEBVなどのウイルスによるB細胞の感染によって調製することができる。組換え技術は、抗体をコードす

るヌクレオチドの人工配列を保有するプラスミドで宿主細胞を形質転換することで、インビトロで宿主細胞のクローン集団から抗体を調製することもできる。

【0032】

本明細書で使用される「ハイブリドーマ」又は「ハイブリドーマ細胞」という用語は、抗体産生リンパ球と非抗体産生がん細胞との融合によって産生される（通常、骨髄腫又はリンパ腫細胞である）細胞又は細胞株を指す。当業者に知られているように、ハイブリドーマは、増殖し、かつ特定のモノクローナル抗体を産生し、継続的に供給することができる。ハイブリドーマを産生するための方法は、当分野で知られている。「ハイブリドーマ」又は「ハイブリドーマ細胞」という用語が言及される場合、ハイブリドーマのサブクローン及び子孫細胞も含む。

10

【0033】

本明細書で使用される場合、全長抗体は、2つの全長重鎖（例えば、VH-CH1-CH2-CH3又はVH-CH1-CH2-CH3-CH4）及び2つの全長軽鎖（VL-CL）及びヒンジ領域を有する抗体であり、例えば、抗体を分泌するB細胞によって天然的に産生される抗体、合成的に産生される同じドメインを有する抗体である。

【0034】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が1つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指す。

【0035】

「ヒト化」抗体とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はそれらの断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂又は抗体の他の抗原に結合するサブ配列）である、非ヒト（例えば、マウス）の抗体形態を指す。好ましくは、ヒト化抗体が、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、レシピエント抗体の相補性決定領域（CDR）の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDR残基で置換された、ヒト免疫グロブリンである。

20

【0036】

また、ヒト化において、VH及び／又はVLのCDR1、CDR2及び／又はCDR3領域内のアミノ酸残基を突然変異させることで、抗体の1つ以上の結合特性（例えば、親和性）を改善することも可能である。例えば、PCRに媒介される突然変異を行うことで突然変異を導入することができ、抗体結合又は他の機能的特性に対する影響は、本明細書に記載のインビトロ又はインビボ試験により評価することができる。通常、保存的突然変異が導入される。このような突然変異は、アミノ酸の置換、追加、又は欠失であってもよい。また、CDR内の突然変異は、通常、1つ又は2つを超えない。従って、本開示に係るヒト化抗体は、CDR内に1つ又は2つのアミノ酸突然変異を含む抗体をさらに含む。

30

【0037】

本明細書で使用される「CDR」という用語は、相補性決定領域（complementarity-determining region）を指し、抗体分子の各重鎖及び軽鎖は、3つのCDRを有することが知られている。CDRは、超可変領域とも呼ばれ、抗体の各重鎖及び軽鎖の可変領域に存在し、CDRの一次構造において変動性の極めて高い部位がある。本明細書では、重鎖のCDRは、重鎖に由来するアミノ末端配列のアミノ末端のCDR1、CDR2、及びCDR3で示され、軽鎖のCDRは、軽鎖に由来するアミノ末端配列のアミノ末端のCDR1、CDR2、及びCDR3で示される。これらの部位は、三次構造で互いに隣接しており、抗体に結合する抗原の特異性を決定する。

40

【0038】

本明細書で使用される「エピトープ」という用語は、抗体のパラトープが結合する、抗原上の任意の抗原決定基を指す。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面群を含み、通常、特定の三次元構造特徴及び特定の電荷特徴を有する。

50

【0039】

本明細書で使用される抗体又はその抗原結合断片に関して、「特異的に結合する」又は「免疫特異的に結合する」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、抗体又は抗原結合断片の、抗体と抗原の抗体結合サイトとの間の非共有相互作用によって同種抗原と1つ以上の非共有結合を形成する能力を指す。前記抗原は、単離された抗原であってもよく、腫瘍細胞に存在してもよい。通常、抗原に免疫特異的に結合する（又は特異的に結合する）抗体は、約 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 又は約 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 又はそれ以上の親和定数 K_a (1×10^{-7} 又は $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 又はそれ以下の解離定数 (K_d)) で前記抗原に結合する。親和定数は、抗体反応の標準的な動力学的方法、例えば、免疫測定、表面プラズモン共鳴 (SPR) (Rich and Myszk a (2000) Curr. Opin. Biotechnol. 11: 54、Englebienne (1998) Analyst. 123: 1599)、等温滴定熱量測定法 (ITC) 又は本分野で周知の他の動力学的作用相互作用測定によって測定することができ、抗体の結合親和力を算出するための例示的な SPR 及び ITC 方法が記載されている米国特許第 7, 229, 619 号を参照)。結合速度のリアルタイム検出及びモニタリングのための装置及び方法は既知であり、市販から購入可能である (BiaCore 2000, Biacore AB, Uppsala, Sweden and GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) Biochem. Soc. Trans. 27: 335 を参照)。

10

【0040】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」という用語は、2つ以上の連結しているヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体を含むオリゴマー又はポリマーを指し、通常、リン酸ジエステル結合で結合しているデオキシリボ核酸 (DNA) 及びリボ核酸 (RNA) を含む。本明細書で使用される「核酸分子」という用語は、DNA 分子、RNA 分子を含むことを意図する。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよく、且つ cDNA であってもよい。

20

【0041】

本明細書で使用される単離された核酸分子は、核酸分子の天然の供給源に存在するその他の核酸分子から単離された核酸分子である。例えば、cDNA 分子の「単離された」核酸分子は、組換え技術によって調製される場合、その他の細胞性物質又は培地を実質的に含まず、又は化学的に合成される場合、化学前駆体又はその他の化学成分を実質的に含まない。本明細書で提供される例示的な単離された核酸分子は、提供される抗体又は抗原結合断片をコードする単離された核酸分子を含む。

30

【0042】

本明細書で使用される核酸配列、領域、エレメント又はドメインに関して「作動可能に連結されている」とは、核酸領域が互いに機能的に関連していることを意味する。例えば、プロモーターは、核酸の転写を調整又は媒介できるように、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結され得る。

【0043】

本明細書に記載の配列表における前記配列の「保存的配列修飾」、即ち、ヌクレオチド配列にコードされるか又はアミノ酸配列を含む抗体と抗原との結合を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸配列修飾も提供される。これらの保存的配列修飾は、保存的ヌクレオチド及びアミノ酸の置換、及び、ヌクレオチド及びアミノ酸の付加及び欠失を含む。例えば、本分野で周知の標準技術 (例えば、部位特異的変異及び PCR 媒介性変異誘発) により修飾を本明細書に記載の配列表に導入することができる。保存的配列修飾は、保存的アミノ酸置換を含み、アミノ酸残基は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは、本分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン及びヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非帯電極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば

40

50

、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、 β 分岐側鎖を有するアミノ酸(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。従って、抗GPC3抗体における予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。抗原結合を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、本分野において周知である(例えば、Brummell et al, Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al, Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); Burkset al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)を参照)。

10

【0044】

他の選択肢として、別の実施形態において、例えば、飽和変異誘発により、抗GPC3抗体をコードする配列の全部又は一部に沿ってランダムに突然変異を導入することができ、得られた修飾の抗GPC3抗体を、改善された結合活性についてスクリーニングすることができる。

【0045】

本明細書で使用される「発現」は、ポリヌクレオチドの転写及び翻訳によってポリペプチドを生成するプロセスを指す。ポリペプチドの発現レベルは、例えば、宿主細胞から産生されたポリペプチドの量を決定する方法を含む、当分野で周知の任意の方法を使用して評価することができる。このような方法は、ELISAによる細胞溶解物中のポリペプチドの定量、ゲル電気泳動の後クーマシーブルー染色、Lowryタンパク質アッセイ、及び、Bradfordタンパク質アッセイを含むことができるが、これらに限定されない。

20

【0046】

本明細書で使用される「宿主細胞」は、ベクターを受け取り、維持し、複製し、並びに増幅するために使用される細胞である。宿主細胞は、さらに、ベクターによってコードされるポリペプチドを発現するために使用することができる。宿主細胞が分裂すると、ベクターに含まれる核酸は、複製されて、核酸が増幅される。宿主細胞は、真核細胞であってもよく、原核細胞であってもよい。好適な宿主細胞として、CHO細胞、様々なCOS細胞、HeLa細胞、HEK細胞、例えば、HEK293細胞を含むが、これらに限定されない。

30

【0047】

本明細書で使用される「ベクター」は、複製可能な核酸であり、ベクターを適切な宿主細胞に形質転換すると、当該ベクターから1つ又は複数の異種タンパク質を発現させることができる。ベクターは、通常、制限消化及び連結によって、ポリペプチド又はその断片をコードする核酸を導入できるベクターを含む。ベクターは、ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターをさらに含む。ベクターは、核酸の増幅のために、又は核酸にコードされるポリペプチドの発現/提示のために、ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞に導入するために使用される。ベクターは、通常、エピソームのままであるが、遺伝子又はその一部がゲノムに組み込まれている染色体に設計してもよい。また、酵母人工染色体及び哺乳動物人工染色体などの人工染色体であるベクターも考えられる。このようなビヒクルの選択及び使用は、当業者に周知である。

40

【0048】

本明細書で使用されるベクターは、「ウイルスベクター」又は「ウイルスのベクター」をさらに含む。ウイルスのベクターは、外因性遺伝子を(ビヒクル又はシャトル(shuttle)として)細胞に移すために、外因性遺伝子に作動可能に連結した、操作されたウイルスである。

【0049】

本明細書で使用される「発現ベクター」は、DNAを発現することができるベクターを含み、上記DNAは、例えば、プロモーター領域の、DNA断片の発現に影響を与える調節配列に作動可能に連結する。このような追加の断片は、プロモーター及びターミネータ

50

一配列を含むことがあり、任意選択で、1つ以上の複製起点、1つ以上の選択可能マーカ一、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル等を含むことができる。発現担体は、一般的に、プラスミド又はウイルスDNAに由来するか、又は両方のエレメントを含有することができる。従って、発現担体は、組換えDNA又はRNA構築物、例えば、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、又は他のベクターを指し、好適な宿主細胞に導入された場合、クローニングされたDNAの発現をもたらす。好適な発現ベクターは、当業者に周知であり、真核細胞及び／又は原核細胞において複製可能な発現ベクター、及びエピソームのままである発現ベクター又は宿主細胞ゲノムに組み込まれる発現ベクターを含む。

【0050】

本明細書で使用される疾患又は疾患の症状を有する個体を「治療する」とは、上記個体の症状が、部分的又は全体的に寛解するか、又は治療後そのまま変化しないことを意味する。従って、治療は、予防、治療及び／又は治癒を含む。予防は、潜在的な疾患の防止及び／又は症状の悪化若しくは疾患の進行の防止を指す。治療は、提供される任意の抗体若しくはその抗原結合断片、及び本明細書において提供される組成物の任意の薬学的用途をさらに含む。

【0051】

本明細書で使用される「治療効果」は、個体の治療によって得られる効果を意味し、疾患若しくは疾患状態の症状の変化、通常、疾患若しくは疾患状態の改良若しくは改善、又は疾患若しくは疾患状態の治癒である。

【0052】

本明細書で使用される「治療有効量」又は「治療有効用量」は、対象への投与後に治療効果を達成するのに少なくとも十分な、薬剤、化合物、物質又は化合物を含有する組成物の量を指す。従って、それは、疾患又は病症の症状を防止、治癒、改善、抑制又は部分的に抑制するために必要な量である。

【0053】

本明細書で使用される「予防有効量」又は「予防有効用量」は、対象への投与時に、例えば、疾患又は症状の発生又は再発の防止又は遅延、疾患又は症状の発生又は再発の可能性の低減など、所望の予防効果を有する物質、化合物、材料又は化合物を含有する組成物の量を指す。完全の予防有効用量は、1回の用量を投与することで達成する必要はなく、一連の用量が投与されたときのみ達成されてもよい。従って、予防有効量は、1回又は複数回の投与で投与し得る。

【0054】

本明細書で使用される「患者」という用語は、ヒトなどの哺乳動物を指す。

【0055】

II. 発明を実施するための形態

【0056】

一の態様において、本開示は、(a) 標的細胞表面上のGPC3抗原に結合する第1の抗原結合部分又はその抗原結合断片であって、第1の抗原結合部分は、第1の重鎖及び第1の軽鎖を含み、第1の抗原結合部分は、第1の抗原に結合する第1の結合ドメインを含み、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13、21、32、33、64、65、66、72、73、79、80、81、101、106又はその任意の変異体から選ばれる重鎖CDR、及び／又は、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、18、26、29、38、39、46、47、48、51、54、57、60、61、69、92、95、98又は任意の変異体から選ばれる軽鎖CDRを含む、第1の抗原結合部分又はその抗原結合断片、及び、

(b) T細胞表面上のCD3抗原に結合する第2の抗原結合部分又はその抗原結合断片であって、第2の抗原結合部分は、第2の重鎖と第2の軽鎖を含み、第2の抗原結合部分は、第2の抗原に結合する第2の結合ドメインを含む、第2の抗原結合部分又はその抗原結合断片、を含む、二重特異的抗体又はその抗原結合部分を提供する。

前記抗体又はその抗原結合部分によれば、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ

ＩＤ ＮＯ：１１、３２、６４、７９又はその任意の変異体から選ばれる重鎖ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１２、２１、３３、６５、７２、８０、１０１、１０６又はその任意の変異体から選ばれる重鎖ＣＤＲ２、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１３、６６、７３、８１又はその任意の変異体から選ばれる重鎖ＣＤＲ３を含み、及び／又は、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、３８、４６、６０又はその任意の変異体から選ばれる軽鎖ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１７、４７又はその任意の変異体から選ばれる軽鎖ＣＤＲ２、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８、２６、２９、３９、４８、５１、５４、５７、６１、６９、７６又はその任意の変異体から選ばれる軽鎖ＣＤＲ３を含む。

【００５７】

前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分によれば、第１の結合ドメインの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列は、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１、１２、１３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１、２１、１３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３２、３３、１３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６４、６５、６６の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１、７２、７３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７９、８０、８１の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１、１０１、１３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１、１０６、１３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列から選ばれ、及び、第１の結合ドメインの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列は、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、１８の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、２６の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、２９の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３８、１７、３９の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４６、４７、４８の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、５１の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、５４の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、５７の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６０、１７、６１の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、６９の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、７６の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９２、１７、６１の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９５、１７、６１の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９８、１７、６１の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列から選ばれる。

【００５８】

いくつかの実施形態において、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１、１２、１３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列を含み、及び、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、１８の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列を含む。

【００５９】

いくつかの実施形態において、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１、２１、１３の第１の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列を含み、及び、アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１６、１７、１８の第１の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３配列を含む。

【００６０】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、26の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、29の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0062】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 32、33、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、18の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0063】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、21、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 38、17、39の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0064】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、21、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、18の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 46、47、48の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0066】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、51の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、54の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0068】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、57の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0069】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、12、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 60、17、61の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0070】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 64、65、66の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、69の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、72、73の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、76の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0072】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 79、80、81の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 16、17、69の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0073】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、106、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 60、17、61の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0074】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、106、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 92、17、61の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、106、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 95、17、61の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0076】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 11、106、13の第1の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 98、17、61の第1の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0077】

前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分によれば、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 9、19、30、40、62、70、77、99、102、104、107、109、111又はその任意の変異体から選ばれる第1の重鎖可変領域を含み、及び／又は、アミノ酸配列SEQ ID NO: 14、22、24、27、34、36、42、44、49、52、55、58、67、74、82、84、86、88、90、93、96又はその任意の変異体から選ばれる第1の軽鎖可変領域を含む。

【0078】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 14又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0079】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 19又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 22又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0080】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 24又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0081】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 27又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 30又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 34又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

10

【0083】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 19又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 36又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0084】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 40又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 42又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0085】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 44又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

20

【0086】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 49又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 52又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

30

【0088】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 55又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 9又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 58又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0090】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 62又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 67又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

40

【0091】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 70又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 74又はその任意の変異体の第1の軽鎖可変領域を含む。

【0092】

いくつかの実施形態において、第1の結合ドメインは、アミノ酸配列 SEQ ID NO : 77又はその任意の変異体の第1の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO

50

Ｏ：８２又はその任意の変異体の第１の軽鎖可変領域を含む。

【００９３】

いくつかの実施形態において、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１１又はその任意の変異体の第１の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO：８６又はその任意の変異体の第１の軽鎖可変領域を含む。

【００９４】

いくつかの実施形態において、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１１又はその任意の変異体の第１の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO：８８又はその任意の変異体の第１の軽鎖可変領域を含む。

【００９５】

いくつかの実施形態において、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１１又はその任意の変異体の第１の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO：９０又はその任意の変異体の第１の軽鎖可変領域を含む。

【００９６】

いくつかの実施形態において、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１１又はその任意の変異体の第１の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO：９３又はその任意の変異体の第１の軽鎖可変領域を含む。

【００９７】

いくつかの実施形態において、第１の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１１又はその任意の変異体の第１の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO：９６又はその任意の変異体の第１の軽鎖可変領域を含む。

【００９８】

前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分によれば、第２の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３４、１３５、１３６、１３９、１４２、１４５、１４８、１５１、１５４、１５５又はその任意の変異体から選ばれる重鎖CDRを含み、及び／又は、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１５、１１６、１１７、１２２、１２３、１２８、１３１又はその任意の変異体から選ばれる軽鎖CDRを含む。

【００９９】

いくつかの実施形態において、第２の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３４、１３９、１５４又はその任意の変異体から選ばれる第２の重鎖CDR１、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３５、１５５又はその任意の変異体から選ばれる第２の重鎖CDR２、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３６、１４２、１４５、１４８、１５１又はその任意の変異体から選ばれる第２の重鎖CDR３、及び／又は、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１５、１２２又はその任意の変異体から選ばれる第２の軽鎖CDR１、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１６、１２３、１３１又はその任意の変異体から選ばれる第２の軽鎖CDR２、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１７、１２８又はその任意の変異体から選ばれる第２の軽鎖CDR３を含む。

【０１００】

いくつかの実施形態において、第２の結合ドメインの重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列は、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３４、１３５、１３６の第２の重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３９、１３５、１３６の第２の重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３９、１３５、１４２の第２の重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３９、１３５、１４５の第２の重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３９、１３５、１４８の第２の重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列、アミノ酸配列SEQ ID NO：１３９、１３５、１５１の第２の重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列、アミノ酸配列SEQ ID NO：１５４、１５５、１３６の第２の重鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列から選ばれ、及び、第２の結合ドメインの軽鎖CDR１、CDR２及びCDR３配列は、アミノ酸配列SEQ ID NO：１１５、１１６、１１７の第２の軽鎖CDR１、CDR２及びCD

10

20

30

40

50

R3配列、アミノ酸配列SEQ ID NO: 122、123、117の第2の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、アミノ酸配列SEQ ID NO: 115、116、128の第2の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、アミノ酸配列SEQ ID NO: 115、131、128の第2の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列から選ばれる。
【0101】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 134、135、136の第2の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 115、116、128の第2の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 134、135、136の第2の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 115、116、117の第2の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

10

【0102】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 134、135、136の第2の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 122、123、117の第2の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。

【0103】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 132、137、140、143、146、149、152、156、158、160又はその任意の変異体から選ばれる第2の重鎖可変領域を含み、及び／又は、アミノ酸配列SEQ ID NO: 113、118、120、124、126、129又はその任意の変異体から選ばれる第2の軽鎖可変領域を含む。

20

【0104】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 132又はその任意の変異体の第2の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 126又はその任意の変異体の第2の軽鎖可変領域を含む。

【0105】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 156又はその任意の変異体の第2の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 113又はその任意の変異体の第2の軽鎖可変領域を含む。

30

【0106】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 156又はその任意の変異体の第2の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 126又はその任意の変異体の第2の軽鎖可変領域を含む。

【0107】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 158又はその任意の変異体の第2の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 113又はその任意の変異体の第2の軽鎖可変領域を含む。

40

【0108】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 158又はその任意の変異体の第2の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 118又はその任意の変異体の第2の軽鎖可変領域を含む。

【0109】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO: 158又はその任意の変異体の第2の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列SEQ ID NO: 120又はその任意の変異体の第2の軽鎖可変領域を含む。

【0110】

いくつかの実施形態において、第2の結合ドメインは、アミノ酸配列SEQ ID NO

50

： 158 又はその任意の変異体の第 2 の重鎖可変領域、及び、アミノ酸配列 SEQ ID NO：126 又はその任意の変異体の第 2 の軽鎖可変領域を含む。

【0111】

前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分によれば、第 1 の抗原結合部分の第 1 の軽鎖は、κ 型軽鎖であり、第 2 の抗原結合部分の第 2 の軽鎖は、λ 型軽鎖であり、いくつかの実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の軽鎖可変領域は、Gln₄₃Lys 突然変異 (VKGPC₃： Gln₄₃Lys) を有する。いくつかの実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域は、Gln₃₉Glu (VHGPC₃： Gln₃₉Glu) 突然変異を有する。

【0112】

いくつかの実施形態において、第 2 の抗原結合部分の第 2 の軽鎖可変領域は、Gln₄₀Glu 突然変異 (VλCD₃： Gln₄₀Glu) を有する。いくつかの実施形態において、第 2 の抗原結合部分の第 2 の重鎖可変領域は、Gln₃₉Lys 突然変異 (VHCD₃： Gln₃₉Lys) を有する。

【0113】

いくつかの実施形態において、二重特異的抗体の第 1 の抗原結合部分と第 2 の抗原結合部分の Fc 部分は、knob-into-hole 構造を採用する。いくつかの好ましい実施形態において、ヒト IgG4 knob-into-hole 構造を採用する。

【0114】

いくつかの実施形態において、第 1 の重鎖は、SEQ ID NO：164、172 又はその任意の変異体から選ばれる重鎖を含み、第 1 の軽鎖は、SEQ ID NO：162、170 又はその任意の変異体から選ばれる軽鎖を含む。

【0115】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の重鎖は、SEQ ID NO：164 又はその任意の変異体から選ばれる重鎖を含み、第 1 の軽鎖は、SEQ ID NO：162 又はその任意の変異体から選ばれる軽鎖を含む。

【0116】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の重鎖は、SEQ ID NO：172 又はその任意の変異体から選ばれる重鎖を含み、第 1 の軽鎖は、SEQ ID NO：170 又はその任意の変異体から選ばれる軽鎖を含む。

【0117】

いくつかの好ましい実施形態において、第 2 の重鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：168 又はその任意の変異体の重鎖を含み、第 2 の軽鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：166 又はその任意の変異体の軽鎖を含む。

【0118】

一つの具体的な実施形態では、二重特異的抗体の第 1 の重鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：164 又はその任意の変異体の重鎖を含み、二重特異的抗体の第 1 の軽鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：162 又はその任意の変異体の軽鎖を含み、第 2 の重鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：168 又はその任意の変異体の重鎖を含み、第 2 の軽鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：166 又はその任意の変異体の軽鎖を含む。

【0119】

一つの具体的な実施形態では、第 1 の重鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：172 又はその任意の変異体の重鎖を含み、二重特異的抗体の第 1 の軽鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：170 又はその任意の変異体の軽鎖を含み、第 2 の重鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：168 又はその任意の変異体の重鎖を含み、第 2 の軽鎖は、アミノ酸配列 SEQ ID NO：166 又はその任意の変異体の軽鎖を含む。

【0120】

一の態様において、本開示は、前述第 1 の抗原結合部分を含む、GPC₃ に結合する抗体又はその抗原結合部分を提供する。

いくつかの実施形態において、GPC₃ に結合する抗体又はその抗原結合部分は、前記

10

20

30

40

50

いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分と少なくとも60%超え、少なくとも65%超え、少なくとも70%超え、少なくとも75%超え、少なくとも80%超え、少なくとも85%超え、少なくとも90%超え、少なくとも95%超え、少なくとも96%超え、少なくとも97%超え、少なくとも98%超え、少なくとも99%超え、又は、より高い配列同一性を有する。

【0121】

一の態様において、本開示は、前記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸、又は、これと少なくとも60%超え、少なくとも65%超え、少なくとも70%超え、少なくとも75%超え、少なくとも80%超え、少なくとも85%超え、少なくとも90%超え、少なくとも95%超え、少なくとも96%超え、少なくとも97%超え、少なくとも98%超え、少なくとも99%超え、又は、より高い配列同一性を有する核酸分子を提供する。

10

【0122】

いくつかの実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 10、20、31、41、63、71、78、100、103、105、108、110、112又はその任意の変異体から選ばれ、及び／又は、第1の抗原結合部分の第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 15、23、25、28、35、37、43、45、50、53、56、59、68、75、83、85、87、89、91、94、97又はその任意の変異体から選ばれる。

20

【0123】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 10であり、及び、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 15である。

【0124】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 20であり、及び、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 23である。

【0125】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 10であり、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 25である。

30

【0126】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 10であり、及び、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 28である。

【0127】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 31であり、及び、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 35である。

40

【0128】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 20であり、及び、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 37である。

【0129】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 41であり、及び、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 43である。

【0130】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 45であり、及び、第1の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 47である。

50

ード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 10 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 45 である。

【0131】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 10 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 50 である。

【0132】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 10 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 53 である。

10

【0133】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 10 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 56 。

【0134】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 10 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 59 である。

【0135】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 63 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 68 である。

20

【0136】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 71 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 75 である。

【0137】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 78 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 83 である。

30

【0138】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 112 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 87 である。

【0139】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 112 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 89 。

【0140】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 112 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 91 である。

40

【0141】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 112 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 94 である。

【0142】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 112 であり、及び、第 1 の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 97 である。

50

【0143】

好ましくは、第1の抗原結合部分の第1の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 165、173又はその任意の変異体から選ばれ、及び／又は、第1の抗原結合部分の第1の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 163、171又はその任意の変異体から選ばれる。

【0144】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 165であり、及び、第1の抗原結合部分の第1の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 163である。

【0145】

いくつかの好ましい実施形態において、第1の抗原結合部分の第1の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 173であり、及び、第1の抗原結合部分の第1の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 171である。

【0146】

いくつかの実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 133、138、141、144、147、150、153、157、159、161又はその任意の変異体から選ばれ、及び／又は、第2の抗原結合部分の第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 114、119、121、125、127、130又はその任意の変異体から選ばれる。

【0147】

いくつかの好ましい実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 133であり、及び、第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 127である。

【0148】

いくつかの好ましい実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 157であり、及び、第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 114である。

【0149】

いくつかの好ましい実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 157であり、及び、第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 127である。

【0150】

いくつかの好ましい実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 159であり、及び、第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 114である。

【0151】

いくつかの好ましい実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 159であり、及び、第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 119である。

【0152】

いくつかの好ましい実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 159であり、及び、第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 121である。

【0153】

いくつかの好ましい実施形態において、第2の抗原結合部分の第2の重鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 159であり、及び、第2の軽鎖可変領域のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 127である。

【0154】

好ましくは、第2の抗原結合部分の第2の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列SEQ

10

20

30

40

50

Q I D N O : 1 6 9 又はその任意の変異体であり、及び／又は、第 2 の抗原結合部分の第 2 の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 7 又はその任意の変異体である。

【 0 1 5 5 】

いくつかの好ましい実施形態において、第 2 の抗原結合部分の第 2 の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 9 であり、及び、第 2 の抗原結合部分の第 2 の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 7 である。

【 0 1 5 6 】

一つの具体的な実施形態では、二重特異的抗体の第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 5 であり、及び、第 1 の抗原結合部分の第 1 の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 3 であり、第 2 の抗原結合部分の第 2 の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 9 であり、及び、第 2 の抗原結合部分の第 2 の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 7 である。

【 0 1 5 7 】

一つの具体的な実施形態では、二重特異的抗体の第 1 の抗原結合部分の第 1 の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 7 3 であり、及び、第 1 の抗原結合部分の第 1 の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 7 1 であり、第 2 の抗原結合部分の第 2 の重鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 9 であり、及び、第 2 の抗原結合部分の第 2 の軽鎖のコード核酸は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 6 7 である。

【 0 1 5 8 】

一の態様において、本開示は、前記核酸を含む、ベクターを提供する。

【 0 1 5 9 】

一の態様において、本開示は、前記核酸又はベクターを含む、細胞を提供する。

【 0 1 6 0 】

一の態様において、本開示は、前記二重特異的抗体又はその抗原結合部分、核酸、ベクター、及び／又は、細胞を含む、組成物を提供する。

【 0 1 6 1 】

一の態様において、本開示は、治療部分に共有結合する前記二重特異的抗体又はその抗原結合部分を含む、抗体-薬物コンジュゲートを提供する。

【 0 1 6 2 】

好ましくは、治療部分は、細胞毒性部分、化学療法剤、細胞因子、免疫抑制剤、免疫刺激剤、分解ペプチド又は放射性同位体から選ばれる。

【 0 1 6 3 】

本開示に係る抗体は、G P C 3 が不利に発現又は表現された様々疾患の治療又は診断ツールとして有用である。

G P C 3 関連疾患の一実施形態において、G P C 3 は、疾患組織や臓器の細胞における発現が、健康な組織や臓器中の状態より増加する。増加とは、10%以上、特に20%以上、50%以上、100%以上、200%以上、500%以上、1000%以上、10000%以上又はそれより多く増加する。一の実施形態において、発現は、疾患組織のみに見つかり、対応する健康な組織中の発現は、阻害される。本開示によれば、G P C 3 関連疾患は、腫瘍を含む。

【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態において、腫瘍は、がんである。いくつかの実施形態において、がんは、例えば、G P C 3 陽性肝臓がん、G P C 3 陽性肝細胞がん、G P C 陽性膵臓がん、G P C 陽性肺癌、G P C 陽性大腸がん、G P C 陽性乳がん、G P C 陽性前立腺がん、G P C 陽性白血病又は G P C 陽性リンパ腫などの G P C 3 陽性がんである。

【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態において、当該治療剤は、活化性 T 細胞抗原に特異的に結合する抗

体を含む。

【0166】

一の実施形態において、当該治療剤は、CD3、特にCD3εに特異的に結合する抗体を含む。

【0167】

本開示に係る二重特異性抗体を用いて疾患及び症状を治療する方法は、哺乳動物に治療有効量の前記のいずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片、又は核酸分子、又はペクター、又は細胞、又は薬物組成物を投与するステップを含む。

【0168】

いくつかの実施形態において、本開示において、患者に $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の血清レベルになるようにGPC3に結合できる抗体を投与することを含む、がん疾患を治療又は予防する方法を提供する。異なる実施形態において、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上又は $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の血清レベルになるように抗体を投与する。異なる実施形態において、 $800\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $700\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $600\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $550\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、又は、 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の血清レベルになるように抗体を投与する。一の実施形態において、提供される血清レベルは、 $40\mu\text{g}/\text{mL}\sim 700\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、好ましくは $40\mu\text{g}/\text{mL}\sim 600\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、好ましくは $50\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、例えば、 $150\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は、 $300\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ である。本明細書で使用される「血清レベル」という用語は、検討される物質の血清における濃度を意味する。一の実施形態において、7日以上又は14日以上の上清レベルを提供する。一の実施形態において、方法は、 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 以上、例えば、 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 以上、かつ、好ましくは $1500\text{mg}/\text{m}^2$ 以下、 $1200\text{mg}/\text{m}^2$ 以下、又は、 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ 以下の抗体用量を投与することを含む。

【0169】

いくつかの実施形態において、本開示は、患者に $300\text{mg}/\text{m}^2$ 以上、例えば、 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 以上、かつ、好ましくは $1500\text{mg}/\text{m}^2$ 以下、 $1200\text{mg}/\text{m}^2$ 以下、又は、 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ 以下の用量でGPC3に結合できる抗体を投与することを含む、がん疾患を治療又は予防する方法を提供する。

【0170】

いくつかの実施形態において、本開示は、患者にGPC3に結合できる抗体を投与することを含む、がん疾患を治療又は予防する方法であって、患者の50%以上、好ましくは60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上のがん細胞は、GPC3陽性であり、及び／又は、患者の40%以上、好ましくは50%以上又は60%以上のがん細胞は、GPC3の表面発現陽性である、がん疾患を治療又は予防する方法を提供する。この点で、本開示は、a. 50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上のGPC3陽性を示すがん細胞、及び／又は、40%以上、好ましくは、50%以上又は60%以上のGPC3の表面発現陽性であるがん細胞に罹る患者を同定すること、及び、b. 患者にGPC3に結合できる抗体を投与することを含む、がん疾患を治療又は予防する方法をさらに提供する。一の実施形態において、患者の95%以上又は98%以上のがん細胞は、GPC3陽性である。一の実施形態において、患者の70%以上、80%以上又は90%以上のがん細胞は、GPC3の表面発現陽性である。

【0171】

本発明のいずれかの態様に係る方法の一の実施形態において、がん疾患の治療結果は、病状の安定化を実現することである。一の実施形態において、病状の安定化は、2ヶ月以上、3ヶ月以上、又は、6ヶ月以上に達する。

【0172】

いくつかの実施形態において、本開示は、患者にGPC3に結合できる抗体を投与することを含む、がん患者の病状を安定化させる方法を提供する。一の実施形態において、病状の安定化は、2ヶ月以上、3ヶ月以上又は6ヶ月以上に達する。

【0173】

本明細書に記載のいずれかの態様に係る方法の一つの実施形態において、単一の用量又は複数の用量で抗体を投与する

【0174】

いくつかの実施形態において、本開示は、患者にGPC3に結合できる抗体を複数の用量で投与することを含む、がん疾患を治療又は予防する方法を提供する。

【0175】

本開示によれば、複数の用量で抗体を投与する場合、好ましくは、3回以上の用量、4回以上の用量、5回以上の用量、6回以上の用量、7回以上の用量、8回以上の用量、9回以上の用量、又は、10回以上の用量、かつ好ましくは30回以下の用量、25回以下の用量、20回以下の用量、15回以下の用量、又は、10回以下の用量で抗体を投与する。好ましくは、7日以上、10日以上、14日以上、又は、20日以上の間隔で前記抗体の用量を投与する。好ましくは、7～30日、10～20日、且つ好ましくは約14日の時間間隔で抗体の用量を投与する。

【0176】

一の実施形態において、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の血清レベルになるように抗体を投与する。異なる実施形態において、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、 $150\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、又は、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の血清レベルになるように抗体を投与する。異なる実施形態において、 $800\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、 $700\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、 $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、 $550\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、又は、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の血清レベルになるように抗体を投与する。一の実施形態において、提供される血清レベルは、 $40\mu\text{g}/\text{ml}\sim 700\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $40\mu\text{g}/\text{ml}\sim 600\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $50\mu\text{g}/\text{ml}\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば、 $150\mu\text{g}/\text{ml}\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は、 $300\mu\text{g}/\text{ml}\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ である。一の実施形態において、7日以上、又は、14日以上の間隔で提供される。一の実施形態において、方法は、 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 以上、例えば、 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 以上であり、かつ、好ましくは、 $1500\text{mg}/\text{m}^2$ 以下、 $1200\text{mg}/\text{m}^2$ 以下、又は、 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ 以下の抗体の用量で投与することを含む。

【0177】

哺乳動物のGPC3関連病症を治療するための薬物の調製における、前記のいずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片、又は核酸分子、又はベクター、又は細胞、又は薬物組成物の使用を提供する。

【0178】

前記いずれかの態様によれば、任意に、抗体は、他の薬物にコンジュゲートし、例えば、標識つき又は細胞毒性を有するコンジュゲートである。

【0179】

一の態様において、本開示は、例えば、本開示に係る抗体、その断片、ホモログ、その誘導体等、例えば、標識つき又は細胞毒性を有するコンジュゲート、及び、抗体取扱説明書、特定の種類の細胞を殺すコンジュゲートなどを含むキットをさらに含む。当該取扱説明書は、抗体、コンジュゲートなどのインビトロ、インビボ又はエキスピボでの使用ガイドを含んでもよい。抗体は、液体又は固体形態であってもよく、通常、凍結乾燥されている。当該キットは、さらに緩衝液、再構成溶液などの他の適当な試薬及び予定使用に応じて必要な他の成分を含んでもよい。所定の量でパッケージ化された試薬とそれらの治療使用又は診断アッセイ使用などの使用に用いる取扱説明書との組み合わせも考えられる。抗体が標識されている場合、例えば、酵素で標識されている場合、当該キットは、基質及び酵素に必要な補因子（例えば、検出可能な発色団又はフルオロフォアを提供する基質前駆体）を含んでもよい。さらに、安定剤、緩衝液（例えば、ブロッキング緩衝液又は溶解緩衝液）などの他の添加剤も含まれ得る。様々な試薬の相対量を変化させ、試薬溶液の濃縮物を提供することができ、これにより、ユーザーの柔軟性、スペースの節約、試薬の節約などを提供する。これらの試薬は、乾燥粉末の形で提供することもでき、通常、凍結乾燥

されたものとして提供され、賦形剤を含むため、溶解すると適切な濃度の試薬の溶液を提供することができる。

【0180】

前記いずれかの態様に係る抗体又はその機能的断片、又は核酸分子、又はベクター、又は細胞、又は薬物組成物、又はキットの、GPC3の結合を抑制するための試薬の調製における使用を提供する。

【0181】

また、本開示に係る抗体は、免疫測定、精製方法及び免疫グロブリン又はその断片を用いた他の方法に用いられてもよい。このような使用は、当業者が周知である。

【0182】

対応的に、本開示は、本開示に係る抗GPC3抗体又はその断片を含む組成物をさらに提供し、前記抗体は、薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤と都合よく組み合わせることができ、これは、本分野の公知手段である。

【0183】

本開示に使用される「薬物組成物」という用語は、さまざまな調製物の製剤を指す。治療有効量の多価抗体を含む製剤は、無菌液体溶液、液体懸濁液、又は、凍結乾燥形態であり、任意に安定剤又は賦形剤を含んでもよい。

【0184】

本開示に係る抗体は、単独で投与される組成物として使用してもよく、他の活性剤と併用してもよい。

いくつかの実施形態において、本開示に係るヒト化抗体は、治療部分（即ち、薬物）にコンジュゲートしている。治療部分は、例えば、細胞毒素、化学療法剤、サイトカイン、免疫抑制剤、免疫刺激剤、分解ペプチド又は放射性同位体であってもよい。このようなコンジュゲートは、本明細書に「抗体-薬物コンジュゲート」又は「ADC」とも呼ばれる。

【0185】

いくつかの実施形態において、抗体は、細胞毒性部分にコンジュゲートしている。細胞毒性部分は、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン（Cephaeline）、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、マイタンシン又はその類似体若しくは誘導体などのチューブリン阻害剤、モノメチルアウリスタチンE若しくはF又はその類似体若しくは誘導体などの有糸分裂阻害剤、ドラスタチン10若しくは15又はその類似体、イリノテカン又はその類似体、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD（actinomycin D）、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン（Puromycin）、カリケアミシン又はその類似体若しくは誘導体、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン又はクラドリビンなどの代謝拮抗剤、例えば、メクロレタミン、チオプリン（thiopurine）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンCなどのアルキル化剤、シスプラチン又はカルボプラチン等の白金系誘導体、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、ラケルマイシン（CC-1065）又はその類似体若しくは誘導体、アクチノマイシン、ブレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミスラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリマイシン（primycin）、アントラマイシン（AMC）などの抗生物質、ピロロ[2,1-c][1,4]-ベンゾジアゼピン（PDB）、ジフテリア毒素及びジフテリアA鎖及びその活性断片及びハイブリッド分子などの関連分子、リシンA又は脱グリコシル化リシンA鎖毒素、コレラ毒素などのリシン、SLTI、SLTII、SLTIIIなどのシガ様毒素、LT毒素、C3毒素、シガ毒素、百日咳毒素、破傷

10

20

30

40

50

風毒素、ボウマン・バーク大豆プロテアーゼ阻害剤、シュードモナス外毒素、アロリン、サポリン (Saporin)、モデシン (moderlin)、ゲラニン、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチンタンパク質、PAPI、PAPII及びPAP-Sなどのアメリカヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質、ツルレイシ (momordica charantia) 阻害剤、クルシン、クロチン (crotonin)、サポナリアコン (saponaria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン及びエノマイシン毒素、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、ブドウ球菌エンドトキシンA、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ジフテリア毒素、シュードモナスエンドトキシンから選ばれるものであってもよい。

10

【0186】

いくつかの実施形態において、抗体は、アウリスタチン又はそのペプチド類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。アウリスタチンは、微小管のダイナミクス、GTP加水分解並びに核分裂及び細胞分裂に影響し、抗がん活性及び抗真菌活性を有することが示された。例えば、アウリスタチンEは、p-アセチル安息香酸又はベンゾイル吉草酸と反応し、それぞれAEB、AEVBを生成することができる。他の典型的なアウリスタチン誘導体として、AFP、MAAF (モノメチルアウリスタチンF) 及びMAAE (モノメチルアウリスタチンE) を含む。好適なアウリスタチン、アウリスタチンの類似体、誘導体及びプロドラッグ、並びにアウリスタチンとAbとのコンジュゲートに好適なリンカーは、例えば、米国特許第5,635,483号、第5,780,588号、第6,214,345号及び国際特許出願公開WO2088172、WO2004010957、WO2005081711、WO2005084390、WO2006132670、WO03026577、WO200700860、WO207011968及びWO205082023に記載されている。

20

【0187】

いくつかの実施形態において、抗体は、ピロロ[2,1-c][1,4]-ベンゾジアゼピン (PDB)、そのペプチド類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。適切なPDB、PDB誘導体及び関連技術は、例えば、Hartley J. A. et al., Cancer Res 2010, 70 (17): 6849-6858、Antonow D. et al., Cancer J 2008, 14 (3): 154-169、Howard P. W. et al., Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 6463-6466、及び、Sagnouet al., Bioorg Med Chem Lett 2000; 10 (18): 2083-2086に記載されている。

30

【0188】

いくつかの実施形態において、抗体は、アントラサイクリン系抗生剤、メルタンシン、カリケアミシン、デュオカルマイシン、ラケルマイシン (CC-1065)、ドラスタチン10、ドラスタチン15、イリノテカン、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンF、PDB、又は、これらのいずれの類似体、誘導体又はプロドラッグから選ばれる細胞毒性部分にコンジュゲートする。

40

【0189】

いくつかの実施形態において、抗体は、アントラサイクリン系抗生剤又はその類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、メルタンシン又はその類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、カリケアミシン又はその類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、デュオカルマイシン又はその類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、ラケルマイシン (CC-1065) 又はその類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、ドラスタチン10又はその類似体、誘導体又はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態におい

50

て、抗体は、ドラスタチン15又はその類似体、誘導体或はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、モノメチルアウリスタチンE又はその類似体、誘導体或はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、モノメチルアウリスタチンF又はその類似体、誘導体或はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、ピロロ[2,1-c][1,4]-ベンゾジアゼピン又はその類似体、誘導体或はプロドラッグにコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、抗体は、イリノテカン又はその類似体、誘導体或はプロドラッグにコンジュゲートする。

【0190】

いくつかの実施形態において、抗体は、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム（ancestim）及びTNFa）にコンジュゲートする。

【0191】

いくつかの実施態様では、抗体を、放射性同位体又は放射性同位体を含むキレートにコンジュゲートする。例えば、抗体を、キレートリンカー（例えばDOTA、DTPA、又はチウキセタン）にコンジュゲートさせることができる。該抗体は、さらに、又は、代替的に、1つ以上の放射標識されたアミノ酸又は他の放射標識された分子を含むか又はこれにコンジュゲートさせ得る。放射性同位体の非限定的な例としては、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 及び ^{227}Th を含む。治療の目的のために、 β 又は α 粒子放射線を放出する放射性同位体、例えば、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{67}Cu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 及び ^{212}Pb を使用してもよい。

【0192】

分子を抗体にコンジュゲートする技術は、本分野でよく知られているものである。通常、核酸分子は、それぞれN-ヒドロキシスクシンイミドエステル又はマレイミド官能基を介して、抗体におけるリシン又はシステインに共有的に連結している。操作システインを用いるか、又は、非天然アミノ酸を組み込んだコンジュゲーション方法は、コンジュゲートの同一性を改善されることが報告されている。当業者は、特に、アシル供与体グルタミン含有タグ（例えば、Gln含有ペプチドタグ又はQタグ）又はポリペプチド操作（例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換又はポリペプチドの変異によるもの）によって反応性にした内在性グルタミンで操作したFc含有ポリペプチドが考えられよう。次いで、トランスグルタミナーゼがアミン供与剤（例えば、反応性アミンを含むか、これと結合した小分子）と共有結合により架橋し、アミン供与剤がアシル供与体グルタミン含有タグ又は接触可能な／露出した／反応性の内在性グルタミンを介してFc含有ポリペプチドと部位特異的にコンジュゲートした操作Fc含有ポリペプチドコンジュゲートの安定で均一な集団を形成し得る（WO2012059882）。

【0193】

前記実施形態に係る治療薬は、改善された移転、送達、耐性などを提供するために製剤に組み込まれる適切な薬学的に許容される担体、賦形剤及び他の試薬とともに投与されることが理解される。医薬品化学者らに知られている薬局方には、多数の適切な製剤が記載されており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences（第15版、Mack Publishing Company, Easton, Pa.（1975））、特にそのうちのBlaug、Seymourの第87章が挙げられる。これらの製剤として、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゲル、ワックス、油、脂質、脂質（カチオン又はアニオン）含有担体（例如、LipofectinTM）、DNAコンジュゲート、無水スラリー、水中油型及び油中水型エマルジョン、エマルジョンポリエチレングリコール（さまざまな分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、及びポリエチレングリコールを含む半固体混合物が挙げられる。前記混合物は、いずれも製剤

における有効成分が製剤に不活化されず、生理学的適合性があり、投与経路に耐えるという条件で、本発明に係る治療又は治療方法に適用される。

【0194】

一の実施形態において、抗体は、治療薬として使用することができる。このような薬剤は、通常、被験者の異常なGPC3の発現、活性、及び／又はシグナル伝達に関連する疾患又は病状を治療、寛解、及び／又は予防するために使用される。治療レジメンは、標準的な方法で、被験者、例えば、異常なGPC3発現、活性、及び／又はシグナル伝達に関連する疾患又は障害、例えば、GPC3関連障害（又は、リスクがあるが、若しくは発症している）に罹るヒト患者を特定することで実施することができる。抗体製剤、好ましくは標的抗原に対して高い特異性及び高い親和性を有する抗体製剤を被験者に投与し、かつ、一般に、標的への結合によって効果を生じる。投与された抗体は、標的（例えば、GPC3）の発現、活性、及び／又はシグナル伝達機能を解消するか、阻害するか、又は妨害する可能性がある。投与された抗体は、標的（例えば、GPC3）と自然的にそれに結合する内因性リガンドとの結合を解消するか、阻害するか、又は妨害する可能性がある。例えば、抗体は、標的に結合し、GPC3の発現、活性、及び／又はシグナル伝達を調節、阻害、抑制、低下、拮抗、中和、及び／又はその他の方式で妨害する。いくつかの実施形態において、異常なGPC3発現に関連する疾患又は障害を治療するために、重鎖及び軽鎖CDRを有する抗体を被験者に投与することができる。

10

【0195】

別の実施形態において、GPC3に対する抗体は、当分野で知られているGPC3のローカリゼーション及び／又は定量化に関連する方法に用いられる（例えば、適切な生体試料におけるGPC3及び／又はGPC3のレベルの決定、診断方法、タンパク質イメージングなどに用いられる）。特定の実施形態において、GPC3又はその誘導體、断片、類似体又は同族体に特異的な、抗体に由来する抗原結合ドメインを含む抗体は、薬学的に活性な化合物（以下、「治療薬」と呼ばれる）として使用される。

20

【0196】

別の実施形態において、免疫アフィニティー、クロマトグラフィー又は免疫沈降などの標準的な技術により、GPC3に特異的な抗体を使用し、GPC3ポリペプチドを単離し得る。GPC3タンパク質に対する抗体（又はその断片）は、生体試料におけるタンパク質を検出することに用いられる。いくつかの実施形態において、例えば、特定の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験手順の一部として生体試料におけるGPC3を検出する。抗体を検出可能な物質にコンジュゲートする（即ち、物理的に結合する）ことは、検出に有利である。検出可能な物質として、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料が挙げられる。適切な酵素の例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼを含み、適切な補欠分子族複合体の例として、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンを含み、適切な蛍光物質の例として、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オシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン、塩化ダンシルアミド、又は、フィコエリトリンを含み、発光材料の例として、ルミノールを含み、生物発光材料の例として、ルシフェラーゼ、フルオレセイン及びイクオリンを含み、適切な放射性材料の例として、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、又は ^3H を含む。

30

40

【0197】

別の実施形態において、本開示に係る抗体は、試料におけるGPC3又はそのタンパク質断片の存在を検出するための試薬として使用することができる。いくつかの実施形態において、抗体は、検出可能な標識を含む。抗体は、ポリクローナル抗体、又は、より好ましくはモノクローナル抗体である。インタクトな抗体又はその断片（例えば、Fab、scFv又はF(ab')₂）を使用する。抗体に関する「標識」という用語は、検出可能な物質を抗体にコンジュゲートする（即ち、物理的に結合する）ことで当該抗体を直接に標識し、及び、直接に標識された別の試薬との反応によって当該抗体を間接に標識すること

50

を含む。間接に標識する例として、蛍光で標識された二次抗体による一次抗体の検出、及び、蛍光で標識されたストレプトアビジンによる検出を可能にするためのビオチンによる抗体の末端標識が挙げられる。「生体試料」という用語は、被験者から単離された組織、細胞、及び生体流体、並びに被験者の体内に存在する組織、細胞、及び流体を含むことを意図している。従って、「生体試料」という用語は、血清、血漿、又はリンパ液を含む、血液及び血液中の画分又は成分を含む。言い換えれば、前記実施形態に係る検出方法は、インビトロ及びインビボで、生体試料における分析物であるmRNA、タンパク質、又はゲノムDNAの検出に用いられる。例えば、分析物であるmRNAのインビトロ検出技術は、ノーザンハイブリダイゼーション及びインサイチュハイブリダイゼーションを含む。分析物であるタンパク質のインビトロ検出技術として、酵素結合免疫吸着試験（ELISA）10、ウエスタンブロットティング、免疫沈降、及び免疫蛍光を含む。分析物であるゲノムDNAのインビトロ検出技術は、サザンハイブリダイゼーションを含む。イムノアッセイの実施手順は、例えば、「ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology」, 第42巻, J. R. Crothier (編集) Human Press, Totowa, N. J., 1995、「Immunoassay」, E. Diamandis & T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1996、及び、「Practice and Theory of Enzyme Immunoassays」, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985に記載されている。また、検体としてのタンパク質のインビボ検出技術は、標識された抗検体タンパク質抗体を被験者に導入することを含む。例えば、抗体を放射性標識で標識し、そして、被験者インビボの当該放射性標識の存在及び位置を、標準的な画像技術によって検出する。20

【0198】

本明細書に記載の抗体及びその誘導体、断片、アナログ及び同族体は、投与に適した医薬組成物に組み込むことができる。そのような組成物の調製に関わる原理、考慮事項、及び、組成成分を選択するためのガイドラインは、当分野で周知である。

【0199】

このような組成物は、通常、抗体及び薬学的に許容される担体を含む。抗体の断片を用いる場合、好ましくは、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小限の抑制断片である。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学合成及び／又は組換えDNA技術により産生することができる（例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照）。30

【0200】

本明細書に使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、医薬品投与に許容される任意及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含むことを意図している。適切な薬学的に許容される担体は、最新版の Remington's Pharmaceutical Sciencesに記載されており、これは、当分野の標準の参考書誌であり、参照により本明細書に組み込まれる。このような担体又は希釈剤の好ましい例として、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リポソーム及び固定化油などの非水性ベクターも使用することができる。このような媒体及び試薬を薬学的に活性な物質に使用することは、当分野で周知されているものである。抗体と相容しない通常の培地又は試薬以外、組成物におけるその使用が想定されている。40

【0201】

前記実施形態の薬物組成物を、それらの意図された投与経路に適合するように調製される。投与経路の例として、例えば、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（即ち、局所）、経粘膜、及び直腸投与を含む。非経口、皮内又は皮下投

与用溶液又は懸濁液として、注射用無菌希釈剤、例えば、水、塩溶液、固定油、ポリエチレングリコール系、グリセロール、プロピレングリコール又は他の合成溶媒、抗菌剤、例えば、ベンジルアルコール又はp-ヒドロキシ安息香酸メチル、抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム、キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、緩衝液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩、及び浸透圧調節剤、例えば、塩化ナトリウム又はデキストロースを含む。pHは、酸又は塩基、例えば、塩酸や水酸化ナトリウムで調整できる。非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器、ガラス又はプラスチック製の複数回投与用バイアルに包装することができる。

【0202】

注射使用に適する薬物組成物として、無菌水性溶液（ここで、水溶性である）又は分散体、及び無菌の注射液又は分散体を即時調製するための無菌粉末を含む。静脈内投与に適する薬学的に許容される担体として、生理食塩水、無菌水、Cremophor EL™（BASF, Parsippany, N. J.）又は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。すべての場合において、組成物は、無菌でなければならず、注射しやすい流動性を有しなければならない。また、調製及び保管の条件で安定している必要があり、細菌や真菌などの微生物の汚染作用を防止できる必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど）を含む溶媒又は分散媒体、及び、それらの適切な混合物であってもよい。コーティング、例えば、レシチンを利用し、分散体の場合に所望の粒子サイズを維持し、また、界面活性剤を利用し、適切な流動性を維持することができる。微生物作用の防止は、パラオキシ安息香酸エステル、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの様々な抗菌剤及び抗真菌剤により達成することができる。多くの場合、糖、ポリオール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含むことが好ましい。注射用組成物の吸収の延長は、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンなどの吸収を遅らせる試薬を組成物に含むことで達成できる。

【0203】

必要に応じて、抗体を必要な量で上記に挙げられた成分の1種又は組み合わせ（必要に応じて）の適切な溶媒に組み込むことで無菌注射液を調製し、そしてフィルターして消毒する。通常、抗体を、塩基性分散媒体及び上記に挙げられたものからの他の必要成分を含む無菌担体に組み込むことで分散体を調製する。無菌注射液を調製するための無菌粉末について、調製方法として、前記成分の無菌濾過溶液からの、活性成分及び任意の追加の所望の成分を含む、粉末の真空乾燥及び凍結乾燥を得る。

【0204】

吸入投与について、推進薬、例えば、二酸化炭素等のガスを適切に供給する加圧容器又は分配器又は噴霧器より、エアロゾル噴霧形式で化合物を送達する。

【0205】

また、経粘膜的又は経皮的手段により全身投与をすることであってもよい。経粘膜又は経皮投与について、製剤にバリアを透過することに適する浸透剤を使用する。このような浸透剤は、当分野で周知されており、例えば、経粘膜投与用洗剤、胆汁酸塩、フシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、点鼻薬又は坐剤を使用することで達成できる。経皮投与について、1つ又は複数の抗体を、当技術分野で周知されているペースト、軟膏、ゲル、又はクリームに調製することができる。

【0206】

化合物は、さらに、（例えば、カカオバター又は他のグリセリドなどの従来の坐剤ベースを有する）坐剤又は保持型浣腸剤の形態で調製し直腸送達することができる。

【0207】

一の実施形態において、前記抗体は、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムを含む徐放性／制御放出製剤など、身体に急速に排泄されないことを防ぐ担体を用いて調製することができる。生分解する可能な、生体適合性を有するポリマーとして、例えば、エチレン-酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエス

テル、及びポリ乳酸を使用することができる。このような製剤を調製するための方法は、当業者にとって自明である。

【0208】

投与の容易性及び用量の均一性のために、単位剤形で非経口組成物を調製ことは特に有利である。本明細書で使用される単位剤形とは、治療される被験者の単回用量に適する物理的に分離されている単位を指し、各単位は、必要な薬学的担体と組み合わせて所望の治療効果を生じるように計算された特定量の1種又は複数種の前記抗体を含む。前記実施形態の単位剤形の仕様は、抗体の固有の特性及び達成しようとする具体的な治療効果、並びに個体を治療するためのこのような抗体の調製技術に固有の制限に決定され、かつそれに直接的に依存される。

10

【0209】

前記薬物組成物は、投与取扱説明書とともに容器、パック、又はディスペンサーに入れてもよい。

【0210】

本明細書に係る製剤は、治療しようとする具体的な状態に応じて1種を超える前記抗体、好ましくは相補的活性を有するが互いに悪影響を及ぼさない抗体をさらに含んでもよい。また、又は、これ以外、組成物は、組成物の機能を増強する試薬、例えば、細胞毒素、サイトカイン、化学療法剤、又は成長抑制剤を含んでもよい。このような分子は、意図された目的に有効量で適切に組み合わせて存在し得る。例えば、キットに組み合わせて存在してもよく、使用時に組み合わせて存在してもよい。

20

【0211】

一の実施形態において、1種又は複数種の前記抗体は、併用療法で、即ち、他の試薬、例えば、治療薬（病理的状态又は障害を治療するための、例えば、様々な形態のがん、自己免疫障害及び炎症性疾患）と併用する。本明細書で使用される「併用」という用語は、実質的に同時に、同時に、又は順に試薬を投与することを指す。順に投与すると、好ましくは、第2化合物の投与を開始する時、2つの化合物における第1化合物が依然として治療部位で有効濃度で検出することができる。ある場合、「併用」は、キットに本開示に係る抗体及び他の治療薬を同時に含んでもよい。

【0212】

例えば、併用治療は、本開示に係る1種又は複数種の抗体と1種又は複数種の追加の治療剤（例えば、1種又は複数種のサイトカイン及び成長因子阻害剤、免疫抑制剤、炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤及び／又は細胞毒素又は細胞増殖阻害剤、以下でより詳しく説明する。）との同時調製及び／又は同時投与を含む。このような併用療法は、投与された治療剤を低い投与用量で利用することができるため、様々な単一療法に関連する可能な毒性又は合併症を回避することができる。

30

【0213】

一の実施形態において、抗GPC3抗体の投与及び治療剤の投与は、当該被験者のB細胞の数を低減することができる。

【0214】

一の実施形態において、当該治療レジメンは、対応する抗GPC3抗体を投与しない治療レジメンに比べて、当該被験者の当該T細胞活性化治療剤の投与に関するサイトカイン放出を効果的に低下させることができる。

40

【0215】

明確かつ簡潔に説明するために、技術特徴を同じ又は別個の実施形態の一部として本明細書に記載されているが、本発明の範囲は、説明されるすべて又はいくつかの特徴の組み合わせでなる実施形態を含んでもよいと理解される。

実施例

【0216】

実施例1：抗原発現及び安定トランスフェクト細胞の構築

ヒトGPC3 (Sino biological, HG10088) を鋳型とし、ヒト

50

G P C 3 細胞外領域 (2 5 - 5 6 3) を増幅し、H E K 2 9 3 E 細胞にトランスフェクトし、発現されてヒト G P C 3 組換えタンパク質 (S E Q I D N O . 1) が得られ、又は、膜近位領域配列 (a a 5 2 4 - 5 6 3) を G i b s o n a s s e m b l y 法で p G E X 3 X ベクター E c o R I サイトに挿入し、プラスミドを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) にトランスフェクトし、I P T G により発現を誘導し、精製して G S T - ヒト G P C 3 s t e m 組換えタンパク質 (S E Q I D N O . 2) が得られた。同様な方法で発現して G S T - カニクイザル G P C 3 s t e m 組換えタンパク質 (S E Q I D N O . 3) 及び G S T - マウス G P C 3 s t e m 組換えタンパク質 (S E Q I D N O . 4) が得られた。図 1 は、G P C 3 組換えタンパク質の非還元 S D S - P A G E 結果を示した。

【 0 2 1 7 】

ヒト及びアカゲザルの G P C 3 全長配列を含む L e n t i ベクター及びパッケージプラスミド (G e n e c o e p i a) を H E K 2 9 3 T 細胞にコトランスフェクトし、トランスフェクションから 4 8 時間後、偽ウイルスを含む培養上清を収集し、10 μ L を取り、1 $\times$ 10⁶ C H O 細胞に感染させ、ピュロマイシン (p u r o m y c i n) を加え、抗性スクリーニングを行い、最終的にヒト又はサル G P C 3 を高いレベルで発現した安定トランスフェクト細胞 C H O - h G P C 3 (クローン 2 B 1 0) 及び C H O - c y n o G P C 3 (クローン 4 D 6) を単離した。図 2 は、G P C 3 安定トランスフェクト細胞のフローサイトメトリー検出結果を示した。

【 0 2 1 8 】

ヒト又はサル C D 3 ϵ γ ヘテロ二量体の構築：ヒト C D 3 γ (U n i P r o t P 0 9 6 9 3 , G l n 2 3 - A s n 1 1 6) 及び C D 3 ϵ (U n i P r o t P 0 7 7 6 6 , G l n 2 3 - A s p 1 2 6) 細胞外領域ヌクレオチド配列を合成し、C 末端をそれぞれヒト I g G F c h o l e 又は F c k n o b に融合させ、発現させて形成されたヒト C D 3 ϵ γ - F c ヘテロ二量体 (ヒト C D 3 γ I g G F c (h o l e) のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 5 に示し、ヒト C D 3 ϵ I g G F c (k n o b) のアミノ酸配列は、S E Q I D N O . 6 に示し、これと同様にしてカニクイザル C D 3 γ (U n i P r o t Q 9 5 L I 7 , G l n 2 3 - A s n 1 1 0) 及び C D 3 ϵ (U n i P r o t Q 9 5 L I 5 , G l n 2 2 - A s p 1 1 7) を合成し、C 末端をカニクイザル I g G F c h o l e 又は F c k n o b に融合させ、発現させて形成されたカニクイザル C D 3 ϵ γ - F c ヘテロ二量体 (カニクイザル C D 3 γ I g G F c (h o l e) のアミノ酸配列は、S E Q I D N O . 7 に示した。カニクイザル C D 3 γ I g G F c (k n o b) のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 8 に示した。C D 3 γ - F c と C D 3 ϵ - F c を発現する組換えプラスミドを P E I (P o l y s c i e n c e s , # 2 4 7 6 5 - 2) 3 m g / m L と混合し、H E K 2 9 3 E 細胞 (培地 O P M - 2 9 3 C D 0 3 D P M) にコトランスフェクトにし、37℃、120 rpm、5% C O ₂ で 7 日培養した後、培地上清液を集め、P r o t e i n A アフィニティークロマトグラフィーにより精製して、ヒト又はカニクイザル C D 3 ϵ γ - F c 組換えタンパク質が得られ、S D S - P A G E 純度は、95%を超えた (図 3) 。

【 0 2 1 9 】

実施例 2、動物免疫及び G P C 3 抗体の製造

1、G P C 3 抗体スクリーニング

4 ~ 6 週齢の B a l b / C メスマウスを選択し、ヒト G P C 3 細胞外領域全長又は膜近位領域配列 (a a 5 2 4 - 5 6 3) を用い、一過性発現プラスミドを構築し、遺伝子銃を用い、マウスに対して DNA 免疫を行い、毎回プラスミド / マウス 20 μ g を免疫し、週に 1 回、合計 8 回免疫した後、血清力価を検出し、C H O - h G P C 3 安定トランスフェクト細胞 (5 $\times$ 10⁶ 細胞 / 匹) を用いてブースター免疫を行った。3 日後、マウスを頸椎脱臼により 殺し、マウス脾臓および末梢リンパ節を収集し、研磨し、遠心分離して収集した後、全 RNA を抽出し、逆転写した後、軽重鎖の特異的プライマーをそれぞれ利用して P C R 増幅を行い、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域 c D N A ライブラリーが得られた。ファージ抗体ライブラリーディスプレイ技術で繊維状ファージ M 1 3 に基づく G P C 3

10

20

30

40

50

免疫ライブラリーを、その後のファージパニングに用いるために構築した。

【0220】

古典的なパニング法を採用し、イムノチューブ（Immuno tube）にヒトGPC3組換えタンパク質をコーティングし、GPC3ファージ免疫ライブラリー1mLを添加し、インキュベート及びパニングを行って高親和力を表示するFabのファージを溶出し、TG1細菌に感染させ、次のパニングのために、再びファージを調製した。パニングスクリーニングを2回繰り返した後、単クローンをUタイプ96ウェルプレートに接種し、IPTG誘導発現を行い、培養上清を取り、ELISA検出を行い、合計323個のヒトGPC3細胞外領域膜近位領域を認識する陽性クローンが得られた。

【0221】

シーケンシングによりクローンの一部を選択し、軽鎖、重鎖の遺伝子をそれぞれ抗体軽鎖定常領域又はヒトIgG1重鎖定常領域CH1-CH3を含む真核発現ベクターにクローリングし、HEK293E細胞にコトランスフェクトし、37℃、120rpm、5%CO₂で5～6日培養した後、培地上清液を収集し、Protein Aクロマトグラフィーカラムにより精製してIgG抗GPC3キメラ抗体が得られた。文献Nakano Kら（2009）を参照し、対照抗体GC33を合成し、ヒトIgG1キメラ抗体（GC33と略称される）に発現された。

【0222】

GPC3抗体可変領域配列は、以下の通りであった。

【表1】

表1、GPC3マウス由来抗体の可変領域配列

GPC3 由来抗体	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR		LCDR1	LCDR2	LCDR3
	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列
5D6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
29A10	19	20	11	21	13	22	23	16	17	18
34H1	9	10	11	12	13	24	25	16	17	26
19F1	9	10	11	12	13	27	28	16	17	29
30B7	30	31	32	33	13	34	35	16	17	18
28G4	19	20	11	21	13	36	37	38	17	39
30A4	40	41	11	21	13	42	43	16	17	18
38D2	9	10	11	12	13	44	45	46	47	48
39G4	9	10	11	12	13	49	50	16	17	51
41F1	9	10	11	12	13	52	53	16	17	54
41H1	9	10	11	12	13	55	56	16	17	57
49G8	9	10	11	12	13	58	59	60	17	61
46C3	62	63	64	65	66	67	68	16	17	69
42A1	70	71	11	72	73	74	75	16	17	76
47B6	77	78	79	80	81	82	83	16	17	69

【0223】

5D6

重鎖VHのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 9に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 10に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 11、12、13に示した。

【化1】

```

<-----FR1-----> CDR1 <----FR2----> CDR2 <----->
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTTA
-----FR3-----> CDR3 <----FR4---->
YMESSSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLTVTVSA

```

核酸配列

10

20

30

40

50

【化 2】

CAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTTCGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0224】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 14 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 15 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、18 に示した。

【化 3】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY~~LH~~HWYLQKPGQSPKLLIYK~~VSNRFS~~GV~~PD~~RFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
ISRVEAEDLG~~VYFC~~SQSTHVPLTFGAGTKLELK

核酸配列

【化 4】

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGTCACAGTAATGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGCTCACGTTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAA

【0225】

29A10

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 19 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 20 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、21、13 に示した。

【化 5】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYE~~I~~H~~W~~V~~K~~QTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQ~~T~~FKGKATLTADKSSTTA
-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
YME~~L~~SSLTSEDSAVYYCTRY~~YSFAY~~WGQGLVTVSA

核酸配列

【化 6】

GAGGTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0226】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 22 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 23 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、18 に示した。

【化 7】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY~~LH~~HWYLQKPGQSPKLLIYK~~VSNRFS~~GV~~PD~~RFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
ISRVEAEDLG~~VYFC~~SQSTHVPLTFGAGTKLEIK

核酸配列

10

20

30

40

50

【化 8】

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGACACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAACCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGCTCACGTTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAAAT
AAAA

【0 2 2 7】

3 4 H 1

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 9 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 10 に示し、その HCDR1、HCDR2 及び HCDR3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、12、13 に示した。

10

【化 9】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTTA
YMEISSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSA

核酸配列

【化 10】

CAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTTCGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

20

【0 2 2 8】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 24 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 25 に示し、その LCDR1、LCDR2 及び LCDR3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、26 に示した。

【化 11】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
DVVMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLVKPGQSPKLLIYKVSNRFSQVDPDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLGVFYFCQSIIHVPLTFGAGTKLELK

30

核酸配列

【化 12】

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAG
CCTTGACACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAACCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTATACATGTTCCGCTCACGTTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAA

【0 2 2 9】

1 9 F 1

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 9 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 10 に示し、その HCDR1、HCDR2 及び HCDR3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、12、13 に示した。

40

【化 13】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTTA
YMEISSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSA

核酸配列

50

【化 1 4】

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTTCGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0 2 3 0】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 27 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 28 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、29 に示した。

【化 1 5】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
DVLMTQTPLSLPVS LGDQASIS RSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <---FR4--->
ISRVEAEDLG VYFC SQSTHIPTFGGGTKLELK

10

核酸配列

【化 1 6】

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAG
CCTTGACACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATATTCACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGCTGAA
A

20

【0 2 3 1】

3 0 B 7

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 30 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 31 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 32、33、13 に示した。

【化 1 7】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
QVQLQSGAELVRPGASVRLSCKALGYTF TDYEMHWVKQTPVHGLEWIG AIHPGSGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTA
-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
YMEISSLTSEDSAVYYCTRY YYSFAYWGQGLTVTVSA

30

核酸配列

【化 1 8】

CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAGGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0 2 3 2】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 34 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 35 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、18 に示した。

40

【化 1 9】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
DVLMTQTPLSLPVS LGDQASIS RSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <---FR4--->
ISRVEAEDLG VYFC SQSTHVPLTFGAGTKLEIK

核酸配列

50

【化 2 0】

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTACATTTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGAAAT
CAAA

【 0 2 3 3】

2 8 G 4

重鎖 V H のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 9 に示し、そのコード核酸を S E Q
I D N O . 2 0 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q
I D N O . 1 1、2 1、1 3 に示した。

10

【化 2 1】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFKGKATLTADKSSTTA
-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
YMESSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSA

核酸配列

【化 2 2】

GAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

20

【 0 2 3 4】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 3 6 に示し、そのコード核酸を S E Q
I D N O . 3 7 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ S E Q
I D N O . 3 8、1 7、3 9 に示した。

【化 2 3】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
DVLMTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSIVHSNGNTYLQWYLYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
--FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
ISRVEAEDLGYYCFQGSHPVPTTFGGGTKLEIK

30

核酸配列

【化 2 4】

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTACAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGAAAT
AAAA

【 0 2 3 5】

3 0 A 4

重鎖 V H のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 4 0 に示し、そのコード核酸を S E Q
I D N O . 4 1 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q
I D N O . 1 1、2 1、1 3 に示した。

40

【化 2 5】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYAFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFKGKATLTADKSSTTA
-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
YMESSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSA

核酸配列

50

【化 2 6】

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGGCTACGC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0 2 3 6】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 42 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 43 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、18 に示した。

【化 2 7】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <---FR4--->
ISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPLTFGAGTKLELK

10

核酸配列

【化 2 8】

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGATACAGTAATGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAA

20

【0 2 3 7】

3 8 D 2

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 9 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 10 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、12、13 に示した。

【化 2 9】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTA
-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
YMESSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSA

30

核酸配列

【化 3 0】

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTTCAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0 2 3 8】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 44 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 45 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 46、47、48 に示した。

40

【化 3 1】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <---FR4--->
ISRVEAEDLGVIYFCLQVTHVPYTFGGGTKLEIK

核酸配列

50

【化 3 2】

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAG
CCTTGAAAACAGTAATGGAACACCTATTTGAACTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGGG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCTAGACAGGTTGAGTGGTAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATTTGGGAGTTATTCTGCCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAT
AAAA

【 0 2 3 9】

3 9 G 4

重鎖 V H のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 9 に示し、そのコード核酸を S E Q I
D N O . 1 0 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q I
D N O . 1 1、1 2、1 3 に示した。

10

【化 3 3】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTTA
-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
YMESSSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSA

核酸配列

【化 3 4】

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

20

【 0 2 4 0】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 4 9 に示し、そのコード核酸を S E Q
I D N O . 5 0 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ S E Q
I D N O . 1 6、1 7、5 1 に示した。

【化 3 5】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
DVVVTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
ISRVEAEDLGVFCSQSTHVPTFGGGTKLEIK

30

核酸配列

【化 3 6】

GATGTTGTGGTGACTCAAACCTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGACACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGACGTTCCGTTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAA
A

【 0 2 4 1】

4 1 F 1

重鎖 V H のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 9 に示し、そのコード核酸を S E Q I
D N O . 1 0 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q I
D N O . 1 1、1 2、1 3 に示した。

40

【化 3 7】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTTA
-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
YMESSSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSA

核酸配列

50

【化 3 8】

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTTCGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0 2 4 2】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 52 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 53 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、54 に示した。

【化 3 9】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <---FR4--->
ISRVEAEDLG VYFC SQNTHVPLT FGAGTKLELK

核酸配列

【化 4 0】

GATGTTTGTATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGTCACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAATACACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAA

【0 2 4 3】

4 1 H 1

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 9 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 10 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、12、13 に示した。

【化 4 1】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTTA
-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
YMEISSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLTVTSA

核酸配列

【化 4 2】

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTTCGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0 2 4 4】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 55 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 56 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、57 に示した。

【化 4 3】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLR
--FR3-----> CDR3 <---FR4--->
ISRVEAEDLG VYFC SQSTRVPLT FGAGTKLELK

核酸配列

【化 4 4】

GATGTTGTATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGTCACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACGTGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAA

10

20

30

40

50

【0245】

49G8

重鎖VHのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 9に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 10に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 11、12、13に示した。

【化45】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYNQTFEGKATLTADKSSTTA
YMESSLTSEDSAVYYCTRYYSFAYWGQGLTVTVSA

核酸配列

【化46】

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAATCAGACGTTCGAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTATTCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【0246】

軽鎖VKのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 58に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 59に示し、そのLCDR1、LCDR2及びLCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 60、17、61に示した。

【化47】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
DVVMTQTPLSLPVSLGDAQISCSRSSQSIHVHNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLGVIYFCQLQVTHVPLTFGAGTKLELK

核酸配列

【化48】

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAG
CATTGTACATAGTAATGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCCTCCAAGTTACACATGTCCCGCTCAGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAA

【0247】

46C3

重鎖VHのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 62に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 63に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 64、65、66に示した。

【化49】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
QVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYTFDYYIHWVKQKPGGLEWIGWIYPGSGNTRYNEKFKGKATLTVDTSSTA
YMQLSLTSSEDTAVYFCARGRWGQGLTVTVSA

核酸配列

【化50】

CAGGTCCAGTTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAC
CTTCACTGACTACTATATAAACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAAGCG
GTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTC
AGCAGCCTGACATCCGAGGACACTGCTGTCTATTCTGTGCAAGGGGGCGCTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGC
A

【0248】

軽鎖VKのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 67に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 68に示し、そのLCDR1、LCDR2及びLCDR3をそれぞれSEQ

10

20

30

40

50

ＩＤ ＮＯ．１６、１７、６９に示した。

【化５１】

```
<-----FR1----->          CDR1          <-----FR2----->  CDR2  <----->
DVVMTQTPLSLPVLSDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3----->          CDR3  <---FR4--->
ISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPRTFGGGTKLELK
```

核酸配列

【化５２】

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTCTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCTGAGGAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGCT
GAAA

10

【０２４９】

４２Ａ１

重鎖ＶＨのアミノ酸配列をSEQ ID NO．７０に示し、そのコード核酸をSEQ
ID NO．７１に示し、そのHCDR１、HCDR２及びHCDR３をそれぞれSEQ
ID NO．１１、７２、７３に示した。

【化５３】

```
<-----FR1----->          CDR1          <-----FR2----->          CDR2          <----->
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFADYEIHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGGTAYSQTFFKGKATLTADKSSTTA
-----FR3----->          CDR3  <---FR4--->
YMEISSLTSEDSAVYYCTRYFSFAYWGQGLTVTVSA
```

20

核酸配列

【化５４】

CAGGTTCTGAGTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCTGAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTGGGCTACAC
ATTTGCTGACTATGAAATACACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTCATCCAGGAAGTG
GTGGTACTGCCTACAGTCAGACGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACACAGCCTACATGGAGCTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATACTTTCTTTGCTTACTGGGGCCCAAGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGCA

【０２５０】

軽鎖ＶＫのアミノ酸配列をSEQ ID NO．７４に示し、そのコード核酸をSEQ
ID NO．７５に示し、そのLCDR１、LCDR２及びLCDR３をそれぞれSEQ
ID NO．１６、１７、７６に示した。

30

【化５５】

```
<-----FR1----->          CDR1          <-----FR2----->  CDR2  <----->
DVVVTQTPLSLPVLSDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3----->          CDR3  <---FR4--->
ISRVEAEDLGVIYFCSQSTHAPYTFGGGTRLEIK
```

核酸配列

【化５６】

GATGTTGTGGTGACTCAAACCTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTCTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCTGAGGAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGCTCCGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCAGACTGGAAAT
AAAA

40

【０２５１】

４７Ｂ６

重鎖ＶＨのアミノ酸配列をSEQ ID NO．７７に示し、そのコード核酸をSEQ
ID NO．７８に示し、そのHCDR１、HCDR２及びHCDR３をそれぞれSEQ
ID NO．７９、８０、８１に示した。

50

【化 5 7】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
QVQLQQSGAELMKPGASVKISKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTA
-----FR3----->CDR3<-----FR4----->
YMQQLSSLTSEDSAVYYCARGYWGQGTILVTVSA

核酸配列

【化 5 8】

CAGGTTTCAGCTGCAACAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACAC
ATTTCAGTAGCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAAGTG
GTAGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCTGTCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTC
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCGAGGGGTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
A

10

【0 2 5 2】

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 82 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 83 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 16、17、69 に示した。

【化 5 9】

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2 <----->
DIVMTQAPLSLPVSLGDAQISCRSSQSLVHNSNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLK
--FR3-----> CDR3 <-----FR4----->
ISRVEAEDLGVIYFCQSSTHVPRTFGGGTKLEIK

20

核酸配列

【化 6 0】

GATATTGTGATGACGCAGGCTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAG
CCTTGACACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAG
TTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAT
CAAA

【0 2 5 3】

FACS で前記抗体のヒト G P C 3 安定トランスフェクト細胞への結合を検出した。対数増殖期にある実施例 1 で製造された CHO-ヒト G P C 3 安定トランスフェクト細胞を取り、4%ウシ血清 (Hyclone, SH30626.06) で細胞を 5×10^5 細胞 / ml に調整し、細胞懸濁液 100 μ l / ウェルを U 型 96 ウェルプレートに添加し、300 g で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、各ウェルに勾配希釈抗体 (初期濃度 200 nM、3 倍希釈、12 つの勾配) 100 μ l を添加し、4℃で 45 分間インキュベートした。二次抗体として Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ヒト IgG Fc (1:300 希釈) 50 μ l / ウェルを添加し、氷上で 45 分間インキュベートし、フローサイトメトリーにより検出した。図 4 は、フローサイトメトリーによりキメラ抗体及びヒト G P C 3-CHO 安定トランスフェクト細胞を検出した結果を示した。

30

【0 2 5 4】

B L I バイオフィルム干渉技術 (Octet) で被検抗体をプロテイン A プローブに捕捉させ、ヒト G P C 3 タンパク質 (初期濃度 10 μ g / ml、2 倍の勾配、合計 5 つの濃度点) への結合能力を検出し、結合速率及び解離速率に基づいて親和定数 K D を求めた。

40

【0 2 5 5】

FACS 及び Octet による検出結果を合わせて、細胞膜の G P C 3 受容体を高親和力で認識すると共に、G P C 3 組換えタンパク質に結合した合計 15 個の陽性モノクローナル抗体が得られた。表 2 は、ヒト G P C 3 に対するモノクローナル抗体の親和定数を示した。

50

【表 2】

表 2、モノクローナル抗体のヒト G P C 3 への結合活性

抗体	FACS	Octet		
	EC ₅₀ (nM)	KD (nM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
5D6	3.73	27.7	1.05E+05	2.92E-03
29A10	3.39	19.8	1.42E+05	2.81E-03
34H1	2.1	12.9	1.71E+05	2.21E-03
19F1	3.59	18.3	1.16E+05	2.13E-03
30B7	2.78	10.9	7.17E+04	7.83E-04
28G4	2.87	11.3	9.89E+04	1.12E-03
30A4	3.68	19.9	1.30E+05	2.58E-03
38D2	3.35	11.3	7.34E+04	8.32E-04
39G4	2.79	26.2	7.95E+04	2.08E-03
41F1	0.91	18.5	9.79E+04	1.81E-03
41H1	1.07	25	1.06E+05	2.64E-03
49G8	1.18	3.32	6.94E+04	2.31E-04
46C3	0.46	24.3	6.36E+04	1.54E-03
42A1	6.69	40.5	6.00E+04	2.43E-03
47B6	0.38	48.2	3.08E+04	1.49E-03
GC33	2.74	4.17	5.49E+04	2.29E-04

10

【 0 2 5 6 】

2、G P C 3 候補抗体のヒト化

【 0 2 5 7 】

2.1 候補抗体の種交叉反応

親和力の高い陽性クローン 49G8 を選択し、ヒト、カニクイザル、マウス G P C 3 全長組換えタンパク質及びヒト G P C 3 細胞外領域の膜近位領域組換えタンパク質への結合活性を検出した。前記タンパク質 1 μg / ml を 4℃ で一晩コーティングし、ブロックした後、49G8 キメラ抗体（初期濃度を 200 nM とし、3 倍の勾配希釈、合計 12 個の濃度）を加え、室温で 1 時間反応し、二次抗体として H P R 標識ヤギ抗ヒト I g G F c を添加し、TMB で溶液を発色させた後、濃硫酸で反応を終了させ、450 nm における吸光度を読み取った。E L I S A 結果を図 5 に示し、49G8 抗体は、ヒト及びカニクイザル G P C 3 全長タンパク質及びヒト G P C 3 細胞外領域の膜近位領域に結合でき、親和力において対照抗体よりやや高くなり、マウス G P C 3 タンパク質への親和力が弱かった（表 3）。

30

【表 3】

表 3、49G8 と異なる種の G P C 3 全長タンパク質及びヒト G P C 3 膜近位領域タンパク質との E L I S A 測定

	結果			
	ヒト GPC3	カニクイザル GPC3	マウス GPC3	GST-ヒト GPC3-stem
49G8	0.072nM	0.120nM	微弱	0.074nM
GC33	0.074nM	0.160nM	微弱	0.060nM

40

【 0 2 5 8 】

2.2 抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（A D C C）

G P C 3 を発現するヒト肝臓がん細胞 H e p G 2 を標的細胞とし、標的細胞密度を 5×10^4 細胞 / ウェルに調整し、エフェクター細胞 N K 9 2 M I - C D 1 6 a を 1×10^5 細胞 / ウェルに調整し、勾配希釈抗体（初期濃度を 66.7 nM とし、10 倍の勾配、合計 6 つの希釈度）を添加し、37℃、5% C O₂ 培養箱で 4 時間培養し、上清を取って乳酸脱水素酵素（L D H）の放出を検出した。結果を図 6 に示し、49G8 キメラ抗体は、標的細胞 H e p G 2 の A D C C 作用を媒介した。

【 0 2 5 9 】

2.3 49G8 抗体のヒト化

50

CDR移植及び点突然変異により、マウス由来抗体49G8の可変領域配列に対してヒト化操作を実施した。mAb49G8マウス由来抗体軽鎖は、マウスIMGT__mVK1-110であり、このフレームワーク領域と同一性が最も高いヒトIMGT__hVK2-28を選択してCDR移植を行い、FM4として最も同一性の高いヒトIGKJ4*01を選択し、マウス由来抗体重鎖は、IGHV1-15であり、ヒト生殖系列遺伝子IMGT__hVH1-69を選択し、CDR移植を行い、FM4として最も同一性の高いヒトIGHJ4*01を選択した。復帰突然変異を設計し、合計6つの重鎖可変領域及び6つの軽鎖可変領域のヒト化変異体を合成し、組み合わせて対合した後、HEK293E細胞に一過的に発現させ、37℃、120rpm、5%CO₂で5～6日培養した後、培地の上清液を収集し、Protein Aクロマトグラフィーカラムにより精製して抗GPC3ヒト化抗体が得られた。

10

【0260】

ELISA法により49G8ヒト化抗体のヒト及びカニクイザルGPC3全長タンパク質への結合活性を測定し、フローサイトメトリーにより49G8ヒト化抗体のヒトGPC3-CHO安定トランスフェクト細胞への結合を検出した。ELISA結果を図7に示し、49G8ヒト化抗体は、いずれも高親和力でヒト及びカニクイザルGPC3組換えタンパク質を結合した。FACS結果を図8に示し、49G8ヒト化抗体は、ヒトGPC3-CHO安定トランスフェクト細胞への親和力がヒト化された前のマウス抗体の結合能力に相当し、対照抗体よりやや高かった。ヒト化抗体重鎖／軽鎖可変領域配列は、以下の通りであった。

20

【表4】

表4、ヒト化GPC3抗体の軽鎖可変領域配列

GPC3ヒト化抗体	LCVR		LCDR1		LCDR2	LCDR3
	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列
h49G8VKv1	84	85	60	17	61	
h49G8VKv2	86	87	60	17	61	
h49G8VKv3	88	89	60	17	61	
h49G8VKv4	90	91	92	17	61	
h49G8VKv5	93	94	95	17	61	
h49G8VKv6	96	97	98	17	61	

【0261】

30

h49G8VKv1

軽鎖VKのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 84に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 85に示し、そのLCDR1、LCDR2及びLCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 60、17、61に示した。

【化61】

DVVMTQSPLSLPVTILGQPASISCRSSQSIVHSNYNTYLEWYQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCLQVTHVPLTFGQGTKLEIK

核酸配列

【化62】

40

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCATCGTGCACAGCAACTACAACACATACCTGGAATGGTATCAGCAGAGGCCCTGGCCAGTCTCCTAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGATTGAGCGCGTGGCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCAGACTTCACCTGAAGATCTCCAGAGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTCTCCAGGTCACACACGTGCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

【0262】

h49G8VKv2

軽鎖VKのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 86に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 87に示し、そのLCDR1、LCDR2及びLCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 60、17、61に示した。

50

【化 6 3】

DVVM TQSP LSLPVT PGEPASISCRSSQSI VHSNYNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR V
EAEDVG VYFC LQVTHVPLT FGQGTKLEIK

核酸配列

【化 6 4】

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAG
CATCGTGACAGCAACTACAACACATACCTGGAGTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGG
TGTCCAACAGATT CAGCGGCGTGCCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCAGAGTG
GAAGCCGAGGACGTGGGCGGTACTTCTGTCTCCAGGTCACACACGTGCCCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAAT
CAAG

10

【0 2 6 3】

h 4 9 G 8 V K v 3

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 88 に示し、そのコード核酸を SEQ
ID NO. 89 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ
ID NO. 60、17、61 に示した。

【化 6 5】

DVVM TQSP LSLPVT PGEPASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR V
EAEDVG VYFC LQVTHVPLT FGQGTKLEIK

核酸配列

【化 6 6】

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAG
CATCGTGACAGCAACGGCAACACATACCTGGAGTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGG
TGTCCAACAGATT CAGCGGCGTGCCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCAGAGTG
GAAGCCGAGGACGTGGGCGGTACTTCTGTCTCCAGGTCACACACGTGCCCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAAT
CAAG

20

【0 2 6 4】

h 4 9 G 8 V K v 4

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 90 に示し、そのコード核酸を SEQ
ID NO. 91 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ
ID NO. 92、17、61 に示した。

【化 6 7】

DVVM TQSP LSLPVT PGEPASISCRSSQSI VHSNSNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR V
EAEDVG VYFC LQVTHVPLT FGQGTKLEIK

核酸配列

【化 6 8】

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAG
CATCGTGACAGCAACAGCAACACATACCTGGAGTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGG
TGTCCAACAGATT CAGCGGCGTGCCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCAGAGTG
GAAGCCGAGGACGTGGGCGGTACTTCTGTCTCCAGGTCACACACGTGCCCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAAT
CAAG

40

【0 2 6 5】

h 4 9 G 8 V K v 5

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 93 に示し、そのコード核酸を SEQ
ID NO. 94 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ
ID NO. 95、17、61 に示した。

【化 6 9】

DVVM TQSP LSLPVT PGEPASISCRSSQSI VHSNTNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR V
EAEDVG VYFC LQVTHVPLT FGQGTKLEIK

核酸配列

50

【化 7 0】

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAG
CATCGTGCACAGCAACACAAACATACCTGGAGTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGG
TGTCCAACAGATTGACGCGCGTGCCTGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCAGAGTG
GAAGCCGAGGACGTGGGCGTGACTTCTGTCTCCAGGTACACACGTGCCCTGACATTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAT
CAAG

【0 2 6 6】

h 4 9 G 8 V K v 6

軽鎖 V K のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 96 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 97 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 98、17、61 に示した。

10

【化 7 1】

DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNANTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR
EAEDVGVIYFCQVTHVPLTFGQGTKLEIK

核酸配列

【化 7 2】

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAG
CATCGTGCACAGCAACGCCAACATACCTGGAGTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGG
TGTCCAACAGATTGACGCGCGTGCCTGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCTCCAGAGTG
GAAGCCGAGGACGTGGGCGTGACTTCTGTCTCCAGGTACACACGTGCCCTGACATTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAT
CAAG

20

【表 5】

表 5、ヒト化 G P C 3 抗体の重鎖可変領域配列

G P C 3 ヒト化抗体	HCVR		HCDR1		HCDR2	HCDR3
	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列
h49G8VHv1	99	100	11		101	13
h49G8VHv2	102	103	11		101	13
h49G8VHv3	104	105	11		106	13
h49G8VHv4	107	108	11		101	13
h49G8VHv5	109	110	11		101	13
h49G8VHv6	111	112	11		106	13

【0 2 6 7】

30

h 4 9 G 8 V H v 1

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 99 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 100 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、101、13 に示した。

【化 7 3】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWRQAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYNQKFQGRVTLTADKSSTAYMEL
SSLRSEDTAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSS

核酸配列

【化 7 4】

40

CAGGTTCACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACAC
CTTCGCCGACTACGAGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGCTATCCATCCTGGCTCTG
GCGGCACAGCTTACAACAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGGAAGTG
AGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCACCCGGTACTACAGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGT
CACAGTCAGCTCT

【0 2 6 8】

h 4 9 G 8 V H v 2

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 102 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 103 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、101、13 に示した。

50

【化 7 5】

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYNQKFQGRVTLTADKSSTTAYMEL
SSLRSEDTAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSS

核酸配列

【化 7 6】

CAGGTTCACTGGTTCACTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACAC
CTTCGCCGACTACGAGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGCTATCCATCCTGGCTCTG
GCGGCACAGCTTACAACCAAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGGAAGT
AGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTACTACAGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCCCTGGT
CACAGTCAGCTCT

10

【0 2 6 9】

h 4 9 G 8 V H v 3

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 104 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 105 に示し、その HCDR1、HCDR2 及び HCDR3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、106、13 に示した。

【化 7 7】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYAQKFQGRVTLTADKSSTTAYMEL
SSLRSEDTAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSS

核酸配列

【化 7 8】

CAGGTTCACTGGTTCACTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACAC
CTTCGCCGACTACGAGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGCTATCCATCCTGGCTCTG
GCGGCACAGCTTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGGAAGT
AGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTACTACAGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCCCTGGT
CACAGTCAGCTCT

20

【0 2 7 0】

h 4 9 G 8 V H v 4

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 107 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 108 に示し、その HCDR1、HCDR2 及び HCDR3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、101、13 に示した。

【化 7 9】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYNQKFQGRVTLTADESSTTAYMEL
SSLRSEDTAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSS

30

核酸配列

【化 8 0】

CAGGTTCACTGGTTCACTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACAC
CTTCGCCGACTACGAGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGCTATCCATCCTGGCTCTG
GCGGCACAGCTTACAACCAAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCCTGACCGCCGACGAGTCTAGCACCACCGCCTACATGGAAGT
AGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTACTACAGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCCCTGGT
CACAGTCAGCTCT

40

【0 2 7 1】

h 4 9 G 8 V H v 5

重鎖 V H のアミノ酸配列を SEQ ID NO. 109 に示し、そのコード核酸を SEQ ID NO. 110 に示し、その HCDR1、HCDR2 及び HCDR3 をそれぞれ SEQ ID NO. 11、101、13 に示した。

【化 8 1】

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYNQKFQGRVTLTADESSTTAYMEL
SSLRSEDTAVYYCTRYYSFAYWGQGLVTVSS

核酸配列

50

【化 8 2】

CAGGTTTCAGTGGTTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACAC
CTTCGCGGACTACGAGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGCTATCCATCCTGGCTCTG
GCGGCACAGCTTACACCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACGAGTCTAGCACCACCGCCTACATGGAAGT
AGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCACCCGGTACTACAGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGT
CACAGTCAGCTCT

【0 2 7 2】

h 4 9 G 8 V H v 6

重鎖VHのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 111に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 112に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 11、106、13に示した。

【化 8 3】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWWVRQAPGQGLEWMGAIHHPGSGGTAYAQKFQGRVTLTADSSSTAYMEL
SSLRSEDTAVYYCTRYYSFAYWGQGLTVTVSS

核酸配列

【化 8 4】

CAGGTTTCAGTGGTTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACAC
CTTCGCGGACTACGAGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGCTATCCATCCTGGCTCTG
GCGGCACAGCTTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACGAGTCTAGCACCACCGCCTACATGGAAGT
AGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCACCCGGTACTACAGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGT
CACAGTCAGCTCT

【0 2 7 3】

2. 3 ヒト化抗体の親和力

1) バイオフィルム干渉技術 (B i o l a y e r I n t e r f e r o m e t r y、B L I)

B L I バイオフィルム干渉技術 (O c t e t) により、検出するための抗体を P r o t e i n A プローブに捕捉させ、ヒト G P C 3 タンパク質 (初期濃度を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし、2 倍の勾配、合計 5 つの濃度点) への結合能力を検出し、結合速率及び解離速率に基づいて親和力常数 KD が得られた。結果を図 9 に示し、49G8 ヒト化抗体は、高親和力で G P C 3 組換えタンパク質に結合し、親和力のデータを表 6 に示した。

【表 6】

表 6、B L I により 49G8 ヒト化抗体のヒト G P C 3 全長タンパク質への親和力を分析した結果

	KD (nM)	kon(1/Ms)	kd (1/s)
h49G8VHv6VKv2	2.00	9.36E+04	1.87E-04
h49G8VHv6VKv3	1.42	9.48E+04	1.34E-04
h49G8VHv6VKv4	2.28	8.99E+04	2.05E-04
h49G8VHv6VKv5	2.15	9.00E+04	1.93E-04
h49G8VHv6VKv6	2.38	9.24E+04	2.20E-04
49G8	1.17	7.97E+04	9.35E-05
GC33	1.35	8.26E+04	1.11E-04

【0 2 7 4】

2) 表面プラズモン共鳴 (S u r f a c e P l a s m o n R e s o n a n c e、S P R)

親和力の高いヒト化抗体を選択し、ヒト及びカニクイザル G P C 3 への結合能力を比較した。P r o t e i n A チップ (G E h e a l t h c a r e) によりヒト化抗体 h 4 9 G 8 V H v 6 V K v 3 を捕捉し、勾配希釈されたヒト及びカニクイザルの G P C 3 組換えタンパク質 (初期濃度を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし、2 倍の勾配、合計 5 つの濃度点) を $30 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速でチップを流し、結合時間は、150 秒間であり、解離時間は、600 秒間であった。B i a c o r e T 2 0 0 e v a l u a t i o n ソフトウェアで L a n g m u i r 1 : 1 k i n e t i c s モデルを用いてフィッティングし、動力学的定数が得られた。結果を図 10 に示し、ヒト化抗体 h 4 9 G 8 V H v 6 V K v 3 は、高親和力でヒト及びカニクイザルの G P C 3 に結合し、ヒト G P C 3 への親和力が 1.39 nM であり、

カニクイザル G P C 3 への親和力が 2.10 nM であり、親和力に相当した。親和力のデータを示した。

【表 7】

表 7、S P R により候補抗体のヒト及びカニクイザル G P C 3 全長タンパク質への親和力を分析した結果

	ヒト GPC3			カニクイザル GPC3		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
GC33	1.81E+05	1.85E-04	1.03	6.72E+04	4.29E-04	6.38
h49G8VHv6VKv3	2.53E+05	3.51E-04	1.39	1.19E+05	2.50E-04	2.10

【0275】

2.4 ヒト化抗体のエンドサイトーシス

対数増殖期にある H e p G 2 細胞を取り、予め加熱された培地で細胞を 1 回洗浄し、 1000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を捨て、血清なし培地を添加し、細胞を 1×10^6 細胞 / mL に再懸濁し、 $200 \mu\text{L}$ / チューブで細胞を E P チューブに吸引し、予め冷された $0.5\% \text{ BSA} / \text{PBS}$ $500 \mu\text{L}$ を添加し、 1000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を捨て、GPC3 被検抗体 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ を添加し、 4°C 又は 37°C でそれぞれ 60 分間、120 分間、240 分間、120 分間、180 分間、240 分間インキュベートし、各時間点で一次抗体のインキュベートを終了した後、予め冷された $0.5\% \text{ SA} / \text{PBS}$ $500 \mu\text{L}$ で 2 回洗浄した後、二次抗体として 1 : 300 で希釈された A F 6 4 7 標識ヤギ抗ヒト I g G F c を直接に添加し、45 分間インキュベートした。二次抗体のインキュベートを終了した後、 $0.5\% \text{ BSA} / \text{PBS}$ $500 \mu\text{L}$ で 2 回洗浄し、そして細胞を $200 \mu\text{L}$ に再懸濁し、FACS 検出を行った。フローサイトメトリー検出結果を図 11 に示し、GPC3 ヒト化抗体は、 37°C の試験条件及び 4°C の試験条件では、いずれも有意なエンドサイトーシスが示されなかった。

【0276】

実施例 3 : G P C 3 $\times$ C D 3 二重特異的抗体の構築

1、C D 3 ヒト化抗体の構築

マウス由来ハイブリドーマ C D 3 抗体 (E M B O J . 1985 . 4 (2) : 337 - 344 ; J . Immunol . 1986 , 137 (4) : 1097 - 100 ; J . Exp . Med . 1991 , 174 : 319 - 326 ; J . Immunol . 1991 , 147 (9) : 3047 - 52) でヒト及びサルの C D 3 受容体を認識し、その配列は、以下の通りであった。

【0277】

抗 C D 3 マウス モノクローナル抗体軽鎖アミノ酸配列を S E Q I D N O . 174 に示した。

【化 85】

QAVVTQESALTTSPGETVTTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKQPDHLEFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE
DEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

【0278】

抗 C D 3 マウス モノクローナル抗体重鎖アミノ酸配列を S E Q I D N O . 175 に示した。

【化 86】

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFN^{TYAMN}WVRQAPGKGLEWVAR^{IRSKYNNYATYYADS}VKDRFTISRDDSQSILYL
QMNNLKTEDTAMYYCVR^{HGNFGNSYVSWFAY}WGQGLTVTVSS

【0279】

抗 C D 3 マウスモノクローナル抗体をヒト化させ、同一性の最も高いヒト生殖系列遺伝子 I M G T _ h V L 7 - 43 を選択し、軽鎖 C D R 移植を行い、F M 4 としてヒト I G L J 3 * 02 を用い、ヒト I M G T _ h V H 3 - 73 を選択し、重鎖 C D R 移植を行い、F M 4 としてヒト I G H J 4 * 01 を用いた。設計して異なる重鎖変異体及び軽鎖変異体が得られた (表 8、9) 。

【表 8】

表 8、CD 3 ヒト化抗体の軽鎖可変領域の配列

C D 3 ヒト化抗体	SEQ ID NOs: 113-131				
	LCVR		LCDR1	LCDR2	LCDR3
	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列
hVL1	113	114	115	116	117
hVL2	118	119	115	116	117
hVL3	120	121	122	123	117
hVL4	124	125	122	123	117
hVL5	126	127	115	116	128
hVL6	129	130	115	131	128

10

【0280】

hVL1のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 113に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 114に示し、そのLCDR1、LCDR2及びLCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 115、116、117に示した。

【化87】

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

核酸配列

【化88】

CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAG
 GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGCAGAAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAAC
 AAACAAGAGAGCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTCTGGT
 GCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAAAC
 TGACAGTTCTG

20

【0281】

hVL2のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 118に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 119に示し、そのLCDR1、LCDR2及びLCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 115、116、117に示した。

【化89】

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

30

核酸配列

【化90】

CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAG
 GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAAC
 AAACAAGAGAGCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTCTGGT
 GCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAAAC
 TGACAGTTCTG

【0282】

hVL3のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 120に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 121に示し、そのLCDR1、LCDR2及びLCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 122、123、117に示した。

40

【化91】

EAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCESSDGAVTTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKEAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

核酸配列

50

【化 9 2】

GAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTGAGTCTTCTGACG
GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAAC
AAACAAGGAGGCCCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGT
GCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAAC
TGACAGTTCTG

【0 2 8 3】

h V L 4 のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 2 4 に示し、そのコード核酸を S E Q
I D N O . 1 2 5 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ S E Q
I D N O . 1 2 2、1 2 3、1 1 7 に示した。

【化 9 3】

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCESSDGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKEAPWTPARFSGSLLGGKAA
LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

10

核酸配列

【化 9 4】

CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTGAGTCTTCTGACG
GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAAC
AAACAAGGAGGCCCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGT
GCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAAC
TGACAGTTCTG

【0 2 8 4】

h V L 5 のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 2 6 に示し、そのコード核酸を S E Q
I D N O . 1 2 7 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ S E Q
I D N O . 1 1 5、1 1 6、1 2 8 に示した。

【化 9 5】

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
LTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL

20

核酸配列

【化 9 6】

CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAG
GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAAC
AAACAAGAGAGCCCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACAATCACTGGT
GCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAAC
TGACAGTTCTG

30

【0 2 8 5】

h V L 6 のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 2 9 に示し、そのコード核酸を S E Q
I D N O . 1 3 0 に示し、その L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 をそれぞれ S E Q
I D N O . 1 1 5、1 3 1、1 2 8 に示した。

【化 9 7】

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWFQEKPGQAPRGLIYGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
LTLSGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL

40

核酸配列

【化 9 8】

CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAG
GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGTTCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCTACGGAAC
AAACAAGAGAGCCCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGT
GCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAAC
TGACAGTTCTG

50

【表 9】

表 9、CD 3 ヒト化抗体の重鎖可変領域の配列

CD 3 ヒト化抗体	SEQ ID NOs: 132-161				
	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3
	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列
hVH1	132	133	134	135	136
hVH2	137	138	139	135	136
hVH3	140	141	139	135	142
hVH4	143	144	139	135	145
hVH5	146	147	139	135	148
hVH6	149	150	139	135	151
hVH7	152	153	154	155	136
hVH8	156	157	134	135	136
hVH9	158	159	134	135	136
hVH10	160	161	134	135	136

10

【0286】

hVH1のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 132に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 133に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 134、135、136に示した。

【化99】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

20

核酸配列

【化100】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCAACACCTACGCTATGAAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCA
ACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

【0287】

hVH2のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 137に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 138に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 139、135、136に示した。

30

【化101】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

核酸配列

【化102】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCTCCACCTACGCTATGAAGTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCA
ACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

40

【0288】

hVH3のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 140に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 141に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 139、135、142に示した。

【化103】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGESYVSWFAYWGQGLVTVSS

核酸配列

50

【化104】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
ACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCG
AGAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

【0289】

h V H 4 のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 4 3 に示し、そのコード核酸を S E Q I D N O . 1 4 4 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q I D N O . 1 3 9、1 3 5、1 4 5 に示した。

【化105】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

核酸配列

【化106】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
ACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCC
AGAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

【0290】

h V H 5 のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 4 6 に示し、そのコード核酸を S E Q I D N O . 1 4 7 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q I D N O . 1 3 9、1 3 5、1 4 8 に示した。

【化107】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

核酸配列

【化108】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
ACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCG
ACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

【0291】

h V H 6 のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 4 9 に示し、そのコード核酸を S E Q I D N O . 1 5 0 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q I D N O . 1 3 9、1 3 5、1 5 1 に示した。

【化109】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

核酸配列

【化110】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
ACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCA
CCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

【0292】

h V H 7 のアミノ酸配列を S E Q I D N O . 1 5 2 に示し、そのコード核酸を S E Q I D N O . 1 5 3 に示し、その H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 をそれぞれ S E Q

10

20

30

40

50

ID NO. 154、155、136に示した。

【化111】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVEDRFTISRDDSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

核酸配列

【化112】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCTCCGACTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGGAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
ACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCA
ACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

10

【0293】

hVH8のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 156に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 157に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 134、135、136に示した。

【化113】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYL
QMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

核酸配列

【化114】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGGAAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGACACGGCAACTTCGGCA
ACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

20

【0294】

hVH9のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 158に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 159に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 134、135、136に示した。

【化115】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYL
QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

30

核酸配列

【化116】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGGAAGAATCAGGTC
CAAGTACAACAACACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCA
ACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

【0295】

hVH10のアミノ酸配列をSEQ ID NO. 160に示し、そのコード核酸をSEQ ID NO. 161に示し、そのHCDR1、HCDR2及びHCDR3をそれぞれSEQ ID NO. 134、135、136に示した。

【化117】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYL
QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

40

核酸配列

50

【化 1 1 8】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCGAGCGGCT
 TCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCCAGAATCAGGTC
 CAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC
 AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGACAGACACGGCAACTTCGGCA
 ACAGCTATGTGTCTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

【0 2 9 6】

軽鎖、重鎖のヒト化変異体をそれぞれ全配列合成した後、抗体λ軽鎖定常領域又はヒト I g G 4 重鎖定常領域 C H 1 - C H 3 を含む真核発現ベクターにクローニングし、H E K 2 9 3 E 細胞にコトランスフェクトし、3 7 °C、1 2 0 r p m、5 % C O ₂ で 5 ~ 6 日培養した後、培地上清液を集め、P r o t e i n A クロマトグラフィーカラムにより精製した。

10

【0 2 9 7】

2、C D 3 ヒト化抗体の親和力

ヒト C D 3 ε γ タンパク質を 4 °C で一晚コーティングした。2 % スキムミルクでブロックした後、各ウェルにさまざまな希釈倍数の C D 3 抗体を加え、1 時間インキュベートし、二次抗体として H P R 標識ヤギ抗ヒト I g G F c を添加し、T M B 溶液で発色させた後、濃硫酸で反応を終了させ、4 5 0 n m における吸光度を読み取った（結果を図 1 2、表 8 に示した）。図 1 2 は、抗 C D 3 ヒト化抗体のヒト C D 3 ε γ タンパク質への結合の組み合わせ（a C D 3 - h V H 8 / V L 1、a C D 3 - h V H 9 / V L 1、a C D 3 - h V H 9 / V L 2、a C D 3 - h V H 9 / V L 3、a C D 3 - h V H 1 / V L 5、a C D 3 - h V H 8 / V L 5、a C D 3 - h V H 9 / V L 5 を含む）を示し、C D 3 ヒト化抗体は、高い親和力で C D 3 ε γ 組換えタンパク質に結合した。

20

【0 2 9 8】

3、C D 3 ヒト化抗体による J u r k a t T 細胞の認識

対数増殖期にある J u r k a t 細胞を取り、3 % B S A で 3 0 分間ブロックし、U 型 9 6 ウェルプレートに 5 × 1 0 ⁴ 細胞 / ウェルを添加し、遠心分離して上清を捨て、各ウェルに勾配希釈抗体（抗体濃度 3 0 μ g / m l から、5 個の勾配で 3 倍希釈された）5 0 μ L を添加し、4 °C で 1 時間インキュベートした。洗浄して一次抗体を除去した後、二次抗体として 1 : 3 0 0 で希釈された A l e x a F l u o 6 4 7 標識ヤギ抗ヒト I g G F c （J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h、1 0 9 - 6 0 6 - 1 7 0）を添加し、4 °C で 4 5 分間インキュベートした後、洗浄し、各ウェルを P B S 5 0 μ L に再懸濁して F A C S （i Q u e , I n t e l l i c y t）検出を行った（結果を図 1 3、表 1 0 に示した）。

30

【表 1 0】

表 1 0、C D 3 ヒト化抗体の親和力

	ELISA (CD3εγ)	FACS Jurkat
aCD3-hVH1/VL5	0.60 nM	10 nM
aCD3-hVH8/VL1	0.65 nM	15 nM
aCD3-hVH8/VL5	0.74 nM	比較的に弱い
aCD3-hVH9/VL1	0.49 nM	7 nM
aCD3-hVH9/VL2	0.44 nM	25 nM
aCD3-hVH9/VL3	0.70 nM	弱い
aCD3-hVH9/VL5	0.42 nM	20 nM
OKT3-hIgG1	ND	0.27 nM
KLH-hIgG4	-	-

ND: 未検出

-: 結合しなかった

40

【0 2 9 9】

図 1 3 は、J u r k a t 細胞に結合した抗 C D 3 ヒト化抗体の組み合わせを示し、C D 3 ヒト化抗体 h V H 9 / V L 5 （a C D 3 - h V H 9 / V L 5）及び h V H 9 / V L 2 （

50

aCD3-hVH9/VL2)は、対照抗体OKT3より有意に弱く、中親和力でJurkat細胞に結合した。

【0300】

4、CD3ヒト化抗体のヒト、サルCD3εγ抗原への交差認識

それぞれヒトCD3εγタンパク質及びサルCD3εγタンパク質を4℃で一晩コーティングした。2%スキムミルクでブロックした後、各ウェルに異なる希釈倍数のCD3抗体を加え、1時間インキュベートし、二次抗体としてHPR標識ヤギ抗ヒトIgG Fcを添加し、TMB溶液で発色させた後、濃硫酸で反応を終了させ、450nmにおける吸光度を読み取った。図14は、CD3ヒト化抗体hVH9/VL5(aCD3-hVH9/VL5)及びhVH9/VL2(aCD3-hVH9/VL2)がいずれもヒトCD3εγ及びサルCD3εγタンパク質を同時に結合することを示した。

10

【0301】

5、GPC3×CD3κλヒト化二重特異的抗体の構築

ヒト化抗体49G8VHv6VKv3及びλ軽鎖を含有するヒト化CD3抗体hVH9/VL5(aCD3-hVH9/VL5)で、天然IgG配置を有する新規なGPC3-CD3κλヒト化二重特異的抗体を構築し、また、GPC3抗原アーム及びCD3アームに電荷変異体(VκGPC3:Gln43Lys、VHGPC3:Gln39Glu、VλCD3:Gln40Glu、VHCD3:Gln39Lys)を導入した(表11)。ヘテロ二量体対合を達成するために、二重特異的抗体のFc部分は、ヒトIgG4 knob-into-hole構造を採用し(Atwell et al., 1997)、突然変異Ser228Pro、Leu235Glu及びPro329Alaにより、ヒンジ領域の安定性を維持し、Fcγ受容体及びC1qとの相互作用を完全に除去した。

20

【0302】

対応する抗体断片をコードするプラスミドをκ軽鎖:λ軽鎖:重鎖1:重鎖2=2:2:1:1の比率で混合し、PEI3mg/mLと混合した後、CHO-S細胞にコトランスフェクトし、CD CHO AGT培地(Gibco#12490-001)500mLに37℃、5%CO₂、150rpmで培養し、それぞれ一過的にトランスフェクトした後、2日目、4日目及び6日目に4%CHO Feed C+フィード(Gibco #A25031-05)を添加した。細胞活率が85%程度に低下した時、発酵液を収穫し、ろ過した後、Protein Aアフィニティークロマトグラフィーで予備精製し、SEC-HPLCモノマー含有量は、92%を超えると示され、Butyl HP疎水性クロマトグラフィー及びCapto Qアニオンクロマトグラフィーを経て単量体の含有量をさらに99.5%以上に向上した(表12)。

30

【表11】

表11、GPC3-CD3κλヒト化二重特異的抗体

	GPC3 アーム軽鎖	GPC3 アーム重鎖	CD3 アーム軽鎖	CD3 アーム重鎖
GPC3×CD3 κλ002	SEQ ID NO. 162	SEQ ID NO. 164	SEQ ID NO. 166	SEQ ID NO. 168
GPC3×CD3 κλ003	SEQ ID NO. 170	SEQ ID NO. 172	SEQ ID NO. 166	SEQ ID NO. 168

【0303】

GPC3×CD3κλ002:

GPC3アーム軽鎖をSEQ ID NO. 162に示した。

【化119】

DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLKKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYFCLQVTHVPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0304】

ヌクレオチド配列をSEQ ID NO. 163に示した。

50

【化 1 2 0】

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAG
CATCGTGCACAGCAACGGCAACACATACCTGGAGTGGTATCTGAAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGG
TGTCCAACAGATTACAGCGCGTGGCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCAGCTTACCCTGAAGATCTCCAGAGTG
GAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTCTCCAGGTCACACACGTGCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAT
CAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

【 0 3 0 5】

G P C 3 アーム重鎖を S E Q I D N O . 1 6 4 に示した。

【化 1 2 1】

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFADYEIHWVREAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYAQKFQGRVLTADSSSTAYMEL
SSLRSEDTAIVYYCTRYYSFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFEGGSPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTTIS
KAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

【 0 3 0 6】

ヌクレオチド配列を S E Q I D N O . 1 6 5 に示した。

【化 1 2 2】

CAGGTTACAGTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACAC
CTTCGCCGACTACGAGATCCACTGGGTCCGAGAGGCTCCAGGACAGGACTTGAATGGATGGGCGCTATCCCTCCTGGCTCTG
GCGGCACAGCTTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACGAGTCTAGCACCACCGCCTACATGGAATG
AGCAGCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGACCCGGTACTACAGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGT
CACAGTCAGTCTGTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTTGACAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCG
CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCAT
ACCTTCCCCGCGCTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCTGGGCACCAA
GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGCCCCTCCCTGCC
CCCCCTGCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTCTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGC
AGAACCCTCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGAGCTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGCGGT
GGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGC
ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAGGGGCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGC
AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCTGCCACCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT
GAGCTGTGCCGTGAAGGCTTCTATCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGACAACACTACAAGA
CCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGC
AACGTCTTACAGTGTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

【 0 3 0 7】

C D 3 アーム軽鎖を S E Q I D N O . 1 6 6 に示した。

【化 1 2 3】

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAE
DEAEYCVLWYSNLWVFGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNKNKYAASSYLSTLPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【 0 3 0 8】

ヌクレオチド配列を S E Q I D N O . 1 6 7 に示した。

【化 1 2 4】

CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAGGCGC
CGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAACAAGA
GAGCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGTCTCGCGGAAAGGCCGCTCTGACAATCACTGGTGTCTCAGGCTGAG
GACGAGGCCGAGTACTATTGTGTCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTCA
GCCCAAGGCGCGCCCTCGTCACTCTGTTCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCA
TAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACA
CCCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTA
CAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA

【 0 3 0 9】

C D 3 アーム重鎖を S E Q I D N O . 1 6 8 に示した。

10

20

30

40

50

【化 1 2 5】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYL
QMNSLTEDTAVYYCVRHGNGNSVVSFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTITCNVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LASSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

【0 3 1 0】

ヌクレオチド配列を SEQ ID NO. 169 に示した。

【化 1 2 6】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCAC
CTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGGAAGAATCAGGTCCAAGTACA
ACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTCAACATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTG
CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGACACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTG
GTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCT
GCAGCAGAAGCACAGCGAGAGCACAGCGCCCTGGGCTGCTGTGTAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTG
AACAGCGGCGCTCTGACCAGCGCGCTGCATACCTTCCCCGCGGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGT
GACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
GAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGGCCTGCCCCGAGTTGAGGGCGGACCTAGCGTGTCTCTGTCTCCCC
CCCAAGCCCAAGGACACCTTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGA
GGTCCAGTTTAAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCT
ACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGGC
CTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCTGCCACCTTGTCA
AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAGCTG
ACCGTGGACAAGTCCAGATGCGAGGAGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA
GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

10

【0 3 1 1】

G P C 3 × C D 3 κ λ 0 0 3 :

G P C 3 アーム軽鎖を SEQ ID NO. 170 に示した。

【化 1 2 7】

DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLKKPQSPQLLIYKVSNRFSVGPDRFSGSGSGTDFTLKISR
EAEDVGVIYFCLQVTHVPLTFQGTFKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKFLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQ
SVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

【0 3 1 2】

ヌクレオチド配列を SEQ ID NO. 171 に示した。

【化 1 2 8】

GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAG
CATCGTGCACAGCAACGGCAACACATACCTGGAGTGGTATCTGAAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGG
TGTCCAACAGATTACGCGGCGTGCCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTCACCTGAAGATCTCCAGAGTG
GAAGCCGAGGACGTGGCGGTACTTCTGTCTCCAGGTACACACAGCTGCCCTGACATTGGCCAGGGCACCAGCTGGAAT
CAAGCGAAGCTGGGTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATAAGAAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

30

【0 3 1 3】

G P C 3 アーム重鎖を SEQ ID NO. 172 に示した。

【化 1 2 9】

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFADYEIHWVREAPQGQLEWMAIHPGSGGTAYAQKFQGRVTLTADESSTTAYMEL
SSLRSEDYAVYYCTRYYSFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTITCNVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPPSVFLFPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTI
KAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

40

【0 3 1 4】

ヌクレオチド配列を SEQ ID NO. 173 に示した。

50

【表 1 2】

表 1 2、GPC3-CD3 ヒト化二重特異的抗体の精製

HPLC 検出	HPLC-SEC (Protein A 後)			HPLC-SEC (アニオンクロマトグラフィー後)		
	多量体	単量体	断片	多量体	単量体	断片
GPC3×CD3 κλ002	2.6%	94.2%	3.1%	0.0%	100.0%	0.0%
GPC3×CD3 κλ003	2.2%	93.2%	4.5%	0.1%	99.5%	0.4%

10

【0319】

実施例 4、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体の結合活性

それぞれ GPC3 組換えタンパク質、過剰発現安定トランスフェクト細胞又は GPC3 + 腫瘍細胞への結合を検出することで、二重特異的抗体 GPC3 抗原アームの親和力を決定し、Jurkat 細胞への結合を検出することで、二重特異的抗体 CD3 アームの親和力を決定した。

【0320】

1、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体の GPC3 への親和力決定

濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体を Protein A チップ (GE healthcare) に捕捉させ、異なる濃度のヒト又はカニクイザルの GPC3 組換えタンパク質 (初期濃度: $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 倍勾配、合計 6 つの濃度点) を検体として $30 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速でチップを流れ、結合時間は、120 秒間であり、解離時間は、400 秒間であり、タンパク質への結合、解離過程の SPR シグナル変化を記録し、Biacore T200 evaluation ソフトウェアで 1:1 結合モデルでフィッティングし、親和力定数が得られた。

20

【0321】

アミノ基によりヒト又はサル CD3εγ 組換え抗原 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を CM5 チップ (GE healthcare) にカップリングし、抗原結合量を約 200 RU に制御した。ベースラインが安定化した後、勾配希釈抗体 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ から 7 個の勾配で 2 倍希釈された) を $30 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速でチップを流し、結合時間は、350 秒間であり、解離時間は、600 秒間であった。Biacore T200 evaluation ソフトウェアで 1:1 結合モデルでフィッティングし、動的定数が得られた。親和力の測定結果を表 13 に示した。

30

【表 13】

表 13、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体の GPC3 及び CD3 組換え抗原への親和力

KD(nM)	ヒト GPC3	サル GPC3	ヒト CD3εγ	サル CD3εγ
GPC3×CD3 κλ002	1.35	1.60	15.9	23.9
GPC3×CD3 κλ003	2.11	1.91	12.1	17.8

【0322】

2、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体の GPC3 安定トランスフェクト細胞への結合

対数増殖期にある CHO-ヒト GPC3 及び CHO-カニクイザル GPC3 安定トランスフェクト細胞を取り、4% ウシ血清 (Hyclone, SH30626.06) で細胞を 5×10^5 個細胞/mL に調整し、細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ を U 型 96 ウェルプレートに添加し、300 g で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、各ウェルに勾配希釈抗体 (初期濃度 1800 nM 、3 倍希釈、10 個の勾配) $100 \mu\text{L}$ を添加し、4℃ で 60 分間インキュベートした。二次抗体として Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ヒト IgG Fc (1:300 希釈) $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ を添加し、氷上で 20 分間インキュベートし、1 回洗浄した後ヨウ化プロピジウム溶液 (1:300) $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ を添加し、5 分間インキュベートし、フローサイトメトリーにより検出した。図 15 及び表 14 に示され

50

ているように、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体は、高親和力で細胞GPC3受容体に結合し、ザルGPC3安定トランスフェクト細胞への親和力が、ヒトGPC3安定トランスフェクト細胞への親和力に相当した。

【表14】

表14、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体の安定トランスフェクト細胞への結合

EC ₅₀ (nM)	ヒト GPC3-CHO	サル GPC3-CHO
GPC3×CD3 κλ002	2.8	3.0
GPC3×CD3 κλ003	2.9	3.0
KLH×CD3	-	-

10

【0323】

3、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のGPC3+腫瘍細胞への結合

対数増殖期にあるHepG2細胞を取り、マウスIgG (Jackson ImmunoResearch, 115-005-03) 200μg/mLを添加し、氷浴に30分間ブロックし、4%ウシ血清で細胞を5×10⁵細胞/mLに調整し、U型96ウェルプレートに100μL/ウェルを添加し、300gで5分間遠心分離し、上清を捨て、各ウェルに勾配希釈抗体（初期濃度1800nM、3倍希釈、10勾配）100μLを添加し、4℃で60分間インキュベートした。洗浄して一次抗体を除去し、Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ヒトIgG Fc (1:300希釈) 50μL/ウェルを添加し、氷上で20分間インキュベートし、1回洗浄した後PI 50μL/ウェルを添加し、5分間インキュベートし、フローサイトメトリーにより検出した。検出結果を図16及び表15に示し、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体は、高い親和力でGPC3+腫瘍細胞HepG2に結合した。

20

【表15】

表15、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のGPC3+腫瘍細胞への結合

EC ₅₀ (nM)	HepG2
GPC3×CD3 κλ002	2.1
GPC3×CD3 κλ003	2.5
KLH×CD3	-

30

【0324】

4、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のJurkat細胞への結合

対数増殖期にあるJurkat細胞を取り、マウスIgG (Jackson ImmunoResearch, 115-005-03) 200μg/mLを加え、30分間氷浴した。4%ウシ血清で細胞を5×10⁵細胞/mLに調整し、U型96ウェルプレートに100μL/ウェルを添加し、300gで遠心分離し、上清を捨て、勾配希釈抗体（初期濃度1800nM、3倍希釈、10勾配）100μLを各ウェルに添加し、4℃で60分間インキュベートした。二次抗体としてAlexa Fluor 647 標識ヤギ抗ヒトIgG Fc (1:300希釈) 50μL/ウェルを添加し、氷上で20分間インキュベートし、1回洗浄した後PI 50μL/ウェルを添加し、5分間インキュベートし、フローサイトメトリー (BD C6) により検出した。検出結果を図17と表16に示し、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体は、中親和力でヒト白血病T細胞株Jurkat細胞に結合し、EC₅₀が約20~40nMであった。

40

50

【表 16】

表 16、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体の Jurkat 細胞への結合

EC ₅₀ (nM)	Jurkat
GPC3×CD3 κλ002	36
GPC3×CD3 κλ003	26
KLH×CD3	27

【0325】

5、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体の末梢血 T 細胞への結合

新鮮なヒト末梢血を取り、Ficoll. Paque Plus (GE, 17-1440-03) で PBMC を単離した。PBMC に対して、4%ウシ血清 (Hyclone、SH30626.06) で細胞を 5×10^5 個細胞/mL に調整し、U 型 96 ウェルプレートに $100 \mu\text{L}$ / ウェルを添加し、遠心分離し、上清を捨て、勾配希釈抗体 (初期濃度 1800 nM 、3 倍希釈、11 個の勾配) $100 \mu\text{L}$ / ウェルを添加し、4℃で 60 分間インキュベートした。二次抗体として Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ヒト IgG Fc (1:300 希釈) $50 \mu\text{L}$ / ウェルを添加し、20 分間氷浴し、1 回洗浄した後 PI $50 \mu\text{L}$ / ウェルを添加し、5 分間インキュベートし、フローサイトメトリー (BD Celesta) により検出した。検出結果を図 18 に示し、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体は、低親和力でヒト末梢血 T 細胞に結合した。

【0326】

【表 17】

表 17、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体の末梢血 T 細胞への結合

EC ₅₀ (nM)	CD4+ T cell	CD8+ T cell
GPC3×CD3 κλ002	65	65
GPC3×CD3 κλ003	56	69
KLH×CD3	77	84

【0327】

実施例 5、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体による TDCC 作用

新鮮な単離された PBMC を取り、それぞれ対数増殖期にある標的細胞 HepG2 細胞と混合し、エフェクター細胞 / 標的細胞 = 10:1 であり、勾配希釈抗体 (抗体濃度を 66.7 nM から 7 個の勾配で 10 倍希釈された) $50 \mu\text{L}$ / ウェルを添加し、5% CO₂、37℃で 24 時間培養した。培養終了後、上清 $50 \mu\text{L}$ を新しい黒イミュノプレートに移し、LDH の検出基質 $50 \mu\text{L}$ / ウェルを添加し、10 分間後反応を終了させ、LDH の放出を検出した。ウェル内の残りの細胞を 4%ウシ血清で 2 回洗浄した後、ヒト IgG $100 \mu\text{g/mL}$ を添加し、10 分間インキュベートし、T 細胞活性化検出用抗体 (CD25-BV421, CD4-FITC, CD69-BV605 及び CD8-APC) をさらに添加し、氷上で 20 分間インキュベートした。洗浄し、上清を捨て、PI $60 \mu\text{L}$ / ウェルを添加し、氷の上に置いて 5 分間インキュベートし、フローサイトメトリーにより検出した。図 19 に示されるように、インビトロでの活性試験において、GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体は、HepG2 細胞に対する最大殺傷率が対照抗体と比較して若干高いか又は同等であるが (図 19A)、TDCC 過程中的 T 細胞 CD69 (初期活性化) 及び CD25 (後期活性化) の変化は、いずれも、GPC3×CD3 κλ 二重特異性抗体による T 細胞の活性化において、対照抗体よりも穏やかであることを示唆した。

【0328】

実施例 6: GPC3×CD3 κλ 二重特異的抗体による T 細胞活化経路の活性化

対数増殖期にある標的細胞CHO-hGPC3を取り、遠心分離し、上清を捨て、 2×10^5 個の細胞/mLに再懸濁した。標的細胞50μL/ウェルを96ウェルプレートに接種し、5%CO₂、37℃で一晩培養した。対数増殖期にあるJurkat-NFAT-lucレポーター細胞を取り、300gで5分間遠心分離し、上清を捨て、 4×10^6 細胞/mLに再懸濁し、96ウェルプレートを取り出し、上清を捨て、Jurkat-NFAT-lucレポーター細胞25μL/ウェルを96ウェルプレートに接種し、各ウェルに勾配希釈されたGPC3×CD3κλ二重特異的抗体又は対照抗体KLH×CD3（初期濃度20μg/mL、3倍希釈、10個の勾配）25μLを添加し、5%CO₂、37℃で6時間培養した。培養終了後、ONE-Glo Luciferase Assay System取扱説明書に従い、各ウェルに検出用試薬100μLを添加し、マイクロプレートリーダー（MD SpectraMax i3x）により検出した。検出結果を図20に示し、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体は、CHO-hGPC3を標的細胞とする場合、T細胞のNFATシグナル経路を活性化させることができるが、活性化程において対照抗体より僅か低かった。

10

【0329】

実施例7、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体によるPBMCの非特異的活性化

新鮮な単離されたPBMCを取り、抗体（10μg/mL）100μLを添加し、5%CO₂、37℃で24時間培養した。ウェル内の細胞を4%ウシ血清で2回洗浄した後、ヒトIgG100μg/mLを添加し、10分間インキュベートし、T細胞活性化検出用抗体（CD25-BV421、CD4-FITC、CD69-BV605及びCD8-APC）をさらに添加し、氷上で20分間インキュベートした。洗浄し、上清を捨て、PI60μL/ウェルを添加し、氷の上に置いて5分間インキュベートし、フローサイトメトリにより検出した。検出結果を図21に示し、標的細胞が存在しない条件で、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体は、末梢血T細胞に対して活性化作用を有せず、陰性対照KLH×CD3に相当した。

20

【0330】

実施例8：GPC3×CD3κλ二重特異的抗体のFc受容体への結合

アミノ基によりHis-Tag抗体50μg/mLをCM5チップにカップリングし、それぞれHisタグ付きFcγRI、FcγRIIAH131及びFcγRIIIA_{V158}組換えタンパク質（Sino Biological、#10256-H08H/10374-H08H1/10389-H08H1）を捕捉し、捕捉時間は、40秒間であり、流速は、10μL/minであり、ベースラインが安定化した後、勾配希釈抗体（初期濃度37.5μg/mL、2倍の希釈）を30μL/minの流速でチップを流し、結合時間は、120秒間であり、解離時間は、200秒間であり、Biacore evaluationソフトウェアでフィッティングし、親和力定数が得られた。図22から分かるように、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体は、FcγRI、FcγRIIAH131やFcγRIIIA_{V158}に結合せず、野生型IgG4対照抗体は、比較的強い親和力でFcγRIに結合し、FcγRIIAH131にわずかに弱く結合した。

30

【0331】

実施例9、免疫再構築マウス皮下HepG2移植腫瘍モデル

6～8週齢B-NGDメスマウス（Biocytogen Pharmaceuticals Co., Ltd.）を選択し、皮下にHepG2細胞（ 7×10^6 /匹）を接種し、腫瘍が60～100mm³に達すると、無作為に群分けし、それぞれ投与群3.0mg/kg、投与群1.0mg/kg、投与群0.3mg/kg及び陰性対照群KLH×CD3 3mg/kgとした。マウス1匹あたりPBMC細胞 1×10^7 個を尾静脈に注射し、3日後、1回目のマウス投与を始め、投与間隔は、5日に1回であり、合計2回投与した。マウスの腫瘍体積及びマウスの体重をモニターし、実験終了後、マウスを頸椎脱臼で殺し、腫瘍を秤量し、記録した。結果を図23に示し、GPC3×CD3κλ二重特異性抗体は、インビボでの薬効が用量依存性を示し、腫瘍阻害率がそれぞれ76.7%、81.3%及び95.9%であった。腫瘍担持マウスは、上記用量に対して良好な容認性

40

50

を示し、体重減少などの悪影響を示なかった。

【0332】

実施例10、CD3ヒト化マウスHepa1-6/hGPC3移植腫瘍モデル

6週齢のメスC57/BL6-hCD3マウス(Biocytogen Pharmaceuticals Co., Ltd.)を選択し、Hepa1-6/hGPC3(6×10^6 /匹)をマウスの皮下に接種し、腫瘍体積が $60 \sim 100 \text{ mm}^3$ に達すると、無作為に群分けした。それぞれ投与群10mg/kg、投与群3mg/kg、投与群1mg/kg及び陰性対照群KLH×CD3 10mg/kgとした。投与間隔は、3日に1回であり、合計3回投与した。マウスの腫瘍体積およびマウスの体重をモニターし、実験終了後、マウスを細首で殺し、腫瘍を秤量し、記録した。結果を図24に示し、CD3ヒト化マウスモデルにおいて、GPC3×CD3κλ二重特異的抗体は、Hepa1-6/hGPC3腫瘍の増殖を顕著に抑制し、荷腫体積を減少することができた。

10

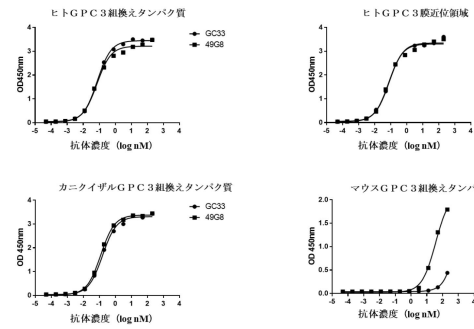
20

30

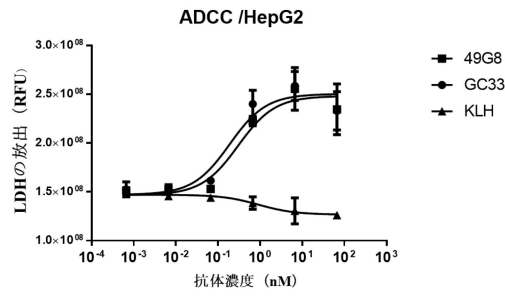
40

50

【図 5】



【図 6】

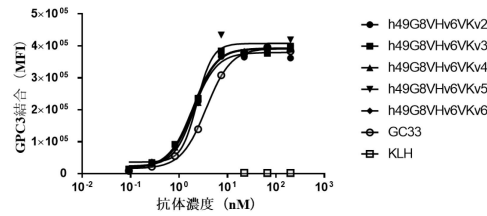


10

【図 7】

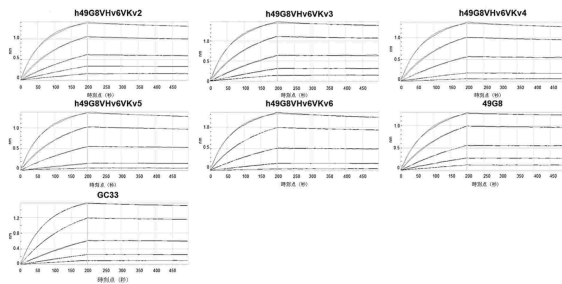


【図 8】

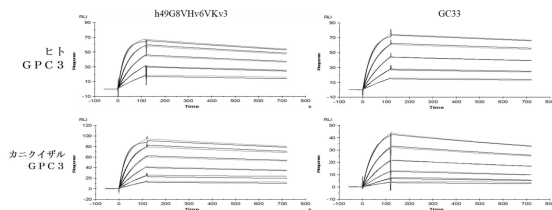


20

【図 9】



【図 10】

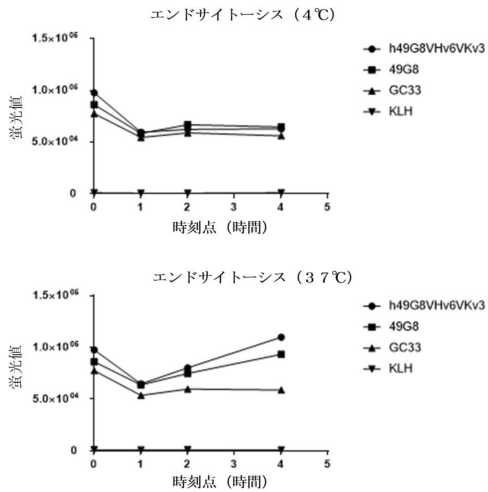


30

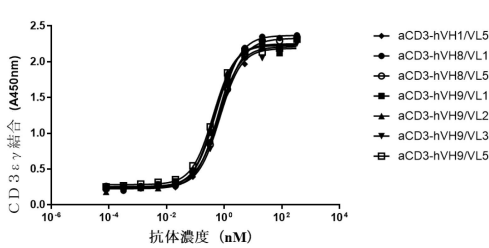
40

50

【図 1 1】

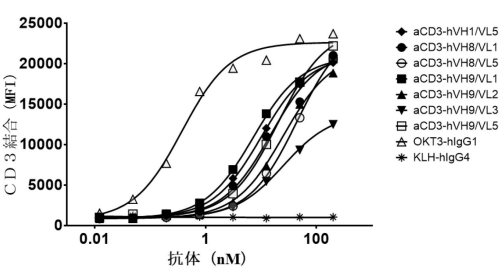


【図 1 2】

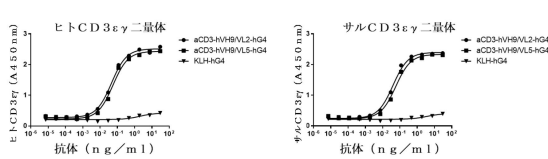


10

【図 1 3】



【図 1 4】



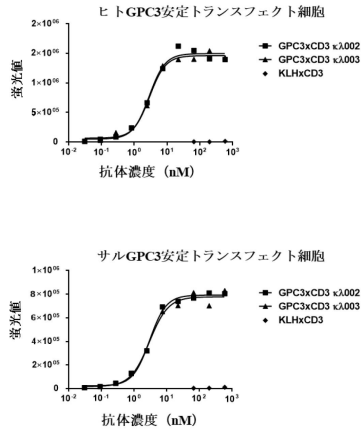
20

30

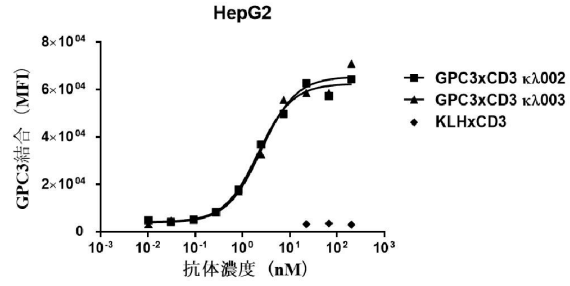
40

50

【図 1 5】

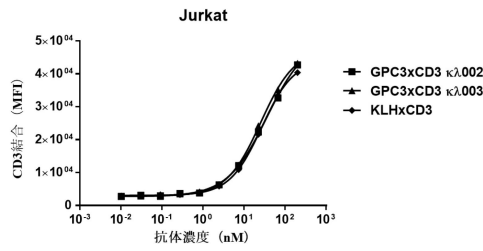


【図 1 6】

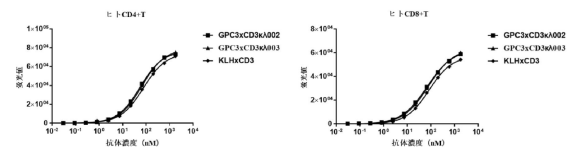


10

【図 1 7】

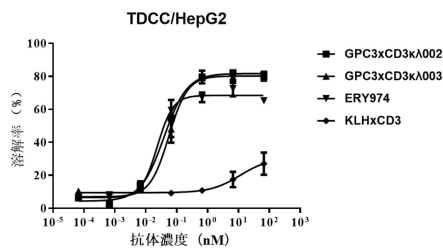


【図 1 8】

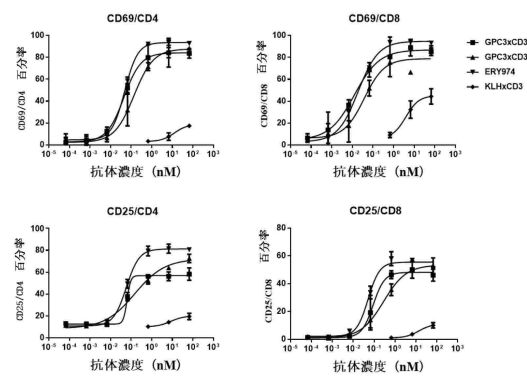


20

【図 1 9 A】



【図 1 9 B】

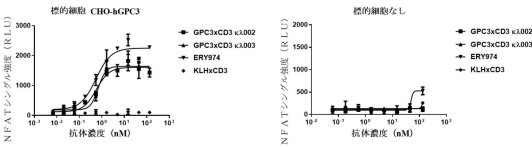


30

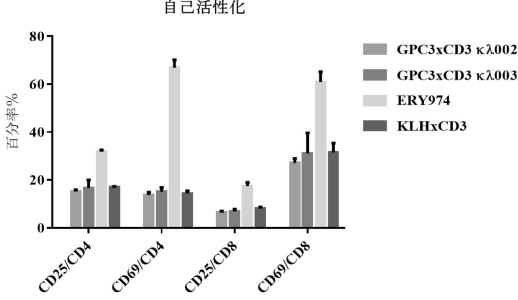
40

50

【図 2 0】

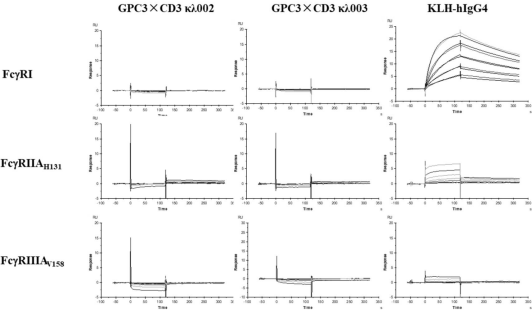


【図 2 1】

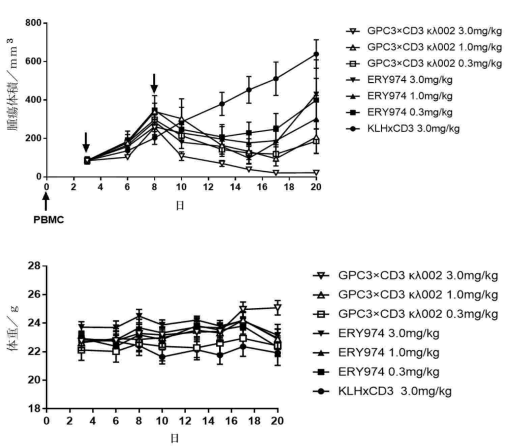


10

【図 2 2】

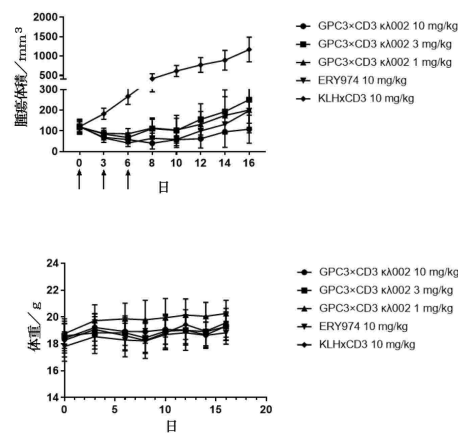


【図 2 3】



20

【図 2 4】



30

【配列表】

0007667857000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

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 0 7 K	1/107(2006.01)	C 0 7 K	1/107	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	51/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	51/10	1 0 0
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	14/415 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/415	
		C 0 7 K	14/52	

成都市双流区成都天府国际生物城中路18号D2号楼

(72)発明者 宋 芹

中華人民共和国、610219、四川省成都市双流区成都天府国际生物城中路18号D2号楼

審査官 福間 信子

(56)参考文献

中国特許出願公開第108383911 (CN, A)
中国特許出願公開第106591371 (CN, A)
国際公開第2018/131586 (WO, A1)
中国特許出願公開第106397593 (CN, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq