

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7659326号
(P7659326)

(45)発行日 令和7年4月9日(2025.4.9)

(24)登録日 令和7年4月1日(2025.4.1)

(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	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 L
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68
請求項の数 25 (全49頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-530617(P2022-530617)	(73)特許権者	504174180
(86)(22)出願日	令和3年6月10日(2021.6.10)		国立大学法人高知大学
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/022085		高知県高知市曙町二丁目5番1号
(87)国際公開番号	WO2021/251459	(74)代理人	110003557
(87)国際公開日	令和3年12月16日(2021.12.16)		弁理士法人レクシード・テック
審査請求日	令和6年2月16日(2024.2.16)	(72)発明者	仲 哲治
(31)優先権主張番号	特願2020-101856(P2020-101856)		岩手県紫波郡矢巾町医大通一丁目1番1号 学校法人岩手医科大学内
(32)優先日	令和2年6月11日(2020.6.11)	(72)発明者	世良田 聡
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		岩手県紫波郡矢巾町医大通一丁目1番1号 学校法人岩手医科大学内
		審査官	西 賢二
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヒト化抗GPC-1抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
ヒト化抗GPC-1抗体またはその抗原結合フラグメントであって、
それぞれ配列番号28～30に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1～CDR3を含み、かつ、
(a) それぞれ配列番号31～33に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または
(b) それぞれ配列番号37～39に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または
(c) それぞれ配列番号40～42に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または
(d) それぞれ配列番号43～45に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または
(e) それぞれ配列番号49～51に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または
(f) それぞれ配列番号55～57に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または
(g) それぞれ配列番号58～60に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、
ヒト化抗GPC-1抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

配列番号 7 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載のヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

配列番号 8、10、11、12、14、16、および 17 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項 1 または 2 に記載のヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

配列番号 8、10、11、12、14、16、および 17 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

前記抗体のエピトープが、配列番号 2 の 339～358 位および／もしくは 388～421 位を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

前記抗体が、表面プラズモン共鳴法による解析に基づき 1.02×10^{-8} 以下の K_D で Glypican-1 に結合する、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載のヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、有効成分を細胞内移行させるための医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載のヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメントと細胞傷害性活性を有する薬剤との複合体。

【請求項 9】

前記細胞傷害性活性を有する薬剤が、モノメチルアウリスタチン E (MMAE)、モノメチルアウリスタチン F (MMAF)、DM1、DM4、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD)、およびトポイソメラーゼ阻害剤からなる群から選択される、請求項 8 に記載の複合体。

【請求項 10】

前記細胞傷害性活性を有する薬剤が、細胞膜透過性である、請求項 8 または 9 に記載の複合体。

【請求項 11】

前記細胞傷害性活性を有する薬剤が、MMAE、PBD、Eribulin、SN-38、Dxd、および DM4 から選択される、請求項 8～10 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 12】

前記ヒト化抗 GPC-1 抗体またはその抗原結合フラグメントが、前記細胞傷害性活性を有する薬剤とリンカーを介して作動可能に連結されている、請求項 8～11 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 13】

前記リンカーが、酵素切断型リンカー、酸不安定性リンカー、およびジスルフィドリンカーからなる群から選択される、請求項 12 に記載の複合体。

【請求項 14】

前記リンカーが、カテプシン B により切断される切断型リンカーである、請求項 12 または 13 に記載の複合体。

【請求項 15】

前記複合体が、G l y p i c a n - 1陽性細胞において、約0.1 nM以下のI C 5 0を示す、請求項8～14のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項16】

請求項8～15のいずれか一項に記載の複合体を含む、G l y p i c a n - 1陽性がんを予防または治療するための組成物。

【請求項17】

前記G l y p i c a n - 1陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がんまたはこれらの任意の組合せから選択される、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

前記G l y p i c a n - 1陽性がんは、食道がんまたは膵臓がんである、請求項16または17に記載の組成物。

【請求項19】

前記G l y p i c a n - 1陽性がんは、がん関連線維芽細胞（C A F）を有する、請求項16～18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項20】

前記組成物が、免疫チェックポイント阻害剤と一緒に投与されることを特徴とする、請求項16～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項21】

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗P D - 1抗体である、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

請求項8～15のいずれか一項に記載の複合体を含む、G l y p i c a n - 1陽性がんの転移性がんを予防または治療するための組成物。

【請求項23】

前記G l y p i c a n - 1陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がん、またはこれらの任意の組合せから選択される、請求項22に記載の組成物。

【請求項24】

前記転移性がんが、膵臓がんの転移性がんである、請求項22または23に記載の組成物。

【請求項25】

前記転移性がんが、肝臓、食道、胆管、子宮頸、肺、頭頸部、乳房、子宮平滑筋、前立腺、口腔扁平上皮、脳、骨、腹膜、または副腎に転移した転移性がんである、請求項22～24のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、G l y p i c a n - 1（G P C - 1）に特異的に結合するヒト化抗体、ならびに関連する技術、方法、および薬剤等に関する。

【背景技術】

【0002】

G l y p i c a n - 1分子は、正常細胞よりも食道がん細胞において有意に強く発現されており、腫瘍マーカーとして使用され得ることが見出された（特許文献1）。また、G l y p i c a n - 1に対して特異的に結合する抗体も単離されている（特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】国際公開第2015／098112号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

1つの局面において、本開示は、GPC-1に対して高い親和性を有し、かつGPC-1陽性細胞において高いインターナライズ活性を有するヒト化抗GPC-1モノクローナル抗体を提供する。ヒト化された抗GPC-1抗体は、これまでに開発されておらず、しかも、ヒト化抗GPC-1抗体が高い活性を有することは予測されていなかった。本開示の抗体は様々な治療用途に使用され得る。

【0005】

したがって、別の局面では、本開示は、ヒト化抗GPC-1モノクローナル抗体と細胞傷害活性を有する薬剤との複合体を含む、Glypican-1陽性がんを予防または治療するための組成物も提供する。

【0006】

このような抗体またはそのフラグメントはコンパニオン診断薬およびコンパニオン診断薬と組み合わせた標的化治療または個別化医療などとして応用可能である。

【0007】

以上より、本開示は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む抗体に基づきヒト化されたヒト化抗GPC-1抗体またはその抗原結合フラグメントであって、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む抗体と比べて、GPC-1に対して高い親和性を有する、ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目2)

前記ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントが、

(a) それぞれ配列番号28～30に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1～3を含む、または

(b) (a)における重鎖CDR1～3において3個以下のアミノ酸置換、欠失および／または付加を有する、

項目1に記載の組成物。

(項目3)

前記ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントが、

(a) それぞれ配列番号31～33に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(b) それぞれ配列番号34～36に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(c) それぞれ配列番号37～39に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(d) それぞれ配列番号40～42に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(e) それぞれ配列番号43～45に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(f) それぞれ配列番号46～48に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(g) それぞれ配列番号49～51に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(h) それぞれ配列番号52～54に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(i) それぞれ配列番号55～57に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CDR3を含む、または

(j) それぞれ配列番号58～60に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1～CD

10

20

30

40

50

R 3を含む、または

(k) それぞれ配列番号 6 1 ~ 6 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(l) それぞれ配列番号 6 4 ~ 6 6 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(m) それぞれ配列番号 6 7 ~ 6 9 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(n) それぞれ配列番号 7 0 ~ 7 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(o) それぞれ配列番号 7 3 ~ 7 5 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(p) それぞれ配列番号 7 6 ~ 7 8 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(q) それぞれ配列番号 7 9 ~ 8 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(r) それぞれ配列番号 8 2 ~ 8 4 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(s) それぞれ配列番号 8 5 ~ 8 7 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(t) それぞれ配列番号 8 8 ~ 9 0 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ~ C D R 3を含む、または

(u) (a) ~ (t) のいずれかにおける軽鎖 C D R 1 ~ 3 において 3 個以下のアミノ酸置換、欠失および／または付加を有する、

項目 1 または 2 に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 4)

配列番号 7 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 5)

配列番号 8 ~ 2 7 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 6)

配列番号 8 ~ 2 7 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 7)

配列番号 8 ~ 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 8)

配列番号 8 ~ 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 9)

前記抗体のエピトープが、配列番号 2 の 3 3 9 ~ 3 5 8 位および／もしくは 3 8 8 ~ 4 2 1 位を含む、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 1 0)

前記抗体が、表面プラズモン共鳴法による解析に基づき 1.02×10^{-8} 以下の K_D で G L

10

20

30

40

50

ypican-1に結合する、項目1～9のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目11)

項目1～10のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、有効成分を細胞内移行させるための医薬組成物。

(項目12)

項目1～10のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントと細胞傷害性活性を有する薬剤との複合体。

(項目13)

前記ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントが、前記細胞傷害性活性を有する薬剤とリンカーを介して作動可能に連結されている、項目12に記載の複合体。

10

(項目14)

前記細胞傷害性活性を有する薬剤が、モノメチルアウリスタチンE (MMAE)、モノメチルアウリスタチンF (MMAF)、DM1、DM4、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD)、およびトポイソメラーゼ阻害剤からなる群から選択される、項目12または13に記載の複合体。

(項目15)

前記細胞傷害性活性を有する薬剤が、細胞膜透過性である、項目13または14に記載の複合体。

(項目16)

20

前記細胞傷害性活性を有する薬剤が、MMAE、PBD、Eribulin、SN-38、Dxd、およびDM4から選択される、項目13～15のいずれか一項に記載の複合体。

(項目17)

前記リンカーが、酵素切断型リンカー、酸不安定性リンカー、およびジスルフィドリンカーからなる群から選択される、項目13～16のいずれか一項に記載の複合体。

(項目18)

前記リンカーが、カテプシンBにより切断される切断型リンカーである、項目13～17のいずれか一項に記載の複合体。

(項目19)

30

前記複合体が、Glypican-1陽性細胞において、約0.1 nM以下のIC₅₀を示す、項目12～18のいずれか一項に記載の複合体。

(項目20)

項目12～19のいずれか一項に記載の複合体を含む、Glypican-1陽性がんを予防または治療するための組成物。

(項目21)

前記Glypican-1陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がんまたはこれらの任意の組合せから選択される、項目20に記載の組成物。

(項目22)

40

前記Glypican-1陽性がんは、食道がんまたは膵臓がんである、項目20または21に記載の組成物。

(項目23)

前記がんは、がん関連線維芽細胞 (CAF) を有する、項目20～22のいずれか一項に記載の組成物。

(項目24)

前記組成物が、免疫チェックポイント阻害剤と一緒に投与されることを特徴とする、項目20～23のいずれか一項に記載の組成物。

(項目25)

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗PD-1抗体である、項目24に記載の組成物。

50

(項目 2 6)

項目 1 2 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の複合体を含む、G l y p i c a n - 1 陽性がんの転移性がんを予防または治療するための組成物。

(項目 2 7)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がん、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 2 6 に記載の組成物。

(項目 2 8)

前記転移性がんが、膵臓がんの転移性がんである、項目 2 6 または 2 7 に記載の組成物。

(項目 2 9)

前記転移性がんが、肝臓、食道、胆管、子宮頸、肺、頭頸部、乳房、子宮平滑筋、前立腺、口腔扁平上皮、脳、骨、腹膜、または副腎に転移した転移性がんである、項目 2 6 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 A)

有効成分を細胞内移行させる方法であって、項目 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントを細胞に投与する工程を含む、方法。

(項目 2 A)

被験体における G l y p i c a n - 1 陽性がんを予防または治療する方法であって、項目 1 2 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の複合体を被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目 3 A)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がんまたはこれらの任意の組合せから選択される、項目 2 A に記載の方法。

(項目 4 A)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がんまたは膵臓がんである、項目 2 A または 3 A に記載の方法。

(項目 5 A)

前記がんは、がん関連線維芽細胞 (C A F) を有する、項目 2 A ～ 4 A のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 A)

免疫チェックポイント阻害剤を投与する工程をさらに含む、項目 2 A ～ 5 A のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 A)

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗 P D - 1 抗体である、項目 6 A に記載の方法。

(項目 8 A)

被験体における G l y p i c a n - 1 陽性がんの転移性がんを予防または治療する方法であって、項目 1 2 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の複合体を被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目 9 A)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がん、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 8 A に記載の方法。

(項目 1 0 A)

前記転移性がんが、膵臓がんの転移性がんである、項目 8 A または 9 A に記載の方法。

(項目 1 1 A)

前記転移性がんが、肝臓、食道、胆管、子宮頸、肺、頭頸部、乳房、子宮平滑筋、前立腺、口腔扁平上皮、脳、骨、腹膜、または副腎に転移した転移性がんである、項目 8 A ～ 1 0 A のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 B)

有効成分を細胞内移行させるための医薬の製造における、項目 1 ～ 1 0 のいずれか一項

10

20

30

40

50

に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントの使用。

(項目 2 B)

被験体における G l y p i c a n - 1 陽性がんを予防または治療するための医薬の製造における、項目 1 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の複合体の使用。

(項目 3 B)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がんまたはこれらの任意の組合せから選択される、項目 2 B に記載の使用。

(項目 4 B)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がんまたは膵臓がんである、項目 2 B または 3 B に記載の使用。

(項目 5 B)

前記がんは、がん関連線維芽細胞 (C A F) を有する、項目 2 B ~ 4 B のいずれか一項に記載の使用。

(項目 6 B)

前記複合体が、免疫チェックポイント阻害剤と一緒に投与されることを特徴とする、項目 2 B ~ 5 B のいずれか一項に記載の使用。

(項目 7 B)

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗 P D - 1 抗体である、項目 6 B に記載の使用。

(項目 8 B)

被験体における G l y p i c a n - 1 陽性がんの転移性がんを予防または治療するための医薬の製造における、項目 1 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の複合体の使用。

(項目 9 B)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がん、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 8 B に記載の使用。

(項目 1 0 B)

前記転移性がんが、膵臓がんの転移性がんである、項目 8 B または 9 B に記載の使用。

(項目 1 1 B)

前記転移性がんが、肝臓、食道、胆管、子宮頸、肺、頭頸部、乳房、子宮平滑筋、前立腺、口腔扁平上皮、脳、骨、腹膜、または副腎に転移した転移性がんである、項目 8 B ~ 1 0 B のいずれか一項に記載の使用。

(項目 1 C)

有効成分を細胞内移行させるための、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 2 C)

被験体における G l y p i c a n - 1 陽性がんを予防または治療するための、項目 1 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の複合体。

(項目 3 C)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がんまたはこれらの任意の組合せから選択される、項目 2 C に記載の複合体。

(項目 4 C)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がんまたは膵臓がんである、項目 2 C または 3 C に記載の複合体。

(項目 5 C)

前記がんは、がん関連線維芽細胞 (C A F) を有する、項目 2 C ~ 4 C のいずれか一項に記載の複合体。

(項目 6 C)

前記複合体が、免疫チェックポイント阻害剤と一緒に投与されることを特徴とする、項

10

20

30

40

50

目 2 C ~ 5 C のいずれか一項に記載の複合体。

(項目 7 C)

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗 P D - 1 抗体である、項目 6 C に記載の複合体。

(項目 8 C)

被験体における G l y p i c a n - 1 陽性がんの転移性がんを予防または治療するための、項目 1 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の複合体。

(項目 9 C)

前記 G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がん、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 8 C に記載の複合体。

(項目 1 0 C)

前記転移性がんが、膵臓がんの転移性がんである、項目 8 C または 9 C に記載の複合体。

(項目 1 1 C)

前記転移性がんが、肝臓、食道、胆管、子宮頸、肺、頭頸部、乳房、子宮平滑筋、前立腺、口腔扁平上皮、脳、骨、腹膜、または副腎に転移した転移性がんである、項目 8 C ~ 1 0 C のいずれか一項に記載の複合体。

【 0 0 0 8 】

本開示において、上記 1 または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせ提供されることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本開示によれば、臨床応用可能なヒト化抗 G l y p i c a n - 1 抗体が提供される。このような抗体は、G l y p i c a n - 1 陽性がんの診断・コンパニオン治療に使用される検出剤として利用することができ、さらに、当該抗体と薬物との複合体は、G l y p i c a n - 1 陽性がんの治療に極めて有効である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】図 1 は、B i a c o r e (登録商標) により測定された 2 0 種類のクローンの平衡解離定数 (K_D) を示す。

【図 2】図 2 は、実施例 2 の A D C アッセイの概略図を示す。

【図 3】図 3 は、T E 1 4 細胞株における 2 0 種類のクローンの細胞傷害活性 (IC_{50}) の結果を示す。

【図 4】図 4 は、抗 G P C - 1 キメラ抗体 (0 1 a 0 3 3) およびクローン T 2 の F A C S による抗原親和性解析の結果を示す。

【図 5】図 5 は、例示的な A D C の構造の概略図を示す。

【図 6】図 6 は、D r u g - t o - A n t i b o d y R a t i o (DAR) の設定の概略図を示す。

【図 7】図 7 は、ヒト化 G P C 1 - A D C と未標識抗体の F A C S による抗原親和性解析の結果を示す。

【図 8】図 8 は、ヒト化抗 G P C - 1 抗体 (c l o n e T 2) およびヒト化 G P C 1 - A D C (MMAE) の細胞内インターナライゼーションアッセイの結果を示す。緑は G P C 1 の染色、赤は C D 1 0 7 a の染色、青は D A P I の染色を示す。スケールは $10 \mu m$ を示す。グラフにおける各群の左のバーは $4^\circ C$ を示し、右のバーは $37^\circ C$ を示す。

【図 9】図 9 は、各種細胞株における F A C S による G P C 1 発現解析の結果を示す。

【図 1 0】図 1 0 は、ヒト化 G P C 1 - A D C (MMAE) を用いた i n v i t r o A D C アッセイの結果を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、H e L a、D e t r o i t 5 6 2、F a D u 細胞株における G P C 1 発現解析および A D C アッセイの結果を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、H o - 1 - u - 1、K O S C 2 c l 3 - 4 3、K O N 細胞株にお

10

20

30

40

50

けるGPC1発現解析およびADCアッセイの結果を示す。

【図13】図13は、GPC1発現が不均一（heterogeneous）である膵臓がんPDX（PK565）を用いたヒト化GPC1-ADC（MMAE）のin vivoでの薬効試験の結果を示す。いずれの群においても体重変化に大きな変化はなかった。ヒト化GPC1-ADC（10mg/kg）において腫瘍体積はほぼ変化せず、ヒト化GPC1-ADC（3mg/kg）ではわずかに増加し、次にヒト化GPC-ADC（1mg/kg）およびControl-ADC（10mg/kg）において増加し、ほぼ同じ大きさであり、Vehicle controlにおいて増加し、最も大きかった。

【図14】図14は、GPC1ががん細胞とCAFの両方で発現している膵臓がんPDX（PK175）を用いたヒト化GPC1-ADC（MMAE）のin vivoでの薬効試験の結果を示す。体重は、ヒト化GPC1-ADC（10mg/kg）およびヒト化GPC1-ADC（3mg/kg）においてわずかに増加した。ヒト化GPC-ADC（1mg/kg）およびVehicle controlでは大きな変化はなかった。ヒト化GPC1-ADC（10mg/kg）において腫瘍体積は減少し、最も小さく、ヒト化GPC1-ADC（3mg/kg）ではわずかに増加し、次にヒト化GPC-ADC（1mg/kg）およびVehicle controlは徐々に増大し、Vehicle controlが最も大きかった。

【図15】図15は、GPC1が均一に高発現する食道がんPDX（ESCC14）を用いたヒト化GPC1-ADC（MMAE）のin vivoでの薬効試験の結果を示す。体重はいずれの群においても大きな変動がなかった。腫瘍体積は、ヒト化GPC1-ADC（10mg/kg）およびヒト化GPC1-ADC（3mg/kg）において同等で、最も小さく、次にヒト化GPC-ADC（1mg/kg）は、ほぼ横ばいであり、Vehicle controlは徐々に増大した。

【図16】図16は、mGPC1強制発現マウス大腸がん細胞株（mGPC1-MC38）におけるGPC1発現解析およびADCアッセイの結果を示す。

【図17】図17は、ELISAによる培養上清中のHMGB-1の定量結果を示す。

【図18】図18は、大腸がんシンジェニックモデルマウスを用いたヒト化GPC1-ADC（MMAE）と抗PD1抗体の併用による抗腫瘍効果の結果を示す。体重はいずれの群においても大きな変動がなかった。腫瘍体積は、ヒト化GPC1-ADC（10mg/kg）+anti-PD1 Ab（3mg/kg）において最も小さく、anti-PD1 Ab（3mg/kg）、ヒト化GPC1-ADC（10mg/kg）、Vehicle controlの順に大きくなった。

【図19】図19は、膵臓がんPDX（PK565）におけるG2/M期細胞周期マーカー（phospho-Histone H3（Ser10））の測定結果を示す。スケールバーは、100μmを示す。Dunnett's post hoc testの後のone-way ANOVA、**P<0.01。

【図20】図20は、膵臓がん遠隔転移組織における免疫組織化学染色法によるGPC1発現の解析結果を示す。スケールバーは100μmを示す。

【図21】図21は、膵臓がん肝転移モデルの作製とヒト化GPC1-ADCによる薬効試験の概要を示す。i.v.投与を0日目、3日目、7日目および10日目に行った。IVIS計測を0日目、7日目、14日目、21日目、28日目、35日目、42日目および49日目に行った。

【図22】図22は、膵臓がん肝転移モデルにおけるヒト化GPC1-ADCによる薬効試験の結果を示す。PBS投与群：n=13，GPC1-ADC 10mg/kg投与群：n=10，*：p<0.05，**：p<0.01。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本開示を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、そ

10

20

30

40

50

の複数形概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。「約」は、示される値の±10%を意味する。

【0012】

（定義）

最初に本開示において使用される用語および一般的な技術を説明する。

【0013】

本明細書において、「Glypican-1」、「GPC-1」または「GPC1」は、交換可能に使用される用語であり、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型細胞表面プロテオグリカンであり、ヘパラン硫酸を有するものである。細胞接着、移動、リポタンパク質代謝、増殖因子活性調節および血液凝固抑止に関連するとされている。いくつかの線維芽細胞増殖因子（FGF）、例えば、FGF-1、FGF-2およびFGF-7に結合するといわれる。Glypican-1は、VEGF165の細胞外シャペロンとして機能し、酸化後のレセプター結合能を回復することを支援するとされる。Glypicanは現在のところGlypican-1~Glypican-6の6種類が知られているが、がんとの関係ではGlypican-ファミリーメンバーであるからといっても必ずがんマーカーであると認識されているものではなく、メンバー相互は無関係であるようである。Glypican-1は、UniProtにアクセッション番号P35052として登録されており（<http://www.uniprot.org/uniprot/P35052>を参照）、このほか、NCBIでは、NP_002072.2（前駆体アミノ酸配列）、NM_002081.2（mRNA）、EMBL、GenBankおよびDDBJでは、X54232.1（mRNA）、BC051279.1（mRNA）、AC110619.3（genomic）として登録されている。これらはいずれも、本明細書において利用することができる情報であり、その情報を本明細書において参考として援用する。Glypican-1については、David G et al., J Cell Biol. 1990 Dec;111(6 Pt 2):3165-76; Haecker U et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jul;6(7):530-41; Aikawa T et al., J Clin Invest. 2008 Jan;118(1):89-99.; Matsuda K, et al., Cancer Res. 2001 Jul 15;61(14):5562-9.等を参照。ヒトGlypican-1の核酸配列（全長）は、配列番号1が代表例であり、アミノ酸配列は配列番号2が代表例である。また、マウスGlypican-1の核酸配列（全長）は、配列番号3が代表例であり、アミノ酸配列は配列番号4が代表例である。本明細書の目的で使用される場合は、「Glypican-1」、「GPC-1」または「GPC1」は、本開示の具体的な目的に合致する限り、特定の配列番号またはアクセッション番号に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク質（あるいはそれをコードする核酸）のみならず、機能的に活性なその類似体もしくは誘導体、または機能的に活性なそのフラグメント、またはその相同体、または高ストリンジェンシー条件または低ストリンジェンシー条件下で、このタンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする核酸にコードされる変異体もまた、本開示において用いることができることが理解される。

【0014】

本明細書で使用される「誘導体」、「類似体」または「変異体」は、好ましくは、限定を意図するものではないが、対象となるタンパク質（例えば、Glypican-1、抗体）に実質的に相同な領域を含む分子を含み、このような分子は、種々の実施形態において、同一サイズのアミノ酸配列にわたり、または当該分野で公知のコンピュータ相同性プログラムによってアラインメントを行ってアラインされる配列と比較した際、少なくとも

10

20

30

40

50

30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるか、あるいはこのような分子をコードする核酸は、（高度に）ストリンジェントな条件、中程度にストリンジェントな条件、またはストリンジェントでない条件下で、構成要素タンパク質をコードする配列にハイブリダイズ可能である。これは、それぞれ、アミノ酸置換、欠失および付加によって、タンパク質を改変した産物であり、その誘導体がなお元のタンパク質の生物学的機能を、必ずしも同じ度合いでなくてもよいが示すタンパク質を意味する。例えば、本明細書において記載されあるいは当該分野で公知の適切で利用可能な *in vitro* アッセイによって、このようなタンパク質の生物学的機能を調べることも可能である。本明細書で使用される「機能的に活性な」は、本明細書において、本開示のポリペプチド、すなわちフラグメントまたは誘導体が関連する態様に従って、生物学的活性などの、タンパク質の構造的機能、制御機能、または生化学的機能を有する、ポリペプチド、すなわちフラグメントまたは誘導体を指す。

【0015】

本開示では、Glypican-1についてヒトが主に論じられるが、チンパンジー（*Pan troglodytes*）（K7B6W5）、アカゲザル（*Macaca mulatta*）（F6VPW9）、マウス（*Mus musculus*）（Q9QZF2）、ラット（*Rattus norvegicus*）（P35053）、ニワトリ（*Gallus gallus*）（F1P150）等、ヒト以外の多くの動物がGlypican-1タンパク質を発現していることが知られているため、これらの動物、特に哺乳動物についても、本開示の範囲内に入ることが理解される。好ましくは、Glypican-1の機能的ドメイン、例えば、細胞外ドメイン（約500アミノ酸であり、12のシステイン残基を含む）やC末端の疎水性領域（GPⅠ-アンカードメイン）は保存されていることが好ましい。

【0016】

本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）が包含される。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然アミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。本明細書において、「アミノ酸」は、アミノ基とカルボキシル基を持つ有機化合物の総称である。本開示の実施形態に係る抗体が「特定のアミノ酸配列」を含むとき、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が化学修飾を受けていてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が塩、または溶媒和物を形成していてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸がL型、またはD型であってもよい。それらのような場合でも、本開示の実施形態に係る蛋白質は、上記「特定のアミノ酸配列」を含むといえる。蛋白質に含まれるアミノ酸が生体内で受ける化学修飾としては、例えば、N末端修飾（例えば、アセチル化、ミリスチル化等）、C末端修飾（例えば、アミド化、グリコシルホスファチジルイノシトール付加等）、または側鎖修飾（例えば、リン酸化、糖鎖付加等）等が知られている。アミノ酸は、本開示の目的を満たす限り、天然のもので非天然のものでよい。

【0017】

本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチド

10

20

30

40

50

の誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rosolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。本明細書において「核酸」はまた、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。

【0018】

本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいい、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」をさすことがある。

【0019】

本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいい、一般に「相同性」を有するとは、同一性または類似性の程度が高いことをいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。従って本明細書において「相同体」または「相同遺伝子産物」は、本明細書にさらに記載する複合体のタンパク質構成要素と同じ生物学的機能を発揮する、別の種、好ましくは哺乳動物におけるタンパク質を意味する。このような相同体はまた、「オルソログ遺伝子産物」とも称されることもある。本開示の目的に合致する限り、このような相同体、相同遺伝子産物、オルソログ遺伝子産物等も用いることができることが理解される。

【0020】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフ

オルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST2・2.28(2013.4.2発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。類似性は、同一性に加え、類似のアミノ酸についても計算に入れた数値である。

【0021】

本開示の一実施形態において「90%以上」は、例えば、90、95、96、97、98、99、または100%以上であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。上記「相同性」は、2つもしくは複数間のアミノ酸配列において相同なアミノ酸数の割合を、当該技術分野で公知の方法に従って算定してもよい。割合を算定する前には、比較するアミノ酸配列群のアミノ酸配列を整列させ、同一アミノ酸の割合を最大にするために必要である場合はアミノ酸配列の一部に間隙を導入する。整列のための方法、割合の算定方法、比較方法、およびそれらに関連するコンピュータプログラムは、当該技術分野で従来からよく知られている(例えば、BLAST、GENETYX等)。本明細書において「相同性」は、特に断りのない限りNCBIのBLASTによって測定された値で表すことができる。BLASTでアミノ酸配列を比較するときのアルゴリズムには、Blastpをデフォルト設定で使用する。測定結果はPositivesまたはIdentitiesとして数値化される。

【0022】

本明細書において「機能的等価物」とは、対象となるもとの実体に対して、目的となる機能が同じであるが構造が異なる任意のものをいう。従って、「Glypican-1」またはその抗体の機能的等価物は、Glypican-1またはその抗体自体ではないが、Glypican-1またはその抗体の変異体または改変体(例えば、アミノ酸配列改変体等)であって、Glypican-1またはその抗体の持つ生物学的作用を有するもの、ならびに、作用する時点において、Glypican-1またはその抗体自体またはこのGlypican-1またはその抗体の変異体もしくは改変体に変化することができるもの(例えば、Glypican-1またはその抗体自体またはGlypican-1またはその抗体の変異体もしくは改変体をコードする核酸、およびその核酸を含むベクター、細胞等を含む)が包含されることが理解される。本開示において、Glypican-1またはその抗体の機能的等価物は、格別に言及していなくても、Glypican-1またはその抗体と同様に用いられうることが理解される。機能的等価物は、データベース等を検索することによって、見出すことができる。本明細書において「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))、FASTA(Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 2444-2448 (1988))、Smith and Waterman法(Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147: 195-197 (1981))、およびNeedleman and Wunsch法(Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ(マイクロアレイアッセイ)、PCRおよびin situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本開示において使用される遺伝子には、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

【0023】

本開示の機能的等価物としては、アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸

の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加されたものを用いることができる。本明細書において、「アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、あるいは天然の変異により、天然に生じ得る程度の複数個の数のアミノ酸の置換等により改変がなされていることを意味する。改変アミノ酸配列は、例えば1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～9個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～2個のアミノ酸の挿入、置換、もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加がなされたものであることができる。改変アミノ酸配列は、好ましくは、そのアミノ酸配列が、G l y p i c a n - 1のアミノ酸配列において1または複数個（好ましくは1もしくは数個または1、2、3、もしくは4個）の保存的置換を有するアミノ酸配列であってもよい。ここで「保存的置換」とは、タンパク質の機能を実質的に改変しないように、1または複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該分野において公知である。具体例を挙げると、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

【0024】

本開示の一実施形態において「抗G l y p i c a n - 1抗体」は、G l y p i c a n - 1に結合性を有する抗体を含む。この抗G l y p i c a n - 1抗体の生産方法は特に限定されないが、例えば、G l y p i c a n - 1を哺乳類または鳥類に免疫することによって生産してもよい。抗G l y p i c a n - 1抗体の「抗原結合フラグメント」とは、G l y p i c a n - 1に結合する能力を保持する抗体のフラグメントを指す。かかる抗原結合フラグメントとしては、以下に限定されないが、例えば、単鎖抗体、s c F v、F a bフラグメント、またはF (a b ')₂フラグメントなどが挙げられる。

【0025】

本開示の一実施形態に係る抗G l y p i c a n - 1抗体の抗体クラスは特に限定されないが、例えばI g M、I g D、I g G、I g A、I g E、またはI g Yであってもよい。

【0026】

本開示の一実施形態に係る抗G l y p i c a n - 1抗体は、抗原結合活性を有する抗体フラグメント（以下、「抗原結合性フラグメント」と称することもある）であっても良い。この場合、安定性または抗体の生産効率が上昇する等の効果がある。

【0027】

本開示の一実施形態に係る抗G l y p i c a n - 1抗体は、融合蛋白質であってもよい。この融合蛋白質は、抗G l y p i c a n - 1抗体のNまたはC末端に、ポリペプチドまたはオリゴペプチドが結合したものであってもよい。ここで、オリゴペプチドは、H i sタグであってもよい。

【0028】

本開示の一実施形態に係る抗G l y p i c a n - 1抗体は、例えば、精製G l y p i c a n - 1、G l y p i c a n - 1発現細胞、またはG l y p i c a n - 1含有脂質膜で生物を免疫する工程を経て得られる抗体であってもよい。G l y p i c a n - 1陽性がんに対する治療効果を高める観点からは、G l y p i c a n - 1発現細胞を免疫に使用することが好ましい。

【0029】

本開示の一実施形態に係る抗G l y p i c a n - 1抗体は、精製G l y p i c a n - 1

、G l y p i c a n - 1 発現細胞またはG l y p i c a n - 1 含有脂質膜で生物を免疫する工程を経て得られる抗体の、C D R セットを有する抗体であってもよい。G l y p i c a n - 1 陽性がんに対する治療効果を高める観点からは、G l y p i c a n - 1 発現細胞を免疫に使用することが好ましい。C D R セットとは、重鎖C D R 1、2、および3、並びに、軽鎖C D R 1、2、および3のセットである。

【0030】

本開示の一実施形態において「G l y p i c a n - 1 発現細胞」は、例えば、G l y p i c a n - 1 をコードするポリヌクレオチドを細胞に導入後、G l y p i c a n - 1 を発現させることによって得てもよい。ここでG l y p i c a n - 1 は、G l y p i c a n - 1 フラグメントを含む。また本開示の一実施形態において「G l y p i c a n - 1 含有脂質膜」は、例えば、G l y p i c a n - 1 と脂質二重膜を混合することによって得てもよい。ここでG l y p i c a n - 1 は、G l y p i c a n - 1 フラグメントを含む。また本開示の一実施形態に係る抗G l y p i c a n - 1 抗体は、G l y p i c a n - 1 陽性がんに対する治療効果を高める観点からは、抗原をニフトリに免疫する工程を経て得られる抗体、またはその抗体のC D R セットを有する抗体が好ましい。

【0031】

本開示の抗G l y p i c a n - 1 抗体は、目的を達成する限り、どのような結合力を有していてもよい。例えば、本開示の抗G l y p i c a n - 1 抗体は、G l y p i c a n - 1 に対して低い親和性を有していたとしても、インターナライゼーション活性および／またはA D C 活性を有していればよい。ただし診断やコンパニオン試薬目的では、強い結合能力があるほうが好ましい。例えば、K D 値 (k_d / k_a) が、 1.0×10^{-7} (M) 以下、 1.0×10^{-8} (M) 以下、 1.0×10^{-9} (M) 以下あるいは 1.0×10^{-10} (M) 以下でありうる。好ましくは、診断やコンパニオン試薬目的における抗G l y p i c a n - 1 抗体の結合力は、K D 値 (k_d / k_a) で 1.0×10^{-8} (M) 以下である。

【0032】

本開示の一実施形態に係る抗G l y p i c a n - 1 抗体は、G l y p i c a n - 1 の野生型または変異型に結合する抗体であってもよい。変異型とは、個体間のD N A 配列の差異に起因するものを含む。野生型または変異型のG l y p i c a n - 1 のアミノ酸配列は、配列番号2に示すアミノ酸配列に対し、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有している。

【0033】

本明細書において「抗体」は、抗原上の特定のエピトープに特異的に結合することができる分子またはその集団を含む。抗体は、様々な形態で存在することができ、例えば、全長抗体 (F a b 領域とF c 領域を有する抗体)、F v 抗体、F a b 抗体、F (a b ') 2 抗体、F a b ' 抗体、d i a b o d y、一本鎖 (単鎖) 抗体 (例えば、s c F v)、s c (F v) 2 (s i n g l e c h a i n (F v) 2)、s c F v - F c、d s F v、多価特異的抗体 (例えば、オリゴ特異的抗体、二価特異的抗体)、ダイアボディー、抗原結合性を有するペプチドまたはポリペプチド、キメラ抗体 (例えば、マウスーヒトキメラ抗体、ニフトリーヒトキメラ抗体等)、マウス抗体、ニフトリ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、またはそれらの同等物 (または等価物) からなる群から選ばれる1種以上の形態であってもよい。また抗体は、抗体修飾物または抗体非修飾物を含む。抗体修飾物は、抗体と、例えばポリエチレングリコール等の各種分子が結合していてもよい。抗体修飾物は、抗体に公知の手法を用いて化学的な修飾を施すことによって得ることができる。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。本開示で用いられる抗G l y p i c a n - 1 抗体は、G l y p i c a n - 1 のタンパク質に結合すればよく、その由来、種類、形状などは問われない。具体的には、非ヒト動物の抗体 (例えば、マウス抗体、ラット抗体、ラクダ抗体)、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などの公知の抗体が使用できる。抗体のG l y p i c a n - 1 タンパク質への結合は特異的な結合である

ことが好ましい。また抗体は、抗体修飾物または抗体非修飾物を含む。抗体修飾物は、抗体と、例えばポリエチレングリコール等の各種分子が結合していてもよい。抗体修飾物は、抗体に公知の手法を用いて化学的な修飾を施すことによって得ることができる。

【0034】

本開示の一実施形態において「モノクローナル抗体」は、集団を構成する個々の抗体が、少量自然に生じることが可能な突然変異を有する抗体を除いて、実質的に単一のエピトープに対応する抗体である場合を含む。または、集団を構成する個々の抗体が、少量自然に生じることが可能な突然変異を有する抗体を除いて、実質的に同一である抗体であってもよい。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、異なるエピトープに対応する異なる抗体を典型的に含むような、通常のポリクローナル抗体とは異なる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成できる点で有用である。「モノクローナル」という形容は、実質的に均一な抗体集団から得られるという特徴を示していてもよいが、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、モノクローナル抗体は、“Kohler G, Milstein C., Nature. 1975 Aug 7; 256 (5517): 495-497.”に掲載されているようなハイブリドーマ法と同様の方法によって作製してもよい。あるいは、モノクローナル抗体は、米国特許第4816567号に記載されているような組換え法と同様の方法によって作製してもよい。または、モノクローナル抗体は、“Clackson et al., Nature. 1991 Aug 15; 352 (6336): 624-628.”、または“Marks et al., J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222 (3): 581-597.”に記載されているような技術と同様の方法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。または、“タンパク質実験ハンドブック、羊土社(2003): 92-96.”に掲載されている方法によって作製してもよい。

【0035】

抗体の大量生産については、当該分野で公知の任意の手法を用いることができるが、例えば、代表的な抗体の大量生産系の構築および抗体製造としては、以下を例示することができる。すなわち、CHO細胞にH鎖抗体発現ベクターおよびL鎖抗体発現ベクターをトランスフェクションし、選択試薬であるG418およびZeocinを用いて培養を行い、限界希釈法によるクローニングを行う。クローニング後、安定的に抗体を発現しているクローンをELISA法により選択する。選択したCHO細胞を用いて拡大培養し、抗体を含む培養上清を回収する。回収した培養上清からProtein AもしくはProtein G精製により抗体を精製することができる。本開示のヒト化抗体は、ヒト抗体産生マウスに目的とする抗原を免疫するとポリクローナルな完全ヒト抗体を得ることができ、ここからモノクローナルな状態にしてから本開示において利用することができる。

【0036】

本開示の一実施形態において「ヒト化抗体」は、例えば、非ヒト種由来の1つ以上のCDR、およびヒト免疫グロブリン由来のフレームワーク領域(FR)、さらにヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有し、所望の抗原に結合する抗体である。抗体のヒト化は、当該技術分野で既知の種々の手法を使用して実施可能である(Almagro et al., Front Biosci. 2008 Jan 1; 13: 1619-1633.)。例えば、CDRグラフトイング(Ozaki et al., Blood. 1999 Jun 1; 93 (11): 3922-3930.)、Re-surfacing (Roguska et al., Proc Natl Acad Sci US A. 1994 Feb 1; 91 (3): 969-973.)、またはFRシャッフル(Damschroder et al., Mol Immunol. 2007 Apr; 44 (11): 3049-3060. Epub 2007 Jan 22.)などが挙げられる。抗原結合を改変するために(好ましくは改善するために)、ヒトFR領域のアミノ酸残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基と置換してもよい。このFR置換は、当該技術分野で周知の方法によって実施可能である(Riechmann et al., Nature.

1988 Mar 24; 332 (6162): 323-327.)。例えば、CDRとFR残基の相互作用のモデリングによって抗原結合に重要なFR残基を同定してもよい。または、配列比較によって、特定の位置で異常なFR残基を同定してもよい。ヒト化において、CDR内のアミノ酸を変更しなくてもよく、変更してもよい。上記に加えて、本開示の製造例に記載のとおりヒト化抗体を製造してもよい。具体的には、非ヒト由来の抗体のCDRをヒト重鎖フレームワークにグラフトイングした、重鎖が固定されたV κ ライブラリーから、スクリーニングされてもよい。このヒト化方法においては、重鎖CDRは変更されないが、軽鎖CDRは変更され得る。

【0037】

本開示の一実施形態において「重鎖」は、典型的には、全長抗体の主な構成要素である。重鎖は、通常、軽鎖とジスルフィド結合および非共有結合によって結合している。重鎖のN末端側のドメインには、同種の同一クラスの抗体でもアミノ酸配列が一定しない可変領域(VH)と呼ばれる領域が存在し、一般的に、VHが抗原に対する特異性、親和性に大きく寄与していることが知られている。例えば、“Reiter et al., J Mol Biol. 1999 Jul 16; 290 (3): 685-98.”にはVHのみの分子を作製したところ、抗原と特異的に、高い親和性で結合したことが記載されている。さらに、“Wolfson W, Chem Biol. 2006 Dec; 13 (12): 1243-1244.”には、ラクダの抗体の中には、軽鎖を持たない重鎖のみの抗体が存在していることが記載されている。

【0038】

本開示の一実施形態において「CDR (相補性決定領域)」は、抗体において、実際に抗原に接触して結合部位を形成している領域である。一般的にCDRは、抗体のFv (可変領域: 重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含む)上に位置している。また一般的にCDRは、5~30アミノ酸残基程度からなるCDR1、CDR2、CDR3が存在する。そして、特に重鎖のCDRが抗体の抗原への結合に寄与していることが知られている。またCDRの中でも、CDR3が抗体の抗原への結合における寄与が最も高いことが知られている。例えば、“Willy et al., Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 356, Issue 1, 27 April 2007, Pages 124-128”には、重鎖CDR3を改変させることで抗体の結合能を上昇させたことが記載されている。CDR以外のFv領域はフレームワーク領域(FR)と呼ばれ、FR1、FR2、FR3およびFR4からなり、抗体間で比較的よく保存されている(Kabat et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983.)。即ち、抗体の反応性を特徴付ける要因はCDRにあり、特に重鎖CDRにあるといえる。

【0039】

CDRの定義およびその位置を決定する方法は複数報告されている。例えば、Kabatの定義(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))、またはChothiaの定義(Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987; 196: 901-917)を採用してもよい。本開示の一実施形態においては、Kabatの定義を好適な例として採用するが、必ずしもこれに限定されない。また、場合によっては、Kabatの定義とChothiaの定義の両方を考慮して決定しても良く、例えば、各々の定義によるCDRの重複部分を、または各々の定義によるCDRの両方を含んだ部分をCDRとすることもできる。そのような方法の具体例としては、Kabatの定義とChothiaの定義の折衷案である、Oxford Molecular's AbM antibody modeling softwareを用いたMartinらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci

10

20

30

40

50

．USA，1989；86：9268－9272）がある。このようなCDRの情報を用いて、本開示に使用されうる変異体を生産することができる。このような抗体の変異体では、もとの抗体のフレームワークに1または数個（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個）の置換、付加もしくは欠失を含むが、該CDRには変異を含まないように生産することができる。

【0040】

本明細書において「抗原」（antigen）とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」（immunogen）とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。本明細書において「エピトープ」または「抗原決定基」とは、抗体またはリンパ球レセプターが結合する抗原分子中の部位をいう。エピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。本開示の抗体は、エピトープが同じであれば、他の配列を有する抗体であっても同様に利用することができることが理解される。

【0041】

本明細書において使用される抗体は、擬陽性が減じられる限り、どのような特異性の抗体を用いても良いことが理解される。

【0042】

本開示が対象とする「がん」は、肺がん、食道がん、胃がん、肝臓がん、膵臓がん、腎臓がん、副腎がん、胆道がん、乳がん、大腸がん、小腸がん、卵巣がん、胆管がん、子宮がん、膀胱がん、前立腺がん、尿管がん、腎盂がん、尿管がん、陰茎がん、精巣がん、脳腫瘍、中枢神経系のがん、末梢神経系のがん、頭頸部がん、グリオーマ、多形性膠芽腫、皮膚がん、メラノーマ、甲状腺がん、唾液腺がん、悪性リンパ腫、がん腫、肉腫、白血病および血液悪性腫瘍からなる群から選ばれる1種以上を含む。「癌」および「腫瘍」と交換可能に使用される。ここで、卵巣がんは、例えば、卵巣漿液性腺がん、または卵巣明細胞線がんを含む。子宮がんは、例えば、子宮内膜がん、または子宮頸がんを含む。頭頸部がんは、例えば、口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、鼻腔がん、副鼻腔がん、唾液腺がん、または甲状腺がんを含む。肺がんは、例えば、非小細胞肺がん、または小細胞肺がんを含む。また悪性腫瘍は、PD-L1陽性であってもよい。

【0043】

本明細書において「食道がん」とは、通常の意味で使用され、食道におけるがんを含む広義の意味で使用される。食道がんとしては、扁平上皮がんのほか、腺がん、リンパ節転移部位のもの等も包含されるがこれに限定されない。日本人の食道がんは、約半数が胸の中の食道中央付近から発生し、次いで1／4が食道の下部に発生するとされており、本開示はいずれも対象とすることが理解される。理論に束縛されることを望まないが、本開示では、扁平上皮がんのほか、腺がん、リンパ節転移部位のものを含め食道がん全体の指標として使用されることが期待される。

【0044】

本明細書において「膵臓がん」は、膵臓から発生した悪性の腫瘍のことをいうが、一般には膵管がんをいい、このほかの膵臓の部分の腫瘍も包含される。

【0045】

本明細書において「子宮頸がん」は、子宮がんの一種で、子宮がんには子宮頸がんと子宮体がんとがあり、子宮頸がんは、子宮の入り口の子宮頸部とよばれる部分から発生するものである。

【0046】

本明細書において「肺がん」は、肺に発生する上皮細胞由来の悪性腫瘍であり、小細胞肺がん、非小細胞肺がんなどがあり、非小細胞肺がんには、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんがある。

【0047】

本明細書において「頭頸部がん」は、頭頸部の腫瘍であり、顔面から頸部までの部分、

10

20

30

40

50

例えば、鼻、口、のど、上あご、下あご、耳などの部分にできる腫瘍をいう。

【0048】

本明細書において「乳がん」は、乳房に生じる腫瘍であり、乳管がん、小葉がんなどがある。

【0049】

本明細書において、「子宮平滑筋肉腫」とは、子宮肉腫のうち子宮の平滑筋にできる子宮肉腫を指す。子宮平滑筋肉腫は、細胞密度、細胞分裂数、細胞異型、腫瘍細胞の凝固壊死の有無により組織学的に診断され得る。

【0050】

本明細書において、「前立腺がん」とは、前立腺にできる腫瘍をいう。

10

【0051】

本明細書において、「口腔扁平上皮がん」とは、口腔がんの一種であり、口腔粘膜の上皮にできる腫瘍をいう。

【0052】

本明細書において「胆管がん」は、胆管に生じる腫瘍であり、肝臓内の胆管に生じる肝内胆管がん、肝臓の外の肝門部に生じる肝門部領域胆管がん、および肝臓の外の遠位部に生じる遠位胆管がんに分類される。

【0053】

本明細書において「がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts (CAF))」とは、がんの間質を構成する線維芽細胞を指す。CAFはコラーゲンなどの多くの細胞外基質を産生し、がんの間質を非常に硬くし、その結果、血管が押しつぶされること（虚脱）等に起因して、抗がん剤の効率的な浸透を妨げる。血管が押しつぶされることは、がん組織の低酸素状態も誘導し、さらに、がん細胞の悪性度を上昇させる。また、間質の硬度の上昇自体も、がん細胞の増殖や浸潤能（周囲組織にひろがる能力）を上昇させる因子の一つである。加えて、CAFは多くの増殖因子を産生し、これらはがん細胞に作用してその増殖や浸潤を促進し、抗腫瘍免疫応答を抑制する。

20

【0054】

本明細書において、がんの「間質」は、がん組織におけるがん細胞を取り囲む組織であって、CAFを主要な構成成分として含み、その他の構成成分として、免疫細胞、骨髄由来細胞、腫瘍血管、リンパ管、CAFによって産生される細胞外基質等を含む組織を指す。

30

【0055】

本明細書において「被験体（者）」とは、本開示の診断または検出、あるいは治療等の対象となる対象（例えば、ヒト等の生物または生物から取り出した細胞、血液、血清等）をいう。

【0056】

本明細書において「試料」とは、被験体等から得られた任意の物質をいい、例えば、血清等が含まれる。当業者は本明細書の記載をもとに適宜好ましい試料を選択することができる。

【0057】

本明細書において「薬剤」、「剤」または「因子」（いずれも英語ではagentに相当する）は、広義には、交換可能に使用され、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。Glypican-1に結合する物質もまた、このような薬剤でありうる。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌ

40

50

クレオチドの配列に対して一定の配列相同性を（例えば、70%以上の配列同一性）もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物（例えば、単鎖抗体）、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0058】

本明細書において「診断」とは、被験体における疾患、障害、状態（例えば、食道がん）などに関連する種々のパラメータを同定し、そのような疾患、障害、状態の現状または未来を判定することをいう。本開示の方法、装置、システムを用いることによって、体内の状態を調べることができ、そのような情報を用いて、被験体における疾患、障害、状態、投与すべき処置または予防のための処方物または方法などの種々のパラメータを選定することができる。本明細書において、狭義には、「診断」は、現状を診断することをいうが、広義には「早期診断」、「予測診断」、「事前診断」等を含む。本開示の診断方法は、原則として、身体から出たものを利用することができ、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることから、産業上有用である。本明細書において、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることを明確にするために、特に「予測診断、事前診断もしくは診断」を「支援」として称することがある。

【0059】

本明細書において「検出薬（剤）」または「検査薬（剤）」とは、広義には、目的の対象を検出または検査することができるあらゆる薬剤をいう。

【0060】

本明細書において「診断薬（剤）」とは、広義には、目的の状態（例えば、食道がん等の疾患など）を診断できるあらゆる薬剤をいう。

【0061】

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害（例えば、食道がん）について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消退させることをいい、患者の疾患、もしくは疾患に伴う1つ以上の症状の、症状改善効果あるいは予防効果を発揮しうることを含む。事前に診断を行って適切な治療を行うことは「コンパニオン治療」といい、そのための診断薬を「コンパニオン診断薬」ということがある。

【0062】

本明細書において「治療薬（剤）」とは、広義には、目的の状態（例えば、食道がん等の疾患など）を治療できるあらゆる薬剤をいう。本開示の一実施形態において「治療薬」は、有効成分と、薬理学的に許容される1つもしくはそれ以上の担体とを含む医薬組成物であってもよい。医薬組成物は、例えば有効成分と上記担体とを混合し、製剤学の技術分野において知られる任意の方法により製造できる。また治療薬は、治療のために用いられる物であれば使用形態は限定されず、有効成分単独であってもよいし、有効成分と任意の成分との混合物であってもよい。また上記担体の形状は特に限定されず、例えば、固体または液体（例えば、緩衝液）であってもよい。なお食道がんの治療薬は、食道がんの予防のために用いられる薬物（予防薬）、または食道がん細胞の増殖抑制剤を含む。

【0063】

本明細書において「予防」とは、ある疾患または障害（例えば、食道がん）について、そのような状態になる前に、そのような状態にならないようにすることをいう。本開示の薬剤を用いて、診断を行い、必要に応じて本開示の薬剤を用いて例えば、食道がん等の予防をするか、あるいは予防のための対策を講じることができる。

【0064】

本明細書において「予防薬（剤）」とは、広義には、目的の状態（例えば、食道がん等の疾患など）を予防できるあらゆる薬剤をいう。

【0065】

本明細書において「相互作用」とは、2つの物質についていうとき、一方の物質と他方の物質との間で力（例えば、分子間力（ファンデルワールス力）、水素結合、疎水性相互作用など）を及ぼしあうこという。通常、相互作用をした2つの物質は、会合または結合している状態にある。本開示の検出、検査および診断は、このような相互作用を利用して実現することができる。

【0066】

本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチド発現の「検出」または「定量」は、例えば、検出剤、検査剤または診断剤（コンパニオン試薬としての適用を含む）への結合または相互作用を含む、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、発光イムノアッセイ（LIA）、免疫沈降法（IP）、免疫拡散法（SRID）、免疫比濁法（TIA）、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、タンパク質アレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。タンパク質アレイについては、Nat Genet. 2002 Dec; 32 Suppl: 526-532に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、in vitro翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

【0067】

本明細書において、活性、発現産物（例えば、タンパク質、転写物（RNAなど））の「減少」または「抑制」あるいはその類義語は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における減少、または減少させる活性をいう。減少のうち「消失」した場合は、活性、発現産物等が検出限界未満になることをいい、特に「消失」ということがある。本明細書では、「消失」は「減少」または「抑制」に包含される。

【0068】

本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在（例えば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、RI（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。本開示のマーカーまたはそれを捕捉する因子または手段を複数、蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10 nm以上であることが好ましい。リガンドを標識する場合、機能に影響を与えないものならば何れも用いることができるが、蛍光物質としては、AlexaTM Fluorが望ましい。AlexaTM Fluorは、クマリン、ローダミン、フルオレセイン、シアニンなどを修飾して得られた水溶性の蛍光色素であり、広範囲の蛍光波長に対応したシリーズであり、他の該当波長の蛍光色素に比べ、非常に安定で、明るく、またpH感受性が低い。蛍光極大波長が10 nm以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、AlexaTM 555とAlexaTM 633の組み合わせ、AlexaTM 488とAlexaTM 555の組み合わせ等を挙げることができる。核酸を標識する場合は、その塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、CyDyeTM シリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、2-アセチルアミノフルオレン（AAF）、AAIF（AAFのヨウ素誘導体）等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が10 nm以上である蛍光物質としては、例えば、Cy5とローダミン6G試薬との組み合わせ、Cy3とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン6

G 試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を挙げることができる。本開示では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

【0069】

本明細書において「インビボ」(in vivo)とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする物質が配置されるべき位置をいう。

【0070】

本明細書において「インビトロ」(in vitro)とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」(例えば、試験管内に)摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

【0071】

本明細書において「エキソビボ」(ex vivo)とは、ある処置について、体外で行われるがその後体内に戻されることが意図される場合、一連の動作をエキソビボという。本開示においても、生体内にある細胞を本開示の薬剤で処置して再度患者に戻すような実施形態を想定することができる。

【0072】

本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分(例えば、検査薬、診断薬、治療薬、抗体、標識、説明書など)が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分(例えば、検査薬、診断薬、治療薬をどのように使用するか、あるいは、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、検査薬、診断薬、治療薬、抗体等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

【0073】

本明細書において「指示書」は、本開示を使用する方法を医師または他の使用者に対する説明を記載したものである。この指示書は、本開示の検出方法、診断薬の使い方、または医薬などを投与することを指示する文言が記載されている。また、指示書には、投与部位として、経口、食道への投与(例えば、注射などによる)することを指示する文言が記載されていてもよい。この指示書は、本開示が実施される国の監督官庁(例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局(FDA)など)が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書(package insert)であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体(例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール)のような形態でも提供され得る。

【0074】

本明細書で使用される「細胞内移行(インターナライズ/インターナライゼーション)」とは、細胞表面上の抗原に結合した物質を媒介してエンドサイトーシスまたは食作用によって細胞が抗原に結合した物質を取り込むことを指す。このような活性を有するGlypican-1に結合する物質(例えば、抗Glypican-1抗体)は、Glypican-1を細胞表面に発現する細胞に対して目的の有効成分を細胞内移行させ、目的の有効成分による所望の効果をGlypican-1発現細胞において生じさせることができる。目的の有効成分としては、細胞傷害性活性を有する薬剤、抗がん剤、造影剤、siRNA、アンチセンス核酸、リボザイムなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

本明細書において「複合体」とは、2以上の部分を含む任意の構成体を意味する。例えば、一方の部分が多ペプチドである場合は、他方の部分は、ポリペプチドであってもよく、それ以外の物質(例えば、糖、脂質、核酸、他の炭化水素、低分子化合物等)であっ

10

20

30

40

50

てもよい。本明細書において複合体を構成する2以上の部分は、共有結合で結合されていてもよくそれ以外の結合（例えば、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力等）で結合されていてもよい。従って、本明細書において「複合体」は、ポリペプチド、核酸、脂質、糖、低分子化合物などの分子が複数種連結してできた分子を含む。

【0076】

本明細書において「リンカー」とは、少なくとも2つの構成要素を連結し、空間的に分離するための分子を指す。リンカーとしては、例えば、酵素切断型リンカー、酸不安定性リンカー、ジスルフィドリンカーなどが挙げられるが、これらに限定されない。「酵素切断型リンカー」は、細胞内に存在する酵素によって切断されるリンカーを指す。「酸不安定性リンカー」は、細胞内のエンドソームまたはリソソームの産生条件下で切断されるリンカーを指す。「ジスルフィドリンカー」は、細胞内の還元環境下で切断されるリンカーを指す。

10

【0077】

本明細書において「抗体薬物複合体（ADC）」とは、1つまたは複数の目的の有効成分と化学的に連結された抗体またはその抗原結合フラグメントを指す。好ましい実施形態において、ADCは、リンカーを介して作動可能に連結されている。本明細書において「作動可能に連結されている」とは、連結される構成要素がその機能を発揮するように作動することが可能な関係にあることを指す。ADCに含まれ得る目的の有効成分としては、以下に限定されないが、細胞傷害性活性を有する薬剤、抗がん剤、造影剤、siRNA、アンチセンス核酸、リボザイムなどが挙げられる。リンカーとして使用され得るものは、開裂型リンカーであっても、非開裂型のリンカーであってもよい。開裂型リンカーとしては、タンパク質分解酵素による切断配列を有するリンカー、酸不安定性のリンカー、ジスルフィドリンカーなどが挙げられるが、これらに限定されない。非開裂型リンカーとしては、MCCリンカーなどが挙げられるが、これに限定されない。

20

【0078】

本明細書において「細胞傷害活性」とは、例えば、細胞に病理的な変化をもたらすこと、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂システムの損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷により、細胞の機能を直接または間接的に遮断することによって細胞死をもたらすことをいう。したがって、「細胞傷害活性を有する薬剤」としては、例えば、以下に限定されないが、アルキル化剤、腫瘍壊死因子阻害剤、インターカレーター、微小管阻害剤、キナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、及びトポイソメラーゼ阻害剤などが挙げられる。

30

【0079】

本明細書において「50%阻害濃度（IC₅₀）」とは、50%の細胞が死滅させるために必要な化合物の濃度をいう。本明細書では、実施例7に記載の方法を使用してIC₅₀が測定される。

【0080】

本明細書において「親和性」とは、2つの物質（例えば、抗体と抗原）の可逆的結合の平衡定数を指し、平衡解離定数（K_D値）で表される。平衡解離定数は表面プラズモン共鳴（SPR）法、例えばBiacore（登録商標）により測定することができる。その他、MP-SPR NavitTM（BioNavis）、OpenPlex（Horiba）、Smart SPR（IBM）によって測定されてもよい。本開示において、示されるK_D値は、特段の定めがない限り、表面プラズモン共鳴（SPR）法によって測定された値を意味する。

40

【0081】

（好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の

50

範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

【0082】

(抗体)

1つの局面において、本開示は、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む抗体に基づきヒト化されたヒト化抗GPC-1抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。本発明者らは、国際公開第2018/199318号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるGPC-1に対して高い親和性を有する抗GPC-1マウスモノクローナル抗体である01a033（配列番号5の重鎖可変領域および配列番号6の軽鎖可変領域を含む）をヒト化したところ、予想外にも01a033よりも高い親和性を有するヒト化抗体を取得することに成功した。したがって、本開示のヒト化抗体は、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む抗体と比べて、GPC-1に対して高い親和性を有し得る。

【0083】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号7に記載のアミノ酸配列、またはこれと少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み得る。

【0084】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号8～27に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列、またはこれと少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得る。好ましい実施形態において、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号8～17に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列、またはこれと少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得る。

【0085】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、いずれのクラスであってもよく、例えば、IgM、IgD、IgG、IgA、IgE、またはIgYであってもよい。特定の実施形態において、本開示の抗体は、IgGであり得る。さらなる特定の実施形態において、本開示の抗体は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4からなる群から選択されるサブクラスであり、好ましくは、ヒトIgG4である。

【0086】

ヒトIgG4は、ヒトIgG4のH鎖が別のヒトIgG4と交換する反応（Fab-arm exchange）が起きることが知られている（<https://www.nature.com/articles/nrneph.2015.95/figures/2>）。これを防ぐために、S228P変異を入れることができる（J Biol Chem. 2015 Feb 27; 290(9): 5462-9.）。例えば、OPDIVOR（nivolumab）やKEYTRUDAR（pembrolizumab）は、S228P変異が導入されており、デュピルマブは、H鎖233番目のアミノ酸残基がProに置換されている。ヒトIgG4以外のクラスではFab-arm exchangeは起きないため、アミノ酸変異を入れなくてもよい。

【0087】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、配列番号91に記載のアミノ酸配列、またはこれと少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖定常領域を含み得る。いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、配列番号9

2に記載のアミノ酸配、またはこれと少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域を含み得る。

【0088】

いくつかの実施形態において、重鎖可変領域のCDR1～3は、それぞれ配列番号28～30に記載のアミノ酸配列を有し得る。

【0089】

いくつかの実施形態において、軽鎖可変領域のCDR1～3は、それぞれ配列番号31～33、またはそれぞれ配列番号34～36、またはそれぞれ配列番号37～39、またはそれぞれ配列番号40～42、またはそれぞれ配列番号43～45、またはそれぞれ配列番号46～48、またはそれぞれ配列番号49～51、またはそれぞれ配列番号52～54、またはそれぞれ配列番号55～57、またはそれぞれ配列番号58～60、またはそれぞれ配列番号61～63、またはそれぞれ配列番号64～66、またはそれぞれ配列番号67～69、またはそれぞれ配列番号70～72、またはそれぞれ配列番号73～75、または76～78、または79～81、または82～84、または85～87、またはそれぞれ配列番号88～90に記載のアミノ酸配列を有し得る。好ましい実施形態において、軽鎖可変領域のCDR1～3は、それぞれ配列番号31～33、またはそれぞれ配列番号34～36、またはそれぞれ配列番号37～39、またはそれぞれ配列番号40～42、またはそれぞれ配列番号43～45、またはそれぞれ配列番号46～48、またはそれぞれ配列番号49～51、またはそれぞれ配列番号52～54、またはそれぞれ配列番号55～57、またはそれぞれ配列番号58～60に記載のアミノ酸配列を有し得る。

【0090】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントのエピトープは、配列番号2（ヒトGPC-1の全長配列）の339～358位および／もしくは388～421位を含み得る。特定の実施形態において、本開示の抗体のエピトープは、配列番号2（ヒトGPC-1の全長配列）の339～358位および388～421位を含み得る。

【0091】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントは、約 5×10^{-9} M、約 6×10^{-9} M、約 7×10^{-9} M、約 8×10^{-9} M、約 9×10^{-9} M、約 10^{-8} M以下、約 2×10^{-8} M、約 3×10^{-8} M、約 4×10^{-8} M、約 5×10^{-8} M、約 10^{-7} M、または約 5×10^{-7} Mの親和性（ K_D 値）でGlypican-1に結合し得る。特定の実施形態において、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントは、 3.16×10^{-8} Mまたは約 1.02×10^{-8} Mの親和性（ K_D 値）でGlypican-1に結合し得る。

【0092】

さらなる局面において、本開示は、本開示のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、有効成分を細胞内移行させるための医薬組成物を提供する。本開示の抗体は、予想外にも01a033と同等またはそれ以上の細胞内移行（インターナライズ）活性を有する。

【0093】

（複合体）

さらなる局面において、本開示は、本開示のヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントと細胞傷害性活性を有する薬剤との複合体を提供する。細胞傷害性活性を有する薬剤は、リンカーを介して作動可能にヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントに連結され得る。

【0094】

細胞傷害性活性を有する薬剤としては、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）、モノメチルアウリスタチンF（MMAF）、DM1、DM4、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ピロロベンゾジアゼピン（PBD）、およびトポイソメラーゼ阻害剤が挙げ

られるが、これらに限定されない。限定を意図するものではないが、細胞傷害性活性を有する薬剤は、バースタンダー効果を有するものであるのが好ましい。バースタンダーとは、がん細胞内で遊離した薬剤が細胞膜を透過し、周囲のがん細胞に対しても有効性を示す効果をいう。したがって、いくつかの実施形態において、細胞傷害性活性を有する薬剤は、細胞透過性であり得る。バースタンダー効果を有する細胞傷害性活性を有する薬剤としては、例えば、MMAE、PBD、Eribulin、SN-38、Dxd、DM4等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

いくつかの実施形態において、リンカーは、がん細胞内において切断されるものであればよく、例えば、酵素切断型リンカー、酸不安定性リンカー、およびジスルフィドリンカーなどが挙げられる。特定の実施形態において、リンカーは、カテプシン（例えば、カテプシンB）により切断される切断型リンカー、例えば、マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニルであり得る。

【0096】

いくつかの実施形態において、本開示の複合体は、Glypican-1陽性細胞において、約0.04 nM以下、約0.05 nM以下、約0.06 nM以下、約0.07 nM以下、約0.08 nM以下、約0.09 nM以下、約0.1 nM以下、約0.11 nM以下、約0.12 nM以下、約0.13 nM以下、約0.14 nM以下、または約0.15 nM以下のIC₅₀を示し得る。IC₅₀は、実施例2のADCアッセイにおいて測定された値であり得る。好ましい実施形態において、Glypican-1陽性細胞において、約0.1 nM以下のIC₅₀を示し得る。

【0097】

別の実施形態では、本開示の複合体で使用されるリンカーは、酸不安定性リンカーであってもよい。細胞内移行後のエンドソームまたはリソソーム内の酸性pHを利用し、酸性で不安定なpHに応答性のリンカーを使用することができる。このようなリンカーとしては、例えば、ヒドラゾンなどが挙げられる。

【0098】

さらなる別の実施形態では、本開示の複合体で使用されるリンカーは、ジスルフィドリンカーであってもよく、このようなリンカーとしては、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPDB)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPP)などが挙げられる。

【0099】

本開示の複合体で使用されるリンカーは、非開裂型リンカーであってもよい。非開裂型リンカーとしてはマレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボン酸(MCCリンカー)などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

(医薬組成物)

さらなる局面において、本開示は、本開示の複合体を含む、Glypican-1陽性がんを予防または治療するための組成物を提供する。食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がんまたはこれらの任意の組合せから選択され得る。特定の実施形態において、Glypican-1陽性がんは、食道がんまたは膵臓がんであり得る。

【0101】

(転移性がんの治療のための組成物)

さらなる局面において、本開示の複合体を含む、Glypican-1陽性がんの転移性がんを予防または治療するための組成物を提供する。本発明者らは、Glypican-1陽性がんの転移性がんがGlypican-1を発現していること、Glypican-1陽性がんの転移性がんを本開示の複合体により治療することができることを見出した。原発部位において発現される抗原が、必ずしも転移がんにおいて同じ抗原を発現するとは限らない。そのため、原発部位で発現が確認されたがん抗原については、転移がん

において発現するかどうかを確認する必要がある。G P C 1 について膵臓がんリンパ節転移、膵臓がん肝転移、食道がんリンパ節転移などの転移先の腫瘍組織に対して、発現が陽性であることを確認され、治療標的として意義がある。

【0102】

いくつかの実施形態において、G l y p i c a n - 1 陽性がんは、食道がん、膵臓がん、胆管がん、子宮頸がん、肺がん、頭頸部がん、乳がん、子宮平滑筋肉腫、前立腺がん、口腔扁平上皮がん、またはこれらの任意の組合せから選択され得る。特定の実施形態において、G l y p i c a n - 1 陽性がんは、膵臓がんであり得る。

【0103】

いくつかの実施形態において、転移性がんは、肝臓、食道、胆管、子宮頸、肺、頭頸部、乳房、子宮平滑筋、前立腺、口腔扁平上皮、脳、骨、腹膜、副腎などに転移した転移性がんであり得る。

【0104】

いくつかの実施形態において、がんは、がん関連線維芽細胞（C A F）を有していてもよい。

【0105】

さらなる実施形態において、本開示の複合体は、免疫チェックポイント阻害剤と一緒に投与されてもよい。免疫チェックポイント阻害剤としては、例えば、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、抗 C T L A - 4 抗体、抗 V I S T A 抗体等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

（改変体の作成）

当該分野で周知の方法に従って、当業者であれば、本開示における抗体の配列に基づき、G P C - 1 に対して、0 1 a 0 3 3 または本開示の抗体と同等またはそれらよりも高い親和性を有する改変体を製造することが可能である。例えば、当業者であれば、ファージディスプレイ法を用いて C D R 配列がわずかに異なる抗体を解析し、目的の抗体と同等またはそれより高い親和性を有する抗体をスクリーニングすることができる。その他の改変体を作成する方法としては、C D R - w a l k i n g 法、ランダム変異誘発法などが挙げられる。いくつかの実施形態において、改変体は、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントにおける各 C D R において、3 個以下のアミノ酸置換、欠失および／または付加、好ましくは 2 個以下のアミノ酸置換、欠失および／または付加、より好ましくは 1 個以下のアミノ酸置換、欠失および／または付加を有し得る。これらの改変体は、G P C - 1 に対して、0 1 a 0 3 3 または本開示の抗体と同等またはそれらよりも高い親和性を有し得る。

【0107】

本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも 1 つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2 つの値の範囲内」と明記した場合、その範囲には 2 つの値自体も含む。

【0108】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0109】

以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0110】

以下に実施例を記載する。必要な場合、以下の実施例で用いる動物の取り扱いは、必要

10

20

30

40

50

な場合、医薬基盤研究所において規定される基準を遵守し、ヘルシンキ宣言に基づいて行った。試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他メーカー（Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライ、R&D Systems、USCN Life Science INC等）の同等品でも代用可能である。

【0111】

本実施例では、細胞内にインターナライズする活性が高い抗体として発見した抗GPC1モノクローナル抗体（クローン01a033）をヒト化し、ヒト化前よりも高い細胞内へのインターナライズ活性をスクリーニングし、ヒト化抗GPC1モノクローナル抗体にリンカーを介して抗がん剤を結合させたヒト化GPC1-ADCの創出と、ヒト化GPC1-ADCの抗腫瘍効果を*in vitro*、*in vivo*で明らかにすることを目的とする。また、ペイロードのMMAEが*immunogenic cell death*を誘導する性質を持つことから、ヒト化GPC1-ADCと免疫チェックポイント阻害剤の併用による相乗的な抗腫瘍効果が得られることを確認することも目的とする。

【0112】

（製造例：ヒト化抗体の製造）

本開示のヒト化抗体の製造をHD Biosciences (China) Co., Ltdに依頼した。

【0113】

簡潔にいうと、ヒト化は、簡潔には、ライブラリーの構築、抗原のパニングおよびスクリーニング、結合ELISA、ならびに親和性の決定により行われた。ヒトVkライブラリーを、マウス抗体のCDRおよびヒトフレームワークの固定重鎖によって構築し、それに続いて抗原パニングおよびスクリーニングを行った。Vkライブラリーのパニングから、合計30のヒト化抗glypican-1抗体を見出し、ファージELISAによって確認した。それらのうち20を、抗体発現および精製のために選択し、その後Biacore（登録商標）8Kにより親和性を決定した。

【0114】

（材料および方法）

＜抗体ライブラリー作成＞

マウス抗体（01a033）のCDRグラフティングによるヒト化H鎖VH領域作成
01a033のVHと相同性の高いAlleleをabYsisのデータベースで検索し、ヒト生殖系列配列VH1-46のフレームワークを選択して01a033のVHのCDR配列をグラフティングしたアミノ酸配列となる遺伝子を作成した。

【0115】

VL領域はヒトVLの遺伝子プールのライブラリー（LC-Library: Library diversity 4.53×10^5 / Library size 1.06×10^{13} ）を使用した。ファージGIII抗原のN末端側にVLライブラリー遺伝子+Ck遺伝子+上記ヒト化VH遺伝子+CH1の順番になるように組み込んだ。

【0116】

ランダムなヒトL鎖（k）と01a033のCDR配列を持つヒト化H鎖（VH+CH1）が提示されたファージライブラリーを作成（ヒト化抗体ライブラリー）した。

【0117】

＜パニング＞

ヒト化抗体ライブラリーの中で、実際にGPC-1に結合する抗体を発現しているファージを選択するため、パニングを実施した。

【0118】

抗原であるGPC-1を固相（試験管、パーティクル）に結合させ、そこにファージの集団を加え、洗浄し、結合したファージを回収した。

【0119】

＜Filter liftingによるファージクローン単離と抗原結合性の検証＞

パニングで抗原に結合し、溶出されたファージを大腸菌を蒔いたプレートで感染させ、生じた溶菌プラークをフィルターに写し取って、ファージをクローニングした。

【0120】

得られたファージクローンを増幅し、個々のクローンについてELISA法（ヒトGPC-1抗原を固定）への結合性を調べ、一定値以上の結合シグナルが得られたクローンを選択した。

【0121】

＜IgG化した抗体クローンの発現と精製＞

選択したファージ20クローンの遺伝子からIgG化した抗体をHEK293細胞で発現させた（ベクター：pFUSE2ss-CLIg-hkpFUSE2ss-CLIg-hk（軽鎖、Invivogen，カタログ番号：pfuse2ss-hclk）およびpFUSEss-CHIg-hG1（重鎖、Invivogen，カタログ番号：pfusess-hchg1）；細胞系：FreeStyle™ 293F Cells（Invitrogen，カタログ番号：R790-07））。トランスフェクション後4日での培養上清から抗体を精製して定量とSDS-PAGEでの確認を行った。20クローンすべてについて抗体産生（H鎖、L鎖の存在と分子量）を確認した。

【0122】

＜表面プラズモン共鳴法での各クローンの抗原結合親和性の測定＞

表面プラズモン共鳴法（Biacore（登録商標）8K）で取得した20クローンの抗体の抗原結合親和性を測定した。チップに抗ヒトIgG抗体を固定化し、そこにそれぞれの抗体を流して抗体を結合させ、洗浄後ヒトGPC-1抗原を流して結合定数（Ka）及び解離定数（Kd）を測定した。7クローンがマウス抗体よりも高い親和性を示した。

【0123】

＜表面プラズモン共鳴法でのマウス抗体（01a033）の抗原結合親和性の測定＞

表面プラズモン共鳴法（Biacore（登録商標）8K）でマウス抗体のヒトGPC-1への結合親和性を測定した。チップに抗マウスFc抗体を固定化し、そこにマウス抗体（01a033）を流して結合させ、洗浄後にヒトGPC-1を流して結合定数（Ka）及び解離定数（Kd）を測定した。

【0124】

＜マウス抗GPC-1キメラ抗体の作成＞

01a033のVH/VL遺伝子をヒトCk/CH遺伝子につないでヒト抗体キメラ遺伝子を作成した。HEK293F細胞で発現させた。

【0125】

（実施例1：ヒト化抗GPC1モノクローナル抗体の親和性解析）

（材料および方法）

マウス抗ヒトGPC1モノクローナル抗体をヒト化（サブクラスはIgG4）し、得られた20種類のクローン（T1，T2，T3，T7，T8，T10，T11，T22，T26，T28，T29，T31，T32，T33，T34，T36，T43，T56，T57，T59）を調製した。これらのクローンについて、組換えヒトGPC1タンパク質（R&D systems社）との親和性をHuman antibody capture kit（GE Healthcare）を用いて抗ヒトIgG（Fc）をsCM5 sensor chip（GE Healthcare）に固相化し、Biacore（登録商標）8K（GE Healthcare）を用いて測定した。

【0126】

（結果）

抗Glypican-1（GPC-1）モノクローナル抗体（01a033）を独自にヒト化し、その結果、20種類の候補クローンを取得した。これらの20種類のクローンについて、Biacore（登録商標）により平衡解離定数（K_D）を測定した（図1）。その結果、ヒト化する前の抗体であるキメラマウス抗体（01a033）よりも強い親和性を示すクローンが7種類（クローンT1，T2，T3，T8，T10，T36，T56）確認された（図1）。

【0127】

(実施例2：ヒト化抗GPC-1抗体とMMAF結合2次抗体を組み合わせたADCアッセイ)

(材料および方法)

(TE14細胞の抗がん剤感受性の確認)

96ウェルプレートに2000個のTE14細胞を80μlで添加した。一晚、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養し、翌日、最終濃度に対して10倍濃縮したヒト化抗GPC1抗体の各種クローンを1次抗体として1ウェルあたり10μlずつ添加した。続いて、2次抗体として抗がん剤(MMAF)をリンカーを介して結合した抗ヒトIgG抗体(Fab)(MORADEC、型番AH-202AF-50)を1ウェルあたり10μlずつ添加して合計100μlとした。37℃、5%CO₂インキュベーターで6日間培養しCell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay試薬を用いてATP量を検出することで細胞の生存を測定した。培地は、RPMI1640+10%FBS+1%PSを使用した。

10

【0128】

(アッセイに使用するADC)

アッセイに使用するADCの概略図を図2に示す。20種類のクローンの中から細胞内インターナライズ活性の高いクローンを図2に示す方法によりスクリーニングした。本手法はGPC1を発現する食道がん細胞株であるTE14細胞株に、上記製造例で得られたクローンのヒト化抗GPC1抗体を1次抗体として添加し、2次抗体として抗がん剤(MMAF)コンジュゲート抗ヒトIgG抗体を添加することで、がん細胞内に1次抗体と2次抗体の複合体として抗がん剤を取り込ませ、抗がん剤の作用により細胞死が誘導されるアッセイ系を用いている。

20

【0129】

(結果)

キメラマウス抗体(01a033)よりも高い細胞内インターナライズ活性を示すクローンが10種類確認された(クローンT2, T7, T8, T1, T36, T57, T10, T34, T56, T3)(図3)。

【0130】

(実施例3：FACSによる抗原親和性解析)

実施例2の結果、クローンT2が最も高い活性を示したため、クローンT2を細胞内インターナライズ活性の高いヒト化抗GPC1抗体として選出し、解析を行った。

30

【0131】

(材料および方法)

抗体を用いたFACS解析を行うにあたり、GPC1陽性細胞として、ヒト食道がん細胞株(TE8)細胞を、GPC1陰性細胞としてCRISPR-Cas9技術を用いてGPC1をノックアウトしたTE8-GPC1 KO細胞を用いた。ヒト/マウスキメラ抗GPC1抗体(クローン01a033)およびヒト化抗GPC1抗体(クローンT2)を1次抗体として用い、2次抗体としてはFITC標識抗ヒトIgG-FITC(Jackson Immuno research社、型番:109-095-098)を用い、FACS CantoII(BD社)を用いて測定し、測定データはBD FACSDiva software(BD社)を用いて解析した。

40

【0132】

(材料および方法)

ヒト/マウスキメラ抗GPC1抗体(クローン01a033)およびヒト化抗GPC1抗体(クローンT2)を、種々の濃度の1次抗体として用い、2次抗体としてはFITC標識抗ヒトIgG-FITC(Jackson Immuno research社、型番:109-095-098)を用い、FACS CantoII(BD社)を用いて測定し、測定データはBD FACSDiva software(BD社)を用いて解析した。

【0133】

(結果)

50

G P C 1 陽性の食道がん細胞株である T E 8 と、C R I S P R / C a s 9 システムにより G P C 1 をノックアウトした T E 8 - G P C 1 - K O 細胞に対して、キメラマウス抗体 (0 1 a 0 3 3)、および、ヒト化抗 G P C 1 抗体 (T 2) を用いて F A C S 解析を行った結果、T E 8 - G P C 1 - K O 細胞とは反応性を示さず、T E 8 細胞のみ反応性を示したため、ヒト化抗 G P C 1 抗体 (T 2) が G P C 1 特異的に結合していることが確認された (図 4)。また、T E 8 細胞表面上の G P C 1 との反応性についても、ヒト化抗 G P C 1 抗体 (T 2) はキメラマウス抗体 (0 1 a 0 3 3) よりも高い親和性を示すことを明らかにした (図 4)。

【 0 1 3 4 】

(実施例 4 : A D C の作製)

本実施例において、A D C を以下のとおり作製した。

【 0 1 3 5 】

ヒト化抗 G P C 1 抗体 (クローン T 2) に m A b を、マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル-モノメチルアウリスタチン E (M C - v c - P A B - M M A E) とコンジュゲートさせた。コンジュゲートは、最初に 3 7 ° C で T C E P により m A b の鎖間ジスルフィド結合を還元し、次いで薬物のマレイミド部分を還元されたシステインに結合させるマレイミド-システインベースの方法で行った。A D C を A m i c o n U l t r a - 0 . 5 m L C e n t r i f u g a l f i l t e r s - 3 0 K (ミリポア社) で脱塩し、未反応の毒素を取り除き、次いで、A D C f o r m u l a t i o n バッファー (2 0 m M ヒスチジン, 7 % スクロース, 0 . 0 2 % (w / v) P S 8 0 , p H 5 . 5) にバッファーを交換した。薬物抗体比 (D A R) の分布は疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) で、凝集の程度はサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) により分析した。薬物抗体比 (D A R) は 4 となるようにコンジュゲート条件を設定した。

【 0 1 3 6 】

(結果)

例示的な A D C の構造の概略図を図 5 に示す。図 5 に示す通り、ヒト化抗 G P C 1 抗体 (クローン T 2) のシステイン残基に、カテプシン B により切断される切断型リンカーを介してバイスタンダー効果を有するペイロードである M M A E をコンジュゲートした。ヒト化 G P C 1 - A D C は D A R 4 . 0 を示した (図 6)。

【 0 1 3 7 】

(実施例 5 : ヒト化 G P C 1 - A D C と未標識抗体の F A C S による抗原親和性解析)
(材料および方法)

抗体を用いた F A C S 解析を行うにあたり、G P C 1 陽性細胞として、ヒト膵臓がん細胞株 (B x P C - 3) 細胞を用いた。ヒト化抗 G P C 1 抗体 (クローン T 2) およびヒト化 G P C 1 - A D C (M M A E) を、種々の濃度の 1 次抗体として使い、2 次抗体としては F I T C 標識抗ヒト I g G - F I T C (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h 社、型番 : 1 0 9 - 0 9 5 - 0 9 8) を使い、F A C S C a n t o I I (B D 社) を用いて測定し、測定データは B D F A C S D i v a s o f t w a r e (B D 社) を用いて解析した。

【 0 1 3 8 】

(結果)

ヒト化抗 G P C 1 抗体 (T 2) にペイロードをコンジュゲートしたことによる抗原親和性への影響について、G P C 1 発現陽性の B x P C 3 細胞を用いて、抗体濃度依存的な結合能を F A C S 解析により評価した。その結果、ヒト化抗 G P C 1 - A D C はヒト化抗 G P C 1 抗体 (T 2) と同等の K_D 値を示したため、ペイロードのコンジュゲートにより抗原親和性の大きな低下は起きていないことが確認された (図 7)。

【 0 1 3 9 】

(実施例 6 : ヒト化抗 G P C - 1 抗体 (c l o n e T 2) およびヒト化 G P C 1 - A D C (M M A E) の細胞内インターナライゼーションアッセイ)

10

20

30

40

50

本実施例では、ヒト化GPC1-ADC (MMAE) について、GPC1 陽性BxPC-3細胞株を用いてインターナライズ（細胞内移行）活性を、FACSを用いて調べた。

【0140】

（材料および方法）

ヒト化抗GPC1抗体（clone T2）およびヒト化GPC1-ADC (MMAE) で処理した細胞に対してanti-GPC1 mAb（ビオチン標識02b006）とPE標識ストレプトアビジンで検出した。

【0141】

BxPC-3細胞株を10cmプレート1枚から0.02%EDTAを用いてはがし、回収した。細胞をRPMI1640+10%FBS+1%GlutaMAXTM I +100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシンに懸濁し、1.5mlチューブに、 2.0×10^6 細胞/0.9mlとして作成した。インターナライゼーション活性を下げるため、氷上で1時間静置した。1mg/mlのヒト化抗GPC1抗体（クローンT2）およびヒト化GPC1-ADC (MMAE) を氷冷RPMI1640+10%FBS+1%GlutaMAXTM I +100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシンで24μg/ml（160nM）に希釈した。細胞懸濁液に上記抗体を100μl加え懸濁し、氷上で30分間静置し、細胞表面の抗原を染色した。30分後に、細胞懸濁液を100μlずつ6本ずつに分注した。細胞懸濁液は4℃インキュベーター群と、37℃インキュベーター群に分け12本とした。インキュベーター時間は0h、1h、2h、3h、4h、6hとした。インキュベーター時間に達した後、細胞を1500rpm、4℃で5分間遠心上清除いた。100μlの氷冷PBS+0.2%BSAで洗浄し、遠心を行い細胞を洗浄した。洗浄操作を合計3回行った。1μg/mlの濃度のビオチン標識された抗GPC1抗体02b006（国際公開第2018/199318号）を50μl加え、懸濁した。氷上で30分間、細胞表面の抗原を染色した（インターナライズされなかったGPC1が染まる）。インキュベーター時間に達した後、細胞を1500rpm、4℃で5分間遠心上清除いた。100μlの氷冷PBS+0.2%BSAで洗浄し、遠心を行い細胞を洗浄した。洗浄操作を合計3回行った。Streptavidin-PE（PharMingen、#554061）を氷冷PBS+0.2%BSAで200倍希釈し、細胞に50μl加え、懸濁した。氷上で30分間、遮光下で反応させた。インキュベーター時間に達した後、細胞を1500rpm、4℃で5分間遠心上清除いた。100μlの氷冷PBS+0.2%BSAで洗浄し、遠心を行い細胞を洗浄した。洗浄操作を合計3回行った。氷冷PBS+0.2%BSAを150μl加え、FACS Canto IIで測定し、BD FACSDiva software（BD社）で解析した。

【0142】

さらに、ヒト化抗GPC1抗体（クローンT2）およびヒト化GPC1-ADC (MMAE) について、GPC1 陽性BxPC-3細胞株を用いてインターナライズした際のヒト化抗GPC1抗体（クローンT2）およびヒト化GPC1-ADC (MMAE) の細胞内の局在を、蛍光顕微鏡を用いて調べた。

【0143】

18mm microcover glass (matsunami) を入れた12ウェルプレート（Corning: 3513）にBxPC-3細胞を 7.5×10^4 cells/well（1ml/well）で播種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで細胞を一晩培養した。

【0144】

翌日、培地を除去し、ウェルに1.0mlの氷冷RPMI1640+10%FBS+1%GlutaMAXTM I +100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシンを加え、4℃で1時間インキュベーターし、細胞のインターナライズ活性を下げた。

【0145】

続いて、ウェル内部の培地を除去し、10μg/mlの1次抗体（氷冷したヒト化抗GPC1抗体（クローンT2）およびヒト化GPC1-ADC (MMAE) を500μl/

well添加し、4℃で15分インキュベートした。

【0146】

15分後に抗体溶液をアスピレートし、1.0mlの氷冷RPMI1640+10%FBS+1%GlutaMAX™ I +100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシンを加え、細胞を洗浄した。この時点のサンプルを0時間サンプル(0h)として回収した。

【0147】

インターナライズさせるサンプルについては、溶液をアスピレートし、1.0mlのRPMI1640+10%FBS+1%GlutaMAX™ I +100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシン(37℃で温めたもの)を加え37℃、5%CO₂インキュベーターで4時間培養し、この時点のサンプルを4時間サンプル(4h)として回収した。

【0148】

0時間および4時間の時点でのサンプルについては、ウェル内の培地を除去し、1ml氷冷PBSで細胞を洗浄した。

【0149】

次に、1mlの100%(氷冷)メタノールを加え、-20℃で15分インキュベートすることで細胞を固定した。固定した後、1mlのPBSで3回洗浄し、1%BSA, 0.3% Triton X-100/PBS(-)を1ml加え、1時間、室温でブロッキング処理をした。ブロッキング後、溶液を除去し、1%BSA, 0.3% Triton X-100/PBS(-)で100倍希釈した1次抗体(抗CD107aモノクローナル抗体(CST社 型番#9091 LAMP1(D2D11)XP(登録商標) Rabbit mAb))を0.5ml/well添加し、4℃で遮光して一晩反応させた。

【0150】

1次抗体反応を一晩行った後、1mlのPBSで3回洗浄し、1%BSA, 0.3% Triton X-100/PBS(-)で200倍希釈した吸着済み2次抗体のヤギ抗ヒトIgG(H+L)-Alexa Fluor 488(Life technology社, A-11013 lot 2110842)と200倍希釈したロバ抗ウサギIgG-Alexa647(Life technology社, A31573, lot 1626613)を0.5ml/wellずつ添加し、室温、遮光して1時間反応させた。

【0151】

2次抗体反応後、1mlのPBSで3回洗浄し、細胞が接着したカバーガラスを取り出し、スライドガラス上で、Vectashield(vectashield H1200)で封入し、オールインワン蛍光顕微鏡(キーエンス社、BZ-X800)で観察した。

【0152】

(結果)

細胞内へのインターナライズ活性を評価した。BxPC3細胞を用いたFACS解析の結果、ヒト化抗GPC1抗体(T2)およびヒト化抗GPC1-ADCはいずれもBxPC3細胞に添加後、2時間で60から70%以上のGPC1が細胞内に速やかにインターナライズしたことが確認された(図8)。本ADCが抗腫瘍効果を発揮するにはリソソーム内の酵素のカテプシンBによりADCのリンカー部分が切断される必要がある。そこで、細胞内局在について、リソソームマーカーであるCD107aとGPC1との局在を蛍光二重染色法で評価した結果、ヒト化抗GPC1抗体(T2)およびヒト化抗GPC1-ADCはいずれもCD107aと共局在したことから、ヒト化抗GPC1抗体(T2)およびヒト化抗GPC1-ADCはGPC1と結合した後、リソソームに移行することが確認された(図8)。

【0153】

(実施例7:ヒト化GPC1-ADC(MMAE)を用いたin vitro ADCアッセイ)

(材料および方法)

10

20

30

40

50

FACSによるGPC1発現解析を行った。

【0154】

食道がん細胞株 (TE8、TE14)、膵臓がん細胞株 (BxPC3、KP-2、PK-8) およびCRISPR-Cas9技術を用いてGPC1をノックアウトしたTE8-GPC1 KO、TE14-GPC1 KO細胞、BxPC3-GPC1 KO細胞、子宮頸がん細胞株 (HeLa)、頭頸部腫瘍細胞株 (Detroit562、FaDu)、口腔扁平上皮がん細胞株 (Ho-1-u-1、KOSC2 cl3-43、KON) について、FACS解析によりGPC1の発現を解析したマウス抗GPC1抗体 (クローン01a033) を1次抗体として用い、2次抗体としてはFITC標識ヤギ抗マウスIgG (H+L chain specific) (southern biotech社) を用い、FACS CantoII (BD社) を用いて測定し、測定データは、FlowJoTMソフトウェア (Tree star社) を用いて解析した。

10

【0155】

実施例4において作製したヒト化GPC1-ADC (MMAE) を用いたin vitro ADCアッセイを、以下のとおりを行った。

(1) 細胞をThermo Fisher Scientific社の96ウェルホワイトプレート (型番136101) にまいた (細胞懸濁液90μL)。培地はRPMI1640+10%FBS+100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシンを使用した (BxPC-3細胞はRPMI1640+10%FBS+1% GlutaMAXTM I +100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシン、Detroit562、FaDu、KONはDMEM+10%FBS+100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシン、Ho-1-u-1はDMEM/F12+10%FBS+100U/mlペニシリン+100μg/mlストレプトマイシンを用いた)。細胞をプレート中央の60ウェルに播種し、培地100μLを外側の36ウェルに添加した。37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した。

20

(2) 翌日、細胞にADC10μLを加えた (総量100μL)

(3) 144時間培養後、CellTiter-Glo (登録商標) Luminescence Cell Viability Assay 試薬 (Promega社) を100μL/ウェル加え混合した。

(4) プレートリーダーで測定した。

30

(5) GraphPad Prism6で解析した。

【0156】

IC50値は以下の式から計算した (Hossain MM, Hosono-Fukao T, Tang R, Sugaya N, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, Kimata K, Rosen SD, Uchimura K (2010) Direct detection of HSulf-1 and HSulf-2 activities on extracellular heparan sulphate and their inhibition by PI-88. Glycobiology 20 (2): 175-186.)。

$IC50 = 10^{(Log [A] [B] \times (50C) / (DC) + Log [B])}$

40

A: 50%を挟む高い濃度

B: 50%を挟む低い濃度

C: Bでの阻害率

D: Aでの阻害率。

【0157】

(結果)

作成したヒト化GPC1-ADCの薬効を評価するためにGPC1発現が陽性および陰性の細胞株の調製を行った。GPC1陽性の食道がん細胞株としてTE8、TE14、膵臓がん細胞株のBxPC3について、CRISPR/Cas9システムによりGPC1をノックアウトしたTE8-GPC1-KO細胞、TE14-GPC1-KO細胞、BxP

50

C3-GPC1-KO細胞を作成し、FACS解析によりGPC1がノックアウトされていることを確認した(図9)。in vitro ADCアッセイを行った結果、ヒト化GPC1-ADCはGPC1陽性がん細胞株に対して薬効を発揮したが、GPC1陰性がん細胞株には薬効を示さなかったため、ヒト化GPC1-ADCがGPC1発現依存的に薬効を示すことが確認された(図10)。膵臓がん、食道がん細胞株以外に、子宮頸がん、頭頸部腫瘍、口腔扁平上皮がん細胞株に対しても、ヒト化GPC1-ADCはGPC1発現依存的に薬効を示すことが確認された(図11、12)。

【0158】

(実施例9：膵臓がんPDX(PK565)を用いたヒト化GPC1-ADC(MMAE)のin vivoでの薬効試験)

(材料および方法)

以下のとおり、膵臓がんPDX(PK565)のGPC1発現の確認を行った。

【0159】

パラフィン包埋組織の薄切を脱パラフィン後、アルコールによる脱水を行った。GPC1に対する免疫組織化学染色法は抗GPC-1抗体(Genetex: GTX104557)とChemMate Envision kit HRP 500T(Dako社: K5007)を用いて行った。PK565におけるGPC1の発現は膵臓がん細胞で陽性と陰性が混在するヘテロジニアスな腫瘍であることが確認された。

【0160】

6週齢のNOG雌性マウスに膵臓がんPDXを皮下移植し、移植後腫瘍サイズが約100mm³となったところで、PBS、コントロールADC(10mg/kg)および、実施例4において作製したヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)(1mg/kg)、(3mg/kg)、(10mg/kg)の投与を開始した。投与を開始した日を0日目として、0日目、7日目、14日目および21日目に静脈内投与した。腫瘍体積および体重を0日目以降週2回の頻度で42日目まで計測した。

【0161】

(結果)

in vivoにおける薬効試験では、GPC1陽性の膵臓がんPDXマウス(PK565)に対しても、薬剤を1週間毎に合計4回静脈内投与した結果、ヒト化GPC1-ADCは濃度依存的な高い抗腫瘍効果を発揮した(図13)。この際、体重減少など認められなかったため、GPC1-ADCはコントロールADCと比較して特徴的な毒性を示さなかった。このことはin vivoにおいて、抗がん剤を全身投与することと比較して、GPC1-ADCを用いることで抗がん剤をGPC1陽性のがん細胞の特異的にデリバリーすることで、高い薬効と低い毒性を達成することでGPC1陽性のがんに対する画期的な治療薬の開発につながる。

【0162】

(実施例10：膵臓がんPDX(PK175)を用いたヒト化GPC1-ADC(MMAE)のin vivoでの薬効試験)

(材料および方法)

以下のとおり、膵臓がんPDX(PK175)のGPC1発現の確認を行った。

【0163】

パラフィン包埋組織の薄切を脱パラフィン後、アルコールによる脱水を行った。GPC1に対する免疫組織化学染色法は抗GPC-1抗体(Genetex: GTX104557)とChemMate Envision kit HRP 500T(Dako社: K5007)を用いて行った。PK175におけるGPC1の発現は膵臓がん細胞とがん関連線維芽細胞(CAF)の両方で陽性の腫瘍であることが確認された。

【0164】

6週齢のNOG雌性マウスに膵臓がんPDXを皮下移植し、移植後腫瘍サイズが約100mm³となったところで、PBS、および、ヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)(1mg/kg)、(3mg/kg)、(10mg/kg)の投与を開始した。投与を開始

10

20

30

40

50

した日を0日目として、0日目、7日目、14日目および21日目に静脈内投与した。腫瘍体積および体重を0日目以降週2回の頻度で42日目まで計測した。

【0165】

(結果)

in vivoにおける薬効試験では、GPC1陽性の膵臓がんPDXマウス(PK175)に対しても、薬剤を1週間毎に合計4回静脈内投与した結果、ヒト化GPC1-ADCは濃度依存的な高い抗腫瘍効果を発揮した(図14)。この際、体重減少など認められなかったため、GPC1-ADCはコントロールADCと比較して特徴的な毒性を示さなかった。このことはin vivoにおいて、抗がん剤を全身投与することと比較して、GPC1-ADCを用いることで抗がん剤をGPC1陽性のがん細胞の特異的にデリバリーすることで、高い薬効と低い毒性を達成することでGPC1陽性のがんに対する画期的な治療薬の開発につながる。

10

【0166】

(実施例11:食道がんPDX(ESCC14)を用いたGPC1-ADCのin vivoでの薬効試験)

(材料および方法)

以下のとおり、食道がんPDX(ESCC14)のGPC1発現の確認を行った。

【0167】

パラフィン包埋組織の薄切を脱パラフィン後、アルコールによる脱水を行った。GPC1に対する免疫組織化学染色法は抗GPC-1抗体(Genetex: GTX104557)とChemMate Envision kit HRP 500T(Dako社: K5007)を用いて行った。ESCC14におけるGPC1の発現は食道がん細胞で均一に高発現するホモジニアスな腫瘍であることが確認された。

20

【0168】

6週齢のNOG雌性マウスに食道がんPDXを皮下移植し、移植後腫瘍サイズが約100mm³となったところで、コントロールとしてPBS、および、実施例4において作製したヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)(1mg/kg)、(3mg/kg)、(10mg/kg)の投与を開始した。投与を開始した日を0日目として、0日目、7日目、14日目および21日目に静脈内投与した。腫瘍体積および体重を0日目以降週2回の頻度で42日目まで計測した。

30

【0169】

(結果)

in vivoにおける薬効試験では、GPC1陽性の食道がんPDXマウス(ESCC14)に対しても、薬剤を1週間毎に合計4回静脈内投与した結果、ヒト化GPC1-ADCは濃度依存的な高い抗腫瘍効果を発揮した(図15)。この際、体重減少など認められなかったため、GPC1-ADCはコントロールADCと比較して特徴的な毒性を示さなかった。このことはin vivoにおいて、抗がん剤を全身投与することと比較して、GPC1-ADCを用いることで抗がん剤をGPC1陽性のがん細胞の特異的にデリバリーすることで、高い薬効と低い毒性を達成することでGPC1陽性のがんに対する画期的な治療薬の開発につながる。

40

【0170】

(実施例12: mGPC1強制発現マウス大腸がん細胞株(mGPC1-MC38)のFACS解析によるGPC1発現解析)

(材料および方法)

mGPC1-MC38細胞に対して、ヒト化抗GPC1抗体(clone T2)を1次抗体として用い、2次抗体としてはFITC標識anti-human IgG-FITC(Jackson Immuno research社、型番: 109-095-098)を用い、FACS CantoII(BD社)を用いて測定し、測定データはBD FACSDiva software(BD社)を用いて解析した。

【0171】

50

さらに、実施例 8 に記載と同様の方法で mGPC1-MC38 細胞に対して、*in vitro* ADC アッセイを実施した。

【0172】

(結果)

MMAE など ADC に用いるペイロードの種類によっては、がん細胞に対して *Immunogenic cell death* (ICD) を伴う細胞死を誘導することが知られている。ICD を起こしたがん細胞からは *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) として知られる核内タンパク質の HMGB1 などが細胞外に放出され、TLR-4 を介した樹状細胞の成熟・活性化が促進される抗原特異的 T 細胞が腫瘍内に浸潤し、抗腫瘍効果を発揮する。そのため、ヒト化 GPC1-ADC と免疫チェックポイント阻害剤を併用することで、相乗的な抗腫瘍効果が得られることが期待される。そこで、MC38 (マウス大腸がん細胞株) にマウス GPC1 を安定発現させた MC38-mGPC1 を用いて *in vitro* およびシンジェニックマウスを用いた *in vivo* での実験を実施した。ヒト化抗 GPC1-ADC は MC38-mGPC1 に対して *in vitro* で細胞増殖阻害活性を示した (図 16)。

10

【0173】

(実施例 13: ELISA による培養上清中の HMGB-1 の定量)

(材料および方法)

MC38-mGPC1 に control-ADC、ヒト化 GPC1-ADC および MMAE を *in vitro* で添加し、48 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の HMGB-1 の濃度は HMGB1 ELISA KIT II - HMGB1 測定試薬 (シノテスト社、型番 SNO-326054329) を用いて実施した。

20

【0174】

(結果)

MC38-mGPC1 に実施例 4 において作製したヒト化抗 GPC1-ADC を添加し、ELISA 法にて培養上清中の HMGB1 を定量した結果、HMGB1 の細胞外放出が誘導されていることが確認された (図 17)。HMGB1 (*high mobility group box-1*) は DAMPs (損傷関連分子パターン) の 1 つとして知られている核内タンパク質である。ある種の抗がん剤はがん細胞が細胞死を起こす際に HMGB1 を細胞外に放出するため、免疫原性細胞死 (*immunogenic cell death*) の指標として知られている。細胞外に放出された HMGB1 は樹状細胞上の TLR4 と結合することで樹状細胞の活性化、成熟化を促進し、その結果、T 細胞の腫瘍組織への浸潤などが促進される。

30

【0175】

(実施例 14: 大腸がんシンジェニックモデルマウスを用いたヒト化 GPC1-ADC (MMAE) と抗 PD1 抗体の併用による相乗効果の確認)

(材料および方法)

8 週齢の C57BL/6 雌性マウスに MC38-mGPC1 を皮下移植し、移植後腫瘍サイズが約 75 mm³ となったところで 4 群に分け、PBS、実施例 4 において作製したヒト化抗 GPC1-ADC (MMAE) (10 mg/kg)、抗マウス PD1 抗体 (clone RMP1-14) (3 mg/kg)、ヒト化抗 GPC1-ADC (MMAE) (10 mg/kg) + 抗マウス PD1 抗体 (clone RMP1-14) (3 mg/kg) の投与を開始した。投与を開始した日を 0 日目として、0 日目、3 日目、7 日目および 10 日目に ADC は静脈内投与し、抗マウス PD1 抗体は腹腔内投与した。腫瘍体積および体重を 0 日目以降週 2 回の頻度で 21 日目まで計測した。

40

【0176】

(結果)

MC38-mGPC1 を C57BL/6 マウス皮下に移植したシンジェニックモデルに対して、Vehicle control、ヒト化抗 GPC1-ADC、抗 PD1 抗体、ヒト化抗 GPC1-ADC + 抗 PD1 抗体の 4 群に分け、薬剤を週 2 回の頻度で合計 4 回

50

投与し、抗腫瘍効果を評価した。その結果、ヒト化GPC1-ADCと抗PD1抗体は単剤投与群と比較し、併用投与群において有意な抗腫瘍効果が認められた。一方で、ヒト化GPC1-ADCと抗PD1抗体の併用投与による体重減少は認められなかった(図18)。これらの結果、ヒト化GPC1-ADCはチェックポイント阻害剤との併用によって相乗的な抗腫瘍効果が得られることが期待される。

【0177】

(実施例15：膵臓がんPDX(PK565)を用いたヒト化GPC1-ADC(MMAE)の*in vivo*での作用機序解析)

【0178】

(材料および方法)

6週齢のNOG雌性マウスに膵臓がんPDX(PK565)を皮下移植し、移植後腫瘍サイズが約100mm³となったところで、PBS、コントロールADC(10mg/kg)および、実施例4において作製したヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)(1mg/kg)、(3mg/kg)、(10mg/kg)を投与した。投与24時間後に腫瘍を摘出した。摘出した組織は10%中性ホルマリン緩衝液で固定した後、パラフィン包埋組織を作成し、薄切を調製した。それぞれの薄切について、G2/M期での細胞周期が停止したがん細胞を評価するために、phospho-histone H3(Ser10)の発現を免疫組織化学染色法により解析した。

【0179】

(結果)

その結果、PBS、および、コントロールADC(10mg/kg)投与群と比較して、ヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)投与群では濃度依存的にG2/M期において細胞周期が停止したがん細胞の割合が有意に増加したことが確認された(図19)。ADCのペイロードががん細胞に作用してG2/M期にて細胞周期を停止させるとがん細胞の増殖が停止し、がん患者の生存期間延長に貢献し得る。

【0180】

(実施例16：膵臓がん遠隔転移組織における免疫組織化学染色法によるGPC1発現の解析)

膵臓がんにおいてはリンパ節転移や肝転移など遠隔転移が予後不良因子として知られている。そこで、GPC1が膵臓がんの原発巣だけでなく、遠隔転移巣においても発現していれば治療標的として有用性が高いと考えられる。そこで、膵臓がんのリンパ節転移、肝転移、副腎転移組織に対して、免疫組織化学染色法によりGPC1の発現を評価した。その結果、膵臓がんのリンパ節転移、肝転移、副腎転移のいずれの組織においてもGPC1の発現が陽性であることが確認された(図20)。したがって、本願発明のヒト化GPC1-ADC(MMAE)は、GPC1陽性がんの転移性がんの治療または予防に有効であることが示唆される。

【0181】

(実施例17：膵臓がん肝転移モデルの作製とヒト化GPC1-ADCによる薬効試験)

【0182】

実施例16において示唆される、ヒト化GPC1-ADC(MMAE)の転移性がんの治療または予防の効果を確認するために、膵臓がん肝転移モデルを作成した。

【0183】

(材料および方法)

図21に示した手順で、BxPC3-Luc細胞をSCIDマウスの脾臓内に投与し、投与1~2週間後に脾臓を摘出することで膵臓がん肝転移モデルを作製した。IVISを用いてルシフェラーゼ活性を測定することで肝臓内に転移したBxPC3-Luc細胞の増殖をモニターした。肝転移モデルマウスをPBS投与群と、実施例4において作製したヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)(10mg/kg)投与群の2群に分け、実施例16と同様の手順で薬効試験を行った。

【0184】

(結果)

その結果、図22の左に示すようにIVISにより計測した発酵の値はPBS投与群と比較し、ヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)(10mg/kg)投与群では有意に阻害されていた。また、生存解析を行った結果、ヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)(10mg/kg)は膵臓がん肝転移モデルの生存期間を有意に延長することが確認された。
【0185】

(実施例18：転移性がんにおけるヒト化GPC1-ADCによる薬効試験)

肝臓、肺、脳、骨、腹膜、副腎などに転移する転移モデルを作成し、転移モデルにおけるヒト化GPC1-ADCによる薬効を確認する。ヒト化GPC1-ADCは原発と転移巣の両方に対して薬効を発揮し、生存期間の延長効果が期待される。

【0186】

(実施例19：製剤例)

本願発明のヒト化抗GPC1-ADC(MMAE)は、以下の静脈内注射用製剤として提供され得る。

ヒト化抗GPC1-ADC	100mg
ポリソルベート80	5mg
塩化ナトリウム	100mg
クエン酸ナトリウム水和物	80mg
pH調整剤	適量
全量	10mL

【0187】

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は、2020年6月11日に出願された日本国特許出願第2020-101856号の優先権の利益を請求し、その内容は参照によって本明細書に組み込まれる。

【産業上の利用可能性】

【0188】

がんの治療または予防のための医薬が提供された。このような技術に基づく産業（製薬等）において利用可能な技術が提供される。

【配列表フリーテキスト】

【0189】

配列番号1：ヒトGlypican-1の核酸配列
配列番号2：ヒトGlypican-1のアミノ酸配列
配列番号3：マウスGlypican-1の核酸配列
配列番号4：マウスGlypican-1のアミノ酸配列
配列番号5：01a033重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号6：01a033軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号7：ヒト化重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号8：クローンT2のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号9：クローンT7のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号10：クローンT8のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号11：クローンT1のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号12：クローンT36のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号13：クローンT57のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号14：クローンT10のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号15：クローンT34のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号16：クローンT56のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

配列番号 17 : クローン T 3 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 18 : クローン T 11 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 19 : クローン T 28 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 20 : クローン T 43 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 21 : クローン T 59 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 22 : クローン T 31 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 23 : クローン T 22 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 24 : クローン T 26 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 25 : クローン T 32 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 26 : クローン T 33 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	10
配列番号 27 : クローン T 29 のヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
配列番号 28 : ヒト化重鎖の重鎖 C D R 1 のアミノ酸	
配列番号 29 : ヒト化重鎖の重鎖 C D R 2 のアミノ酸	
配列番号 30 : ヒト化重鎖の重鎖 C D R 3 のアミノ酸	
配列番号 31 : クローン T 2 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 32 : クローン T 2 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 33 : クローン T 2 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 34 : クローン T 7 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 35 : クローン T 7 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 36 : クローン T 7 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	20
配列番号 37 : クローン T 8 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 38 : クローン T 8 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 39 : クローン T 8 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 40 : クローン T 1 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 41 : クローン T 1 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 42 : クローン T 1 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 43 : クローン T 36 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 44 : クローン T 36 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 45 : クローン T 36 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 46 : クローン T 57 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	30
配列番号 47 : クローン T 57 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 48 : クローン T 57 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 49 : クローン T 10 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 50 : クローン T 10 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 51 : クローン T 10 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 52 : クローン T 34 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 53 : クローン T 34 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 54 : クローン T 34 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 55 : クローン T 56 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 56 : クローン T 56 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	40
配列番号 57 : クローン T 56 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 58 : クローン T 3 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 59 : クローン T 3 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 60 : クローン T 3 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 61 : クローン T 11 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 62 : クローン T 11 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 63 : クローン T 11 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 64 : クローン T 28 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 65 : クローン T 28 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 66 : クローン T 28 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	50

配列番号 67 : クローン T 43 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 68 : クローン T 43 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 69 : クローン T 43 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 70 : クローン T 59 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 71 : クローン T 59 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 72 : クローン T 59 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 73 : クローン T 31 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 74 : クローン T 31 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 75 : クローン T 31 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 76 : クローン T 22 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 77 : クローン T 22 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 78 : クローン T 22 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 79 : クローン T 26 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 80 : クローン T 26 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 81 : クローン T 26 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 82 : クローン T 32 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 83 : クローン T 32 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 84 : クローン T 32 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 85 : クローン T 33 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 86 : クローン T 33 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 87 : クローン T 33 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 88 : クローン T 29 の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列
配列番号 89 : クローン T 29 の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列
配列番号 90 : クローン T 29 の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列
配列番号 91 : キメラ抗体およびヒト化抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列
配列番号 92 : キメラ抗体およびヒト化抗体の軽鎖定常領域のアミノ酸配列

【図面】

【図 1】

Ligand	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	R_{max} [RU]	KD	CH^2
chimeric-mouse Ab (01a033)	3.02E+05	3.09E-03	74.6	1.02E-08	4.89E-01
T1	2.38E+05	1.34E-03	58.9	5.62E-09	2.57E-01
T2	2.40E+05	1.25E-03	60.3	5.20E-09	3.34E-01
T3	2.29E+05	7.13E-04	62.9	3.11E-09	3.10E-01
T7	3.43E+05	4.11E-03	64.5	1.20E-08	5.89E-01
T8	2.34E+05	1.18E-03	62	5.07E-09	3.31E-01
T10	1.99E+05	1.50E-03	56.7	7.55E-09	2.78E-01
T11	1.86E+05	5.06E-02	79.6	2.72E-07	5.46E-01
T22	2.32E+05	5.06E-02	73.4	2.18E-07	9.04E-02
T26	1.78E+03	1.30E-01	13606.9	7.28E-05	3.98E-01
T28	3.13E+05	6.79E-03	59	2.17E-08	4.44E-01
T29	2.05E+05	6.64E-02	78.4	3.24E-07	8.95E-02
T31	1.98E+05	5.39E-02	65.4	2.71E-07	2.37E-01
T32	2.08E+05	6.03E-02	81.2	2.90E-07	6.64E-02
T33	1.60E+05	7.38E-02	70.4	4.62E-07	4.14E-02
T34	1.72E+05	3.93E-03	59.2	2.28E-08	4.28E-01
T36	2.31E+05	2.27E-03	60.3	9.80E-09	1.84E-01
T43	1.69E+05	1.06E-02	62.4	6.24E-08	1.99E-01
T56	2.59E+05	1.80E-03	46.6	6.93E-09	3.65E-01
T57	1.32E+05	1.35E-02	97	1.02E-07	1.36E-01
T59	1.97E+05	5.93E-02	96.9	3.02E-07	9.81E-02
Anti-GPC1 mAb 01a033	1.23E+05	3.88E-03	65.7	3.16E-08	1.15E+00

Figure 1

【図 2】

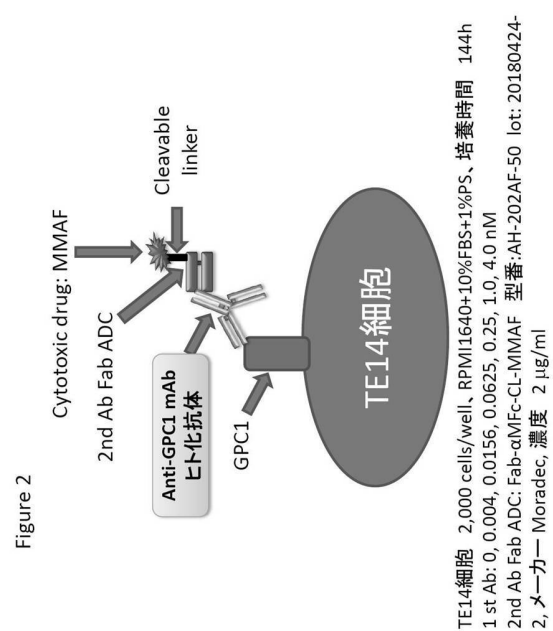


Figure 2

10

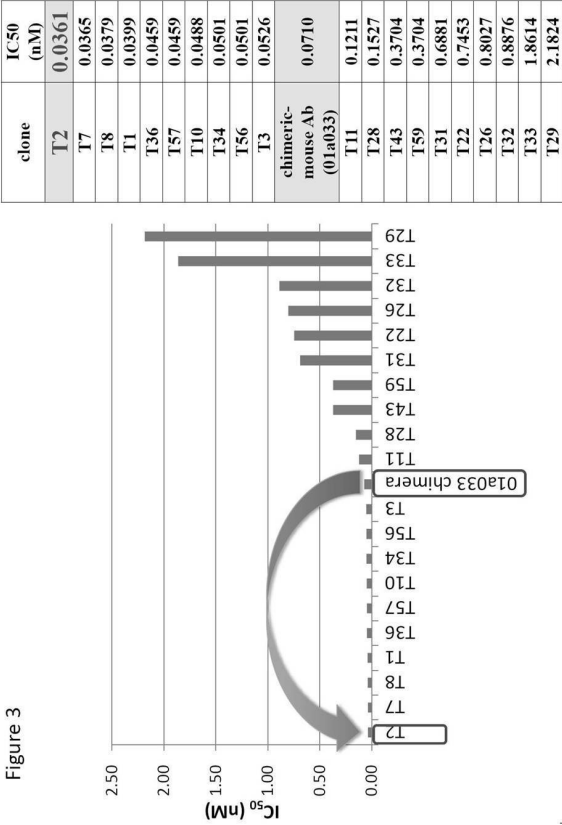
20

30

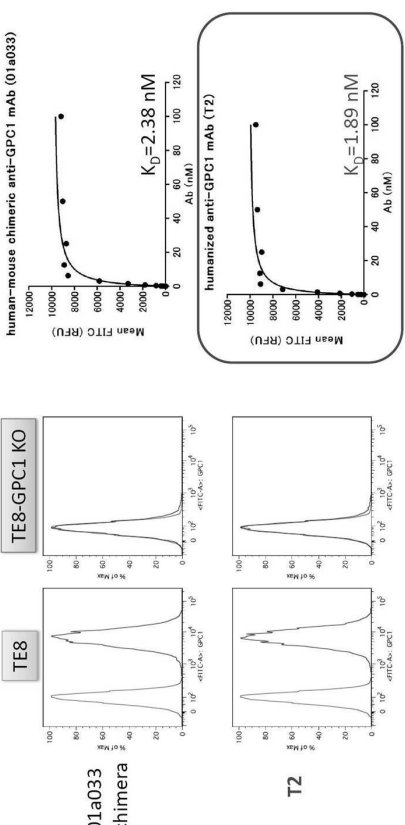
40

50

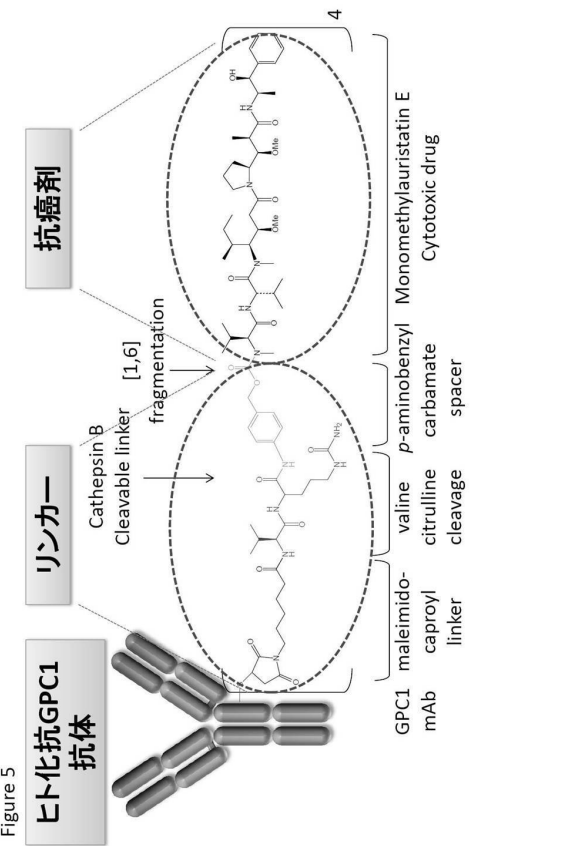
【図 3】



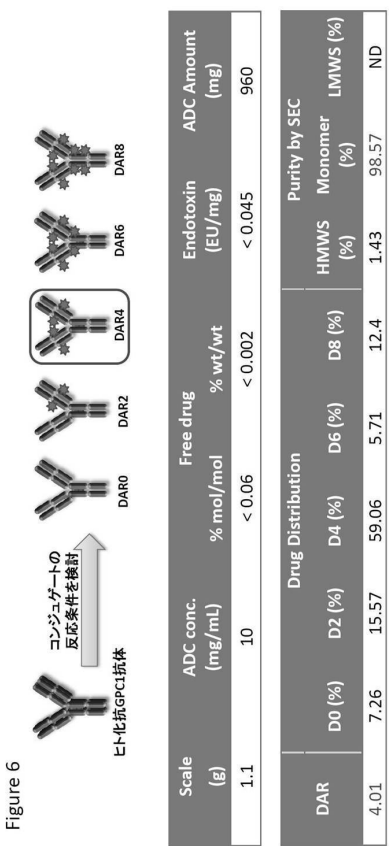
【図 4】



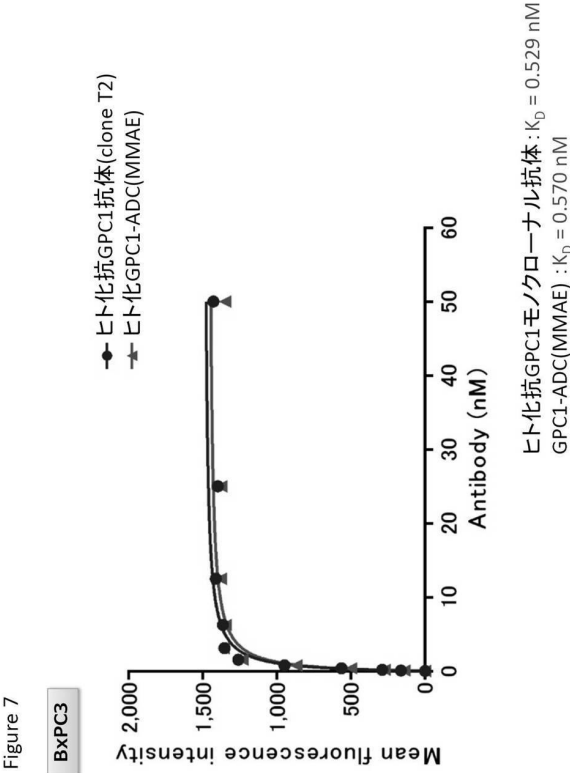
【図 5】



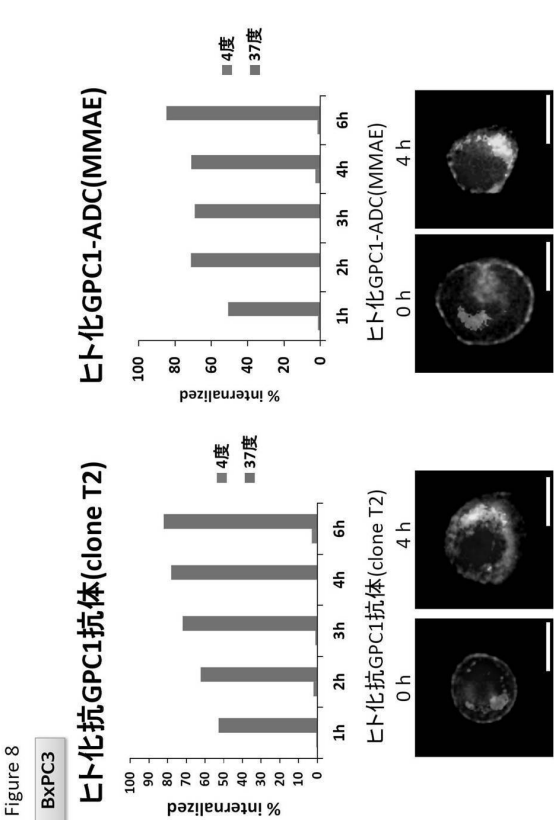
【図 6】



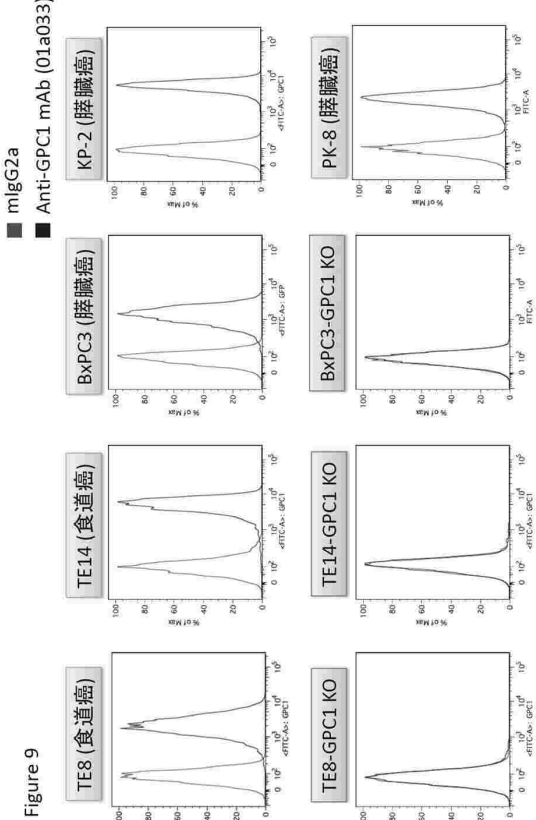
【図 7】



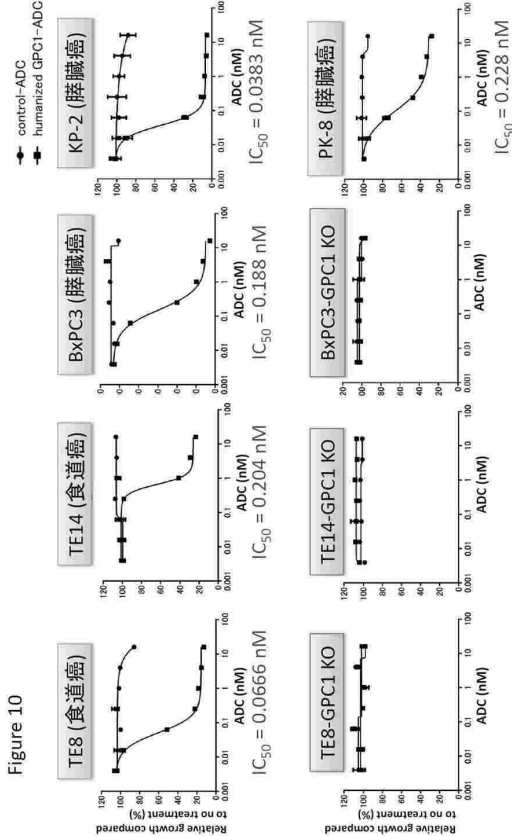
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

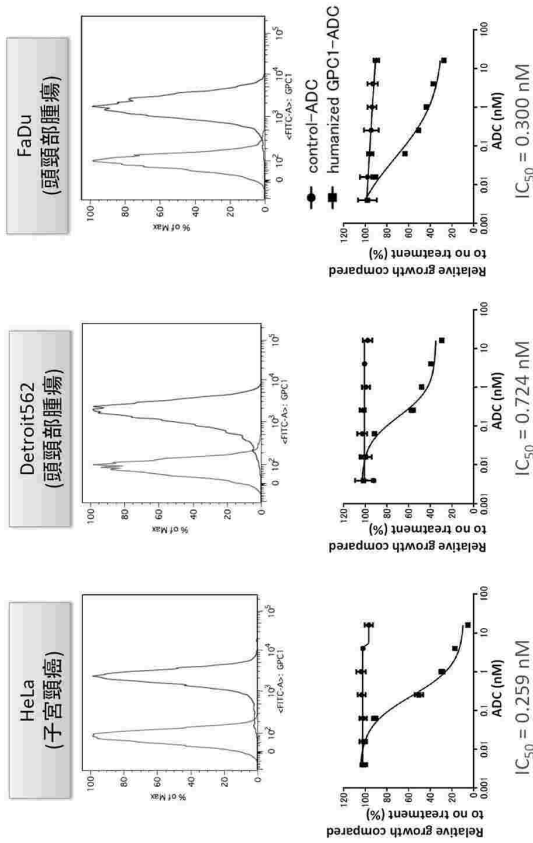
20

30

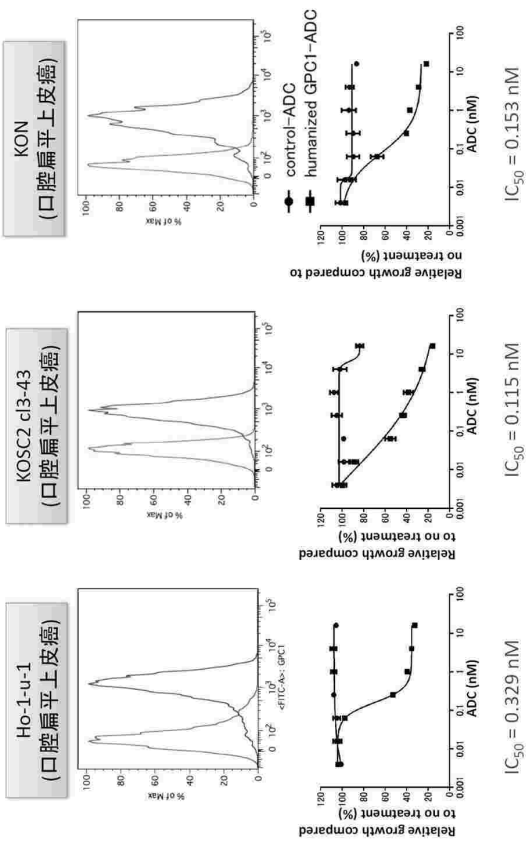
40

50

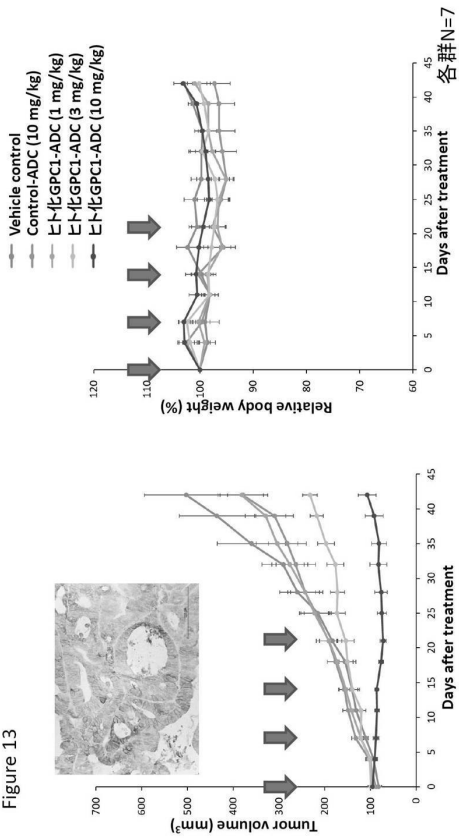
【図 1 1】



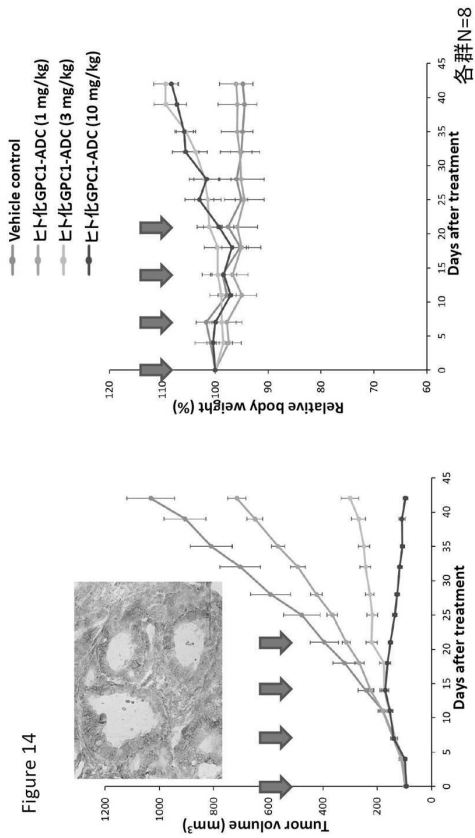
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

20

30

40

50

【図 1 5】

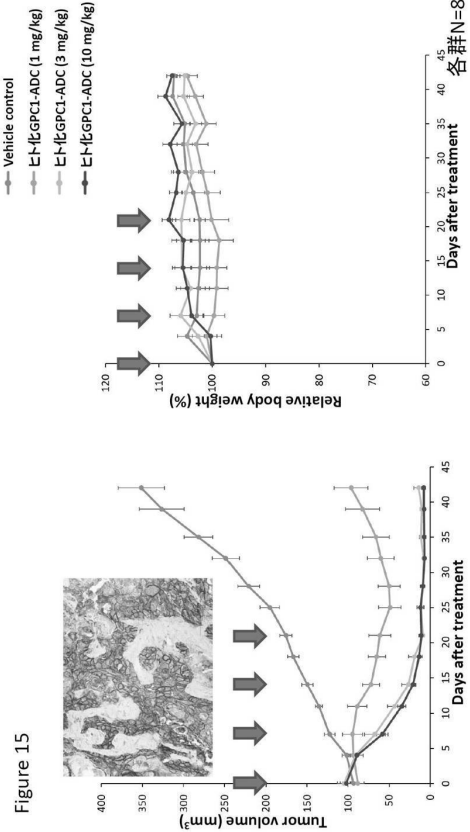


Figure 15

【図 1 7】

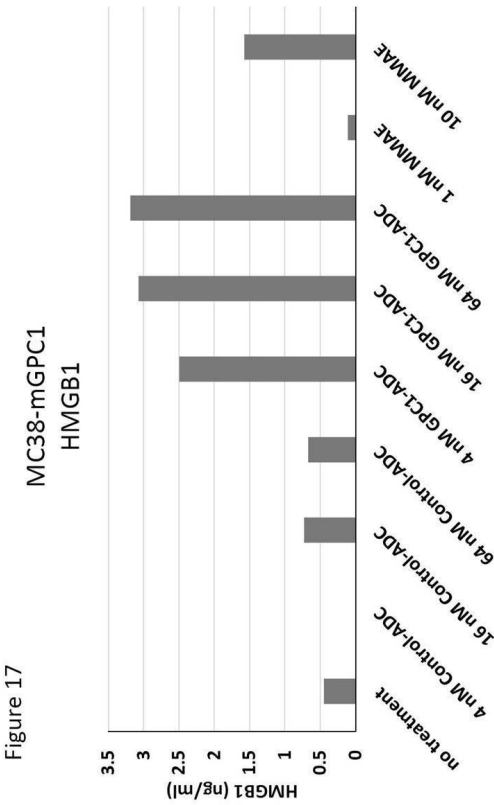


Figure 17

【図 1 6】

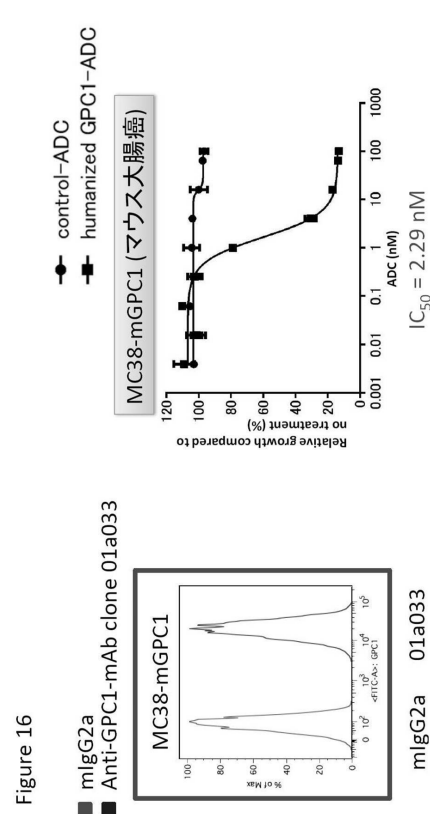


Figure 16

【図 1 8】

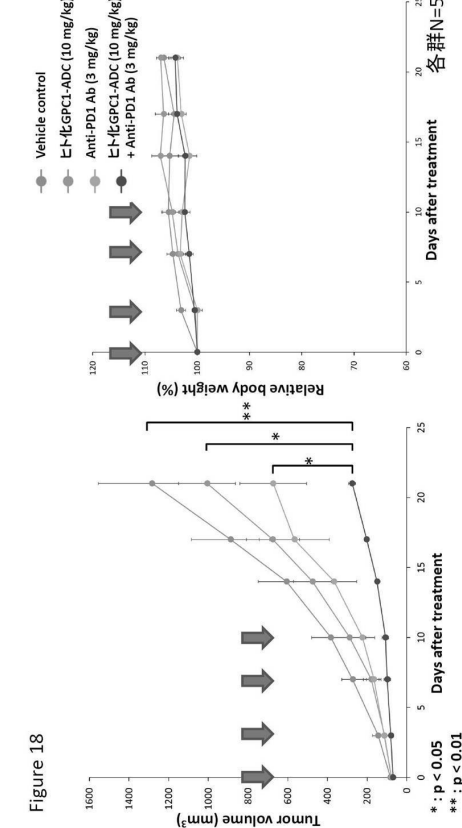


Figure 18

10

20

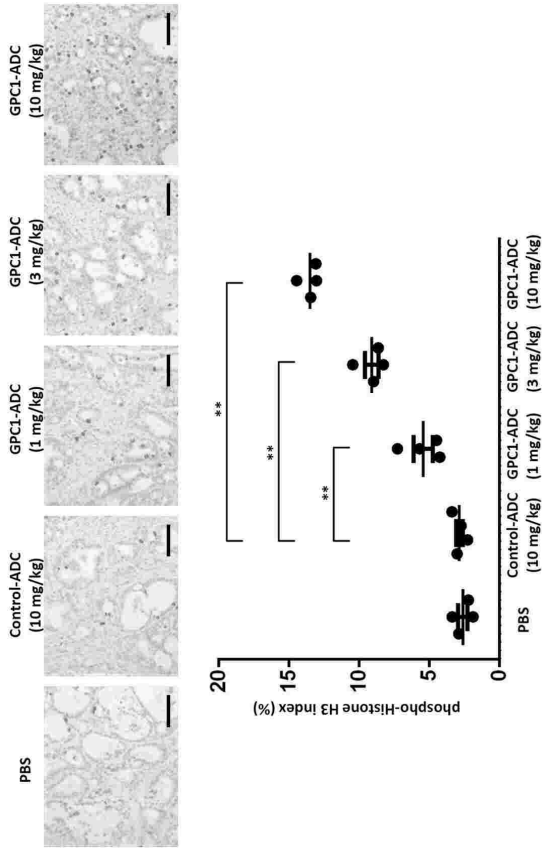
30

40

50

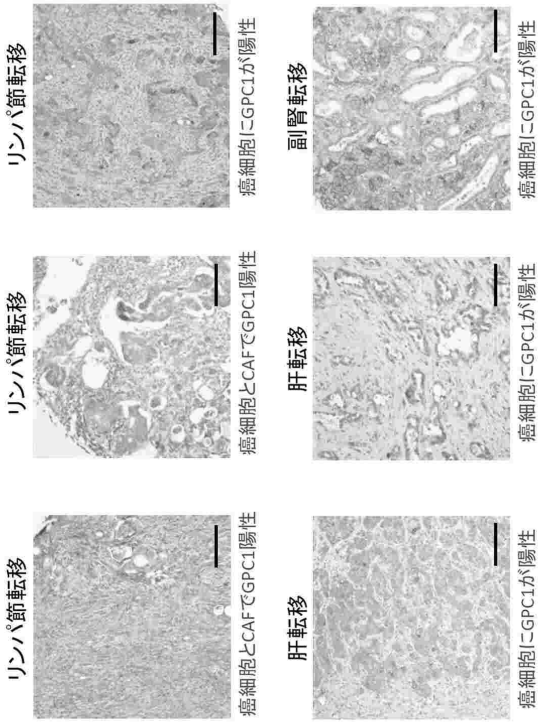
【図 19】

Figure 19



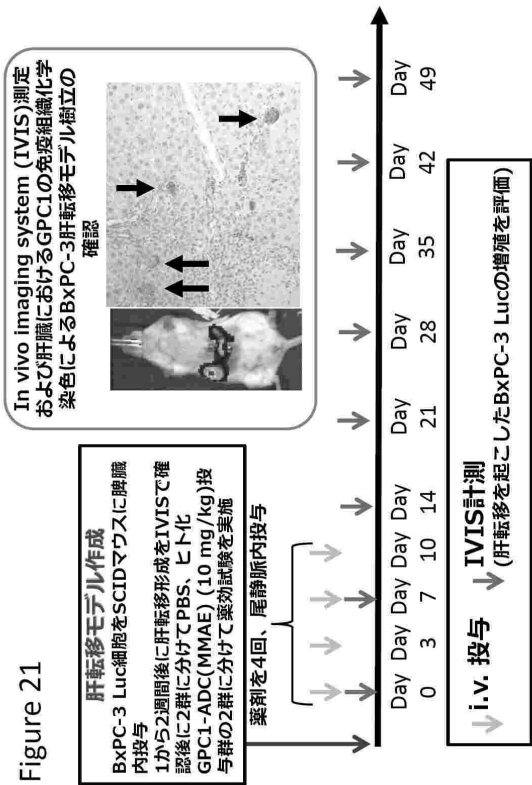
【図 20】

Figure 20



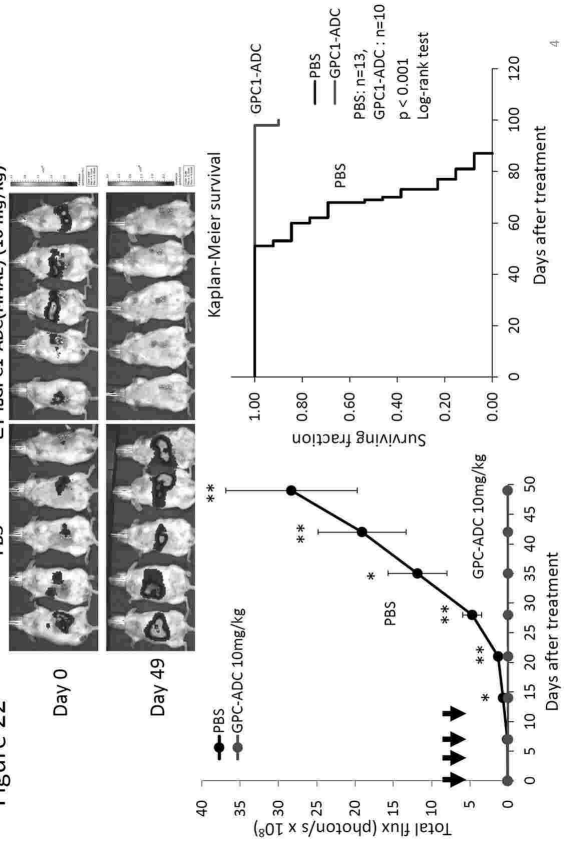
【図 21】

Figure 21



【図 22】

Figure 22



【配列表】
0007659326000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
			C 1 2 N	15/13	

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 8 / 1 9 9 3 1 8 (WO, A 1)

特表 2 0 2 0 - 5 0 3 2 4 5 (JP, A)

特表 2 0 1 9 - 5 1 3 1 1 8 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 8 / 2 0 0 4 9 6 (WO, A 1)

MATSUZAKI, Satoko et al., Anti-glypican-1 antibody-drug conjugate exhibits potent preclinical antitumor activity against glypican-1 positive uterine cervical cancer, Int. J. Cancer, 2018年, Vol. 142, pp. 1056-1066

NISHIGAKI, Takahiko et al., Anti-glypican-1 antibody-drug conjugate is a potential therapy against pancreatic cancer, Br. J. Cancer, 2020年03月10日, Vol. 122, pp. 1333-1341

LUND, Maria E. et al., The Role of Glypican-1 in the Tumour Microenvironment, Tumor Microenvironment. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020年04月08日, Vol. 1245, pp. 163-176

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

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

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

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

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

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