

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-534806
(P2024-534806A)

(43)公表日 令和6年9月26日(2024.9.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全156頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-510298(P2024-510298)			(71)出願人	517171347
(86)(22)出願日	令和4年8月19日(2022.8.19)				アディセット セラピューティクス, イ
(85)翻訳文提出日	令和6年4月17日(2024.4.17)				ンク.
(86)国際出願番号	PCT/US2022/040931				アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(87)国際公開番号	WO2023/023354				6 5, レッドウッド シティ, ブリッジ
(87)国際公開日	令和5年2月23日(2023.2.23)				パークウェイ 1 0 0 0
(31)優先権主張番号	63/235,093			(74)代理人	110002077
(32)優先日	令和3年8月19日(2021.8.19)				園田・小林弁理士法人
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(72)発明者	ヘイズ, サンドラ エム.
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4
				(72)発明者	0 2, サン マテオ, フォードム ロード 6 0 0
					ウォン, ジョナサン タ シン
					アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1
					3 4, サンフランシスコ, フェルトン 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 膜結合型グリピカン3の検出方法

(57)【要約】

実施形態は、抗GPC3抗体を含む抗GPC3抗体組成物、ならびにかかる抗体及び組成物を、がんの予防、診断、及び治療のために使用する方法を提供する。1つの実施形態では、抗GPC3免疫療法が、がんの細胞がGPC3を発現することを特徴とするがんに与える治療効果を予測する方法は、対象における該細胞の存在を免疫組織化学的方法によって検出することを含み、該細胞の存在が検出された場合、該抗GPC3免疫療法が、該対象のがんに対して治療効果を有すると予測される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリピカン 3 (GPC3) に結合する単離されたモノクローナル抗体であって、前記抗 GPC3 抗体の重鎖は、配列番号 6 として記載の相補性決定領域 (CDR) 1、配列番号 8 として記載の CDR 2、及び配列番号 10 として記載の CDR 3 を含み、前記抗体の軽鎖は、配列番号 13 として記載の CDR 1、配列番号 15 として記載の CDR 2、及び配列番号 17 として記載の CDR 3 を含む、前記単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体であって、前記抗体の重鎖は、配列番号 2 のアミノ酸残基 31～35、50～66、及び 99～105 としてそれぞれ記載の CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 を含み、前記抗体の軽鎖は、配列番号 4 のアミノ酸残基 24～34、50～56、及び 89～97 としてそれぞれ記載の CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 を含む、前記単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 3】

前記抗体の重鎖が配列番号 2 を含み、前記抗体の軽鎖が配列番号 4 を含む、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 4】

前記抗体が、

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む可変重 (VH) ドメイン、及び

(ii) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む可変軽 (VL) ドメインを含む、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 5】

前記抗体が、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、二重特異性抗体である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 7】

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

【請求項 8】

前記抗体が、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab)₂' 断片、一本鎖可変断片 (scFv)、またはジスルフィド安定化可変断片 (dsFv) である、請求項 7 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 9】

組織調製物中の GPC3 を検出する方法であって、前記組織調製物を、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体と、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体と前記組織調製物の細胞の細胞膜に存在する GPC3 との複合体の形成に十分な条件下で接触させること、及び前記抗体の前記組織調製物に対する結合を検出することを含む、前記方法。

【請求項 10】

前記組織調製物が、肝細胞癌 (HCC)、黒色腫、肺扁平上皮癌、メルケル細胞癌、または卵巣明細胞癌の腫瘍生検を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記モノクローナル抗体が、直接標識される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

さらに、前記モノクローナル抗体に特異的に結合する二次抗体と、前記組織調製物を接触させること、及び前記二次抗体の結合を検出することを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記抗体の前記組織サンプルへの結合を検出することがさらに、前記検出された複合体の量をスコアリングすることを含む、請求項 9～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記スコアリングが、病理学者によって行われる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記複合体の存在の検出が、デジタル化を介して行われ、前記スコアリングが、前記検出された複合体のデジタル化に基づいて自動化される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記スコアリングがさらに、免疫組織化学を介して検出された前記複合体の染色強度を、整数スケール 0（陰性）～3+を使用して特定すること、各強度レベルで正に染色された細胞のパーセンテージを記録すること、及び各強度レベルで正に染色された細胞のパーセンテージに基づいて、膜結合型の H スコアを計算することを含む、請求項 13～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 17】

抗 GPC3 免疫療法が、がんに与える治療効果を予測する方法であって、前記がんは、前記がんの細胞が GPC3 を発現することの特徴とし、請求項 9～16 のいずれか 1 項に記載の方法を介して対象における前記細胞の存在を検出することを含む前記方法であり、前記抗 GPC3 抗体と、前記がん細胞の膜で発現される GPC3 との複合体が検出された場合、前記抗 GPC3 免疫療法が、前記対象の前記がんに対して治療効果を有すると予測される、前記方法。

20

【請求項 18】

前記治療効果を予測する方法は、前記対象があらゆる抗 GPC3 免疫療法を受ける前に行われる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記治療効果を予測する方法は、前記対象が、すでに前記抗 GPC3 免疫療法を受けている過程で行われる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗 GPC3 免疫療法が、キメラ抗原受容体（CAR）T 細胞療法、または CAR NK 細胞療法を含み、前記 CAR が、膜結合型 GPC3 を特異的に認識するように設計される、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 21】

前記抗 GPC3 免疫療法が、抗 GPC3 抗体を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 23】

前記モノクローナル抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 1 を含み、前記抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 3 を含む、請求項 22 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 24】

請求項 22 または請求項 23 に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター。

40

【請求項 25】

請求項 24 に記載の発現ベクターで形質転換された、単離された宿主細胞。

【請求項 26】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含む二重特異性抗体。

【請求項 27】

請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体を含む、抗体薬物複合体（ADC）。

【請求項 28】

請求項 7 または請求項 8 に記載の抗体断片を含むキメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項 29】

50

キメラ抗原受容体（CAR）を含む修飾免疫細胞であって、前記CARが、請求項28に記載のCARを含む、前記修飾免疫細胞。

【請求項30】

修飾T細胞である、請求項29に記載の修飾免疫細胞。

【請求項31】

$\alpha\beta$ T細胞である、請求項30に記載の修飾免疫細胞。

【請求項32】

$\gamma\delta$ T細胞である、請求項30に記載の修飾免疫細胞。

【請求項33】

修飾NK細胞である、請求項29に記載の修飾免疫細胞。

【請求項34】

請求項29～33のいずれか1項に記載の複数の修飾免疫細胞。

【請求項35】

請求項1に記載の抗体によって特異的に認識されるGPC3エピトープを提示する細胞の成長を阻害する方法であって、前記細胞を、請求項1に記載の単離されたモノクローナル抗体、請求項29～34のいずれか1項に記載の修飾免疫細胞（複数可）、または請求項27に記載のADCと接触させることを含む、前記方法。

【請求項36】

請求項1～6のいずれか1項に記載の単離されたモノクローナル抗体、請求項29～34のいずれか1項に記載の修飾免疫細胞（複数可）、または請求項27に記載のADCの治療有効量、及び医薬的に許容される担体を含む組成物。

【請求項37】

がんを有する対象を治療する方法であって、GPC3を発現するがんを有する対象を選択すること、及び請求項35に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、それによって前記対象の前記がんを治療する、前記方法。

【請求項38】

前記がんが、肝臓癌、卵巣癌、胃癌、メルケル細胞癌、または肺癌である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記がんの治療のための薬剤の調製における、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【請求項40】

前記がんの治療のための薬剤の調製における、請求項29～33のいずれか1項に記載の修飾免疫細胞（複数可）の使用。

【請求項41】

前記がんの治療のための薬剤の調製における、請求項27に記載のADCの使用。

【請求項42】

前記がんの治療のための薬剤の調製における、請求項28に記載のCARの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年8月19日に出願された米国仮出願第63／235,093号に対する優先権の利益を主張する。

【0002】

本発明は、細胞表面でグリピカン3を発現するがん細胞を標的とする抗体、ならびにかかるがんの予防、診断、及び治療のためのかかる抗体の組成物及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

グリピカン3（GPC3）は、膜結合型ヘパリン硫酸プロテオグリカンであり、約70

10

20

30

40

50

%～80%の肝細胞癌（HCC）、ならびに卵黄嚢腫瘍、胃癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、及び甲状腺癌で過剰発現される（Moek et al., 2018. The American Journal of Pathology, 8:9; 1973-1981）が、普通の健康な組織ではほとんど発現されない。この点で、GPC3は、有望な腫瘍抗原標的を表す。しかしながら、GPC3は、膜だけでなく、細胞質でも発現され得る。ある特定の有望な治療法（例えば、キメラ抗原受容体T細胞（CAR-T）療法）は、現在、細胞表面のGPC3を認識することのみが可能であるため、細胞表面のGPC3を特異的に標的とする療法、及び腫瘍細胞表面のGPC3レベルを正確に評価することが可能な診断方法が必要とされている。

【0004】

現在まで、GPC3のC末端に特異的な抗GPC3 mAb（1G12）を用いた定性的アッセイである、GPC3免疫組織化学（IHC）インビトロ診断（IVD）アッセイが、唯一商業的に利用可能である（Cell Marque（商標）、Rocklin, CA）。該アッセイの仕様によれば、該GPC3抗体は、HCCの新生細胞において、拡散型及び膜性の染色パターンを示す。さらに、1G12mAbの感度は、発現レベルが低い腫瘍細胞株では低いことが知られている（Phung et al., 2012. mAbs Landes Bioscience, 4:5; 592-599）。したがって、少なくとも上記に基づいて、特に、膜結合型GPC3を評価するためのIVDアッセイにおける使用のための、感度がより高く、GPC3発現腫瘍細胞の細胞膜を優先的に染色することが可能なmAbが必要である。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、より正確な診断分析及び治療のため、膜結合型GPC3と細胞質GPC3の識別を改善する組成物及び方法により、従来技術における前述の欠点に対処し、これを解決する。いくつかの実施形態では、本発明は、その断片を含めた抗GPC3抗体、ならびに、例えば、がんの診断、予防、及び／または治療のためのその使用方法を提供する。

【0006】

1つの実施形態では、本発明の抗GPC3抗体は、GPC3のC末端のベータ鎖に位置するGPC3エピトープに結合する。1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、配列番号2を含む重鎖可変領域及び配列番号4を含む軽鎖可変領域を含む。

【0007】

1つの実施形態では、本発明の抗GPC3抗体の重鎖は、配列番号6として記載の相補性決定領域（CDR）1、配列番号8として記載のCDR2、及び配列番号10として記載のCDR3を含む。

【0008】

1つの実施形態では、本発明の抗GPC3抗体の軽鎖は、配列番号13として記載のCDR1、配列番号15として記載のCDR2、及び配列番号17として記載のCDR3を含む。

【0009】

1つの実施形態では、本発明の抗GPC3抗体の重鎖は、配列番号6として記載の相補性決定領域（CDR）1、配列番号8として記載のCDR2、及び配列番号10として記載のCDR3を含み、本発明の抗GPC3抗体の軽鎖は、配列番号13として記載のCDR1、配列番号15として記載のCDR2、及び配列番号17として記載のCDR3を含む。

【0010】

1つの実施形態では、抗GPC3抗体の重鎖は、配列番号2のアミノ酸残基31～35、50～66、及び99～105としてそれぞれ記載のCDR1、CDR2、及びCDR3を含み、該抗体の軽鎖は、配列番号4のアミノ酸残基24～34、50～56、及び89～97としてそれぞれ記載のCDR1、CDR2、及びCDR3を含む。

【0011】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、本発明は、GPC3への結合をめぐって、配列番号2を含む重鎖可変領域及び配列番号4を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合する抗GPC3抗体を提供する。

【0012】

本発明の抗GPC3抗体は、例えば、モノクローナル抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片を含めた抗体断片、ダイアボディ、単ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、ならびに配列番号2を含む重鎖可変領域及び配列番号4を含む軽鎖可変領域を含む抗体のGPC3への結合を競合的に阻害する抗体を含む。

【0013】

1つの実施形態では、抗GPC3抗体は、配列番号6、配列番号8、及び配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

10

【0014】

1つの実施形態では、抗GPC3抗体は、配列番号13、配列番号15、及び配列番号17からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0015】

1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体である。

【0016】

1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、モノクローナル抗体である。

【0017】

1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、抗体断片である。

20

【0018】

1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、二重特異性抗体である。

【0019】

1つの態様では、本発明は、対象におけるがんの診断方法を提供し、該方法は、該対象中の、または該対象由来の生体サンプル中の該がんを含む細胞の細胞表面におけるGPC3の存在を検出することを含む。

【0020】

1つの態様では、本発明は、がんと診断された対象の予後を判断する方法を提供し、該方法は、該対象中の、または該対象由来の生体サンプル中の該がんを含む細胞の細胞表面で発現されるGPC3の存在を検出することを含む。1つの実施形態では、該方法は、該対象が、がんの治療のための治療薬を投与された後の該対象中の、または該対象由来の生体サンプル中のGPC3の存在を検出することを含む。実施形態では、該治療薬は、細胞表面でGPC3を発現するがんの細胞を含むがんの治療のための薬剤である。

30

【0021】

1つの態様では、本発明は、抗GPC3免疫療法が、がんに与える治療効果を予測する方法を提供する。実施形態では、該がんは、GPC3を発現するがんで構成される。実施形態では、該方法は、該細胞の存在を検出することを含み、該細胞が検出された場合、該抗GPC3免疫療法が、該対象のがんに対して治療効果を有すると予測される。実施形態では、該予測は、該対象が、あらゆる抗GPC3免疫療法を受ける前に行われる。実施形態では、該予測は、該対象が、抗GPC3免疫療法を受ける過程で行われる。

40

【0022】

1つの態様では、本発明は、本発明のGPC3抗体（またはその部分（複数可））をコードする核酸を提供する。

【0023】

1つの態様では、本発明は、本明細書に記載の抗GPC3抗体またはその部分のいずれかをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のかかるベクターを含む宿主細胞も提供する。例として、該宿主細胞は、CHO細胞、E. coli細胞、または酵母細胞であり得る。本明細書に記載のポリペプチドのいずれかを産生するプロセスをさらに提供し、該プロセスは、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養すること、及び該細胞培養から、該所望のポリペプチドを回収することを含む。1つの実施形態で

50

は、該ベクターは、配列番号 1 及び／または配列番号 3（表 2）を含む。

【0024】

1つの態様では、本発明は、GPC3に結合することが可能な、好ましくは、GPC3のベータ鎖に結合することが可能なキメラ抗原受容体を含むCAR修飾免疫細胞、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞を提供する。1つの態様では、本発明は、キメラ抗原受容体を含むCAR修飾免疫細胞、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞を提供し、該キメラ抗原受容体は、本開示の抗GPC3抗体の軽鎖可変領域、及び本開示の抗GPC3抗体の重鎖可変領域を含む。

【0025】

1つの態様では、本発明は、抗GPC3抗体を含むCAR修飾免疫細胞（複数可）、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞を提供する。1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、抗体断片である。1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、scFvである。1つの実施形態では、該修飾T細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞である。1つの実施形態では、該修飾T細胞は、 $\gamma\delta$ T細胞である。

10

【0026】

1つの態様では、本発明は、抗GPC3抗体及び医薬的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。1つの態様では、本発明は、本発明のCAR修飾免疫細胞、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞、及び医薬的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、抗体薬物複合体（ADC）の形態で使用される。

20

【0027】

1つの態様では、本発明は、抗GPC3抗体の作製方法を提供する。1つの態様では、本発明は、本明細書に開示するCAR修飾免疫細胞の作製方法を提供する。1つの実施形態では、本発明は、抗GPC3抗体を含むADCの作製方法を提供する。

【0028】

1つの態様では、本発明は、がんの治療用の薬剤の調製方法を提供する。実施形態では、本発明は、該抗GPC3抗体に応答する状態の治療に有用な薬剤の調製のための、本明細書に開示する抗GPC3抗体の使用を対象とする。

【0029】

1つの態様では、本発明は、疾患、例えば、がん、腫瘍及び／または細胞増殖性障害の治療的及び／または予防的処置のための薬剤の調製における本発明の核酸の使用を提供する。

30

【0030】

1つの態様では、本発明は、疾患、例えば、がん、腫瘍及び／または細胞増殖性障害の治療的及び／または予防的処置のための薬剤の調製における本発明の発現ベクターの使用を提供する。

【0031】

1つの態様では、本発明は、疾患、例えば、がん、腫瘍及び／または細胞増殖性障害の治療的及び／または予防的処置のための薬剤の調製における本発明の宿主細胞の使用を提供する。

40

【0032】

1つの態様では、本発明は、細胞毒性薬、例えば、化学療法剤、薬物、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはその断片）にコンジュゲートされた抗GPC3抗体、あるいは、放射性同位体にコンジュゲートされた抗GPC3抗体（すなわち、放射性複合体）を含むADCを提供する。別の態様では、本発明はさらに、該免疫複合体の使用方法を提供する。1つの態様では、免疫複合体は、細胞毒性薬または検出可能な薬剤に共有結合した上記抗GPC3抗体のいずれかを含む。

【0033】

1つの態様では、本発明は、その細胞表面でGPC3を発現する細胞の増殖または成長を阻害する方法を提供し、該方法は、該細胞を、本発明の抗GPC3抗体またはCAR修

50

飾免疫細胞、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞と接触させることを含む。1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、ADCの形態で使用される。実施形態では、該細胞の増殖または成長は、細胞増殖性障害を含む。実施形態では、該細胞増殖性障害は、がんである。

【0034】

1つの態様では、本発明は、GPC3を発現する細胞を含むがん性腫瘍を有する哺乳類を治療的に処置する方法を提供し、該方法は、該哺乳類に対して、治療有効量の本発明の抗体またはCAR修飾免疫細胞（複数可）、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞（複数可）を投与し、それによって、該哺乳類を効果的に治療することを含む。1つの実施形態では、該哺乳類は、ヒト対象である。1つの実施形態では、該がんは、肝臓癌、卵巣癌、肺癌、メルケル細胞癌、及び胃（gastricまたはstomach）癌からなる群から選択される。

【0035】

1つの態様では、本発明は、その細胞表面でGPC3を発現する細胞の死を誘発する方法を提供し、該方法は、該細胞を、本発明の抗GPC3抗体またはCAR修飾免疫細胞（複数可）、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞（複数可）と接触させることを含む。1つの実施形態では、該抗GPC3抗体は、ADCである。

【0036】

なおさらなる態様では、本発明は、本明細書に記載の抗GPC3抗体を含む組成物に関し、いくつかの実施形態では、担体と組み合わせて含む組成物に関する。任意に、該担体は、医薬的に許容される担体である。なおさらなる態様では、本発明は、本明細書に記載のCAR修飾免疫細胞、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞を、担体と組み合わせて含む組成物に関する。任意に、該担体は、医薬的に許容される担体である。

【0037】

同様に本明細書に提供するのは、キット及びそれを使用する方法である。

【0038】

参照による援用

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許、及び特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているものと程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0039】

実施形態を、添付の図面の図において、限定ではなく一例として例示する。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1A】204を使用して行ったバイオレイヤー干渉（biolayer interferometry）（BLI）結合アッセイの結果を示す。

【図1B】1G12を使用して行ったバイオレイヤー干渉（biolayer interferometry）（BLI）結合アッセイの結果を示す。

【図1C】GC33を使用して行ったバイオレイヤー干渉（biolayer interferometry）（BLI）結合アッセイの結果を示す。

【図2A】ウェスタンブロットによる、還元（R）及び非還元（NR）条件下での204（左のパネル）、GC33（中央のパネル）、及び1G12（右のパネル）による組み換えヒト（rh）GPC3の検出を示す。

【図2B】還元（R）及び非還元（NR）条件下で、rhGPC3、rhGPC5、及びrhGPC6をプローブするために使用した204及び1G12抗体のウェスタンブロットティングの結果を示す。

【図3】204によって検出された、可溶性天然ヒトGPC3のウェスタンブロット分析を示す。調べたサンプルは、腫瘍細胞株HepG2、NCI-H661、及びHep3Bの上清として得た。

【図4】主要なGPC3アイソフォーム（アイソフォーム2）のハイレベル概略図であり

10

20

30

40

50

、アルファ鎖、ベータ鎖、フューリン切断部位、G C 3 3 免疫原、1 G 1 2 免疫原、G C 3 3 エピトープ、及び可能性がある204 エピトープを示す。

【図5】A D A M 1 0 切断部位、及びG C 3 3 と比較した204 結合の領域を示す、別のG P C 3 のハイレベル概略図である。

【図6 A】r h G P C 3 のA D A M 1 0 及びA D A M 1 7 による切断を示すクーマシー染色ゲルを示す。およそ12 k D a の断片が、G P C 3 のA D A M 1 0 による切断によって遊離する。

【図6 B】A D A M 1 0 及びA D A M 1 7 によって切断されたG P C 3 の204 及びG C 3 3 でプローブしたウェスタンブロット分析を示す。図6 A に関して述べたおよそ12 k D a の断片は、G C 3 3 によって検出されるが204 によっては検出されず、204 に対するエピトープがフューリン切断部位と予測A D A M 1 0 部位との間にあることが示される。

【図7】本開示の204 抗体とともに使用するためのハイレベルの例示的な最適化免疫組織化学（I H C）法を示す。

【図8】204 抗体及び図7 の最適化プロトコルを使用したヒト肝細胞癌（H C C）由来の腫瘍マイクロアレイ（T M A）からの代表的な画像を示す。示されるように、半定量的な膜結合型のHスコアを用いて染色を評価した。

【図9】肺扁平上皮癌及びH C C において、図7 の最適化プロトコルを使用して、G P C 3 を検出するための204 または1 G 1 2 を使用したI H C 実験の代表的な画像を、対応する膜結合型のHスコアとともに示す。

【図10】図7 の最適化プロトコルを使用して、健康な肺及び肝臓組織をプローブするための204 または1 G 1 2 を使用したI H C 実験の代表的な画像を示す。

【図11】1 G 1 2（0.5 μ g / mL）または204（0.1 μ g / mL）抗体で染色し、二次抗体結合西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）の基質として3,3'-ジアミノベンジン（D A B）を介して可視化したH e p G 2（G P C 3^{h i}）及びP P 5（G P C 3^{l o}）腫瘍由来の組織のI H C 画像を示す。アイソタイプ対照も示す。ヒト肝細胞癌（H C C）細胞株H e p G 2（G P C 3^{h i}）及びP P 5（G P C 3^{l o}）を、N O D S C I D マウスに皮下移植し、P P 5 及びH e p G 2 の移植後、それぞれ、24日目及び31日目に腫瘍を採取した。

【図12】図11の画像に対応するI H C 染色を定量化する棒グラフを示す。定量したのは、H e p G 2 腫瘍、及び2つの異なるP P 5 腫瘍である。棒グラフの上のパネルは、膜結合型のHスコアを示し、棒グラフの下のパネルは、合計Hスコア（細胞質及び膜）を指す。

【図13】胃癌（腺癌）、肝臓癌（H C C）、肺癌（扁平上皮癌）、及び卵巣癌（明細胞癌）を含めた様々ながんに関するホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）腫瘍ブロック（上のグラフ）及び組織マイクロアレイ（T M A）からのF F P E 腫瘍コアに対するI H C 実験で204 及び1 G 1 2 を使用して得た膜結合型のHスコアの直接比較を示すプロットを示す。

【図14 A】I H C 用に204 m A b 及び1 G 1 2 m A b を使用した染色強度に基づいて、H C C 及びS C C L における膜結合型G P C 3 の出現率分布を示す。

【図14 B】I H C 用に204 m A b 及び1 G 1 2 m A b を使用した染色強度に基づいて、H C C における膜結合型G P C 3 の出現率分布を示す。

【図14 C】I H C 用に204 m A b 及び1 G 1 2 m A b を使用した染色強度に基づいて、S C C L における膜結合型G P C 3 の出現率分布を示す。

【図14 D】I H C 用に204 m A b 及び1 G 1 2 m A b を使用した膜結合型のHスコアに基づいて、H C C 及びS C C L における膜結合型G P C 3 の出現率分布を示す。

【図14 E】I H C 用に204 m A b 及び1 G 1 2 m A b を使用した膜結合型のHスコアに基づいて、H C C における膜結合型G P C 3 の出現率分布を示す。

【図14 F】I H C 用に204 m A b 及び1 G 1 2 m A b を使用した膜結合型のHスコアに基づいて、S C C L における膜結合型G P C 3 の出現率分布を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 5】 2 0 4 m A b を使用した異種移植腫瘍モデル由来の F F P E 組織における膜結合型 G P C 3 発現の画像を 1 G 1 2 m A b と比較して示す。異種移植術に使用した細胞株は、H e p 3 B、H e p G 2、H u h - 7、及び P L C / P R F / 5 を含む。各画像の挿入図（大きい方の正方形）は、示された領域（小さい方の正方形）のより高い解像度の画像に対応する。参照のために、各条件に対応する膜結合型の H スコアを示す。

【図 1 6 A】 膜結合型の H スコアに関して、図 1 5 の I H C 実験を定量化するグラフを示す。

【図 1 6 B】 中等度対高膜強度の % に関して、図 1 5 の I H C 実験を定量化するグラフを示す。

【図 1 7 A】 2 0 4 m A b を使用した I H C に基づいて測定した、異種移植マウスモデル由来の腫瘍のスコアリングを示す表である。

【図 1 7 B】 1 G 1 2 m A b を使用した I H C に基づいて測定した、異種移植マウスモデル由来の腫瘍のスコアリングを示す表である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 1 】

以下の詳細な説明では、その一部を形成する添付の図面を参照し、これらの図面は、実施され得る例示的な実施形態によって示される。他の実施形態を利用してもよいこと、及び構造的または論理的な変更を、その範囲から逸脱することなく行ってもよいことを理解されたい。したがって、以下の詳細な説明は、限定的な意味に解釈されるべきではない。

【 0 0 4 2 】

様々な操作が、複数の別々の操作として順に、実施形態を理解する上で有益であり得る方法で記載される場合があるが、しかしながら、説明の順序は、これらの操作が、順序に依存することを暗示するものと解釈されるべきではない。

【 0 0 4 3 】

該説明は、「実施形態 (e m b o d i m e n t) 」または「実施形態 (e m b o d i m e n t s) 」という用語を使用し得るが、これらは、各々、1 つ以上の同じまたは異なる実施形態を指し得る。さらに、実施形態に関して使用される「含む (c o m p r i s i n g) 」、「含む (i n c l u d i n g) 」、「有する」等の用語は同義であり、一般に「オープンな」用語を意図している（例えば、「含む (i n c l u d i n g) 」という用語は、「～を含むがそれに限定されない」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも～を有する」と解釈されるべきであり、「含む (i n c l u d e s) 」という用語は、「～を含むがそれに限定されない」と解釈されるべきである等）。

【 0 0 4 4 】

本明細書における任意の複数及び／または単数の用語の使用に関して、当業者には、文脈及び／または適用に適切であるように、複数から単数、及び／または単数から複数へと変換することができる。明確にするため、様々な単数／複数の配列が、本明細書では明示的に記載され得る。

【 0 0 4 5 】

本発明を説明する前に、本発明は、記載される特定の方法及び実験条件に限定されず、かかる方法及び条件が変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定するものとしては意図されないことも理解されたい。任意の実施形態または実施形態の特徴は、互いに組み合わせることができ、かかる組み合わせは、明示的に本発明の範囲内に包含される。

【 0 0 4 6 】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。

【 0 0 4 7 】

本発明の実施は、別段の指示がない限り、当業者が備えている技能の範囲内である分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の従来技術

10

20

30

40

50

を使用する。かかる技術は、文献、例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989)、“Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984)、“Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987)、“Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.)、“Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates)、“PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994)、“A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988)、“Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas et al., 2001)で十分に説明されている。

10

【0048】

当業者には、本発明の実施に使用され得る、本明細書に記載のものと同様または均等の多くの方法及び材料が認識されよう。実際、本発明は、記載される方法及び材料に決して限定されない。

【0049】

本明細書に記載のものと同様または均等の任意の方法及び材料が本発明の実施または試験に使用され得るが、好ましい方法及び材料をここに記載する。本明細書で言及されるすべての特許、出願及び非特許出版物は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

20

【0050】

I. 定義

本明細書を解釈する目的のために、以下の定義を適用するが、適当と認められる場合には、単数形で使用される用語はその複数形も含み、逆もまた同様である。記載されるいずれかの定義が、参照により本明細書に組み込まれるいずれかの文献と矛盾する場合には、以下に記載の定義が優先されるものとする。別段に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。

【0051】

測定可能な値、例えば、量、時間的な期間等を指す場合に本明細書で使用される、「約」は、指定された値から±20%または±10%、より好ましくは、±5%、さらにより好ましくは、±1%、さらにいっそう好ましくは、±0.1%の変動を包含することを意味する。かかる変動は、本開示の方法を行うために適切である。さらに、数値の範囲の列挙には、該範囲によって包含される任意の数値、及び／または該範囲内に含まれる任意の値の範囲が含まれる。例えば、1～10の数値範囲は、その範囲を包含し、さらに、個々の数値（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）及び該数値範囲内の範囲（例えば、1～2、1～4、2～5、3～7、4～9、5～10等）を包含する。

30

【0052】

本明細書で使用される、「接触させる」とは、少なくとも2つの物質を溶液または固相で一緒にすることを含む。

40

【0053】

本明細書で使用される、「グリピカン3 (GPC3)」は、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーによって細胞表面に結合されたヘパラン硫酸 (HS) プロテオグリカンのグリピカンファミリーのメンバーを指す (Filmus and Selleck, J Clin Invest 108: 497-501, 2001)。GPC3遺伝子は、約70kDのコアタンパク質をコードし、これは、フューリンによって切断され、N末端の40kDの断片及びC末端の30kDの断片が産生され得る。2つのHS鎖がGPC3のC末端部分に結合している。GPC3及び他のグリピカンファミリーのタンパク質は、細胞分裂及び細胞増殖調節において役割を果たす。GPC3は、HCC、ならびに黒

50

色腫、肺扁平上皮癌、及び卵巣の明細胞癌を含めたいくつかの他のヒトのがんで高度に発現される (Ho and Kim, Eur J Cancer 47 (3) : 333-338, 2011) が、正常組織では発現されない。GPC3は、SGB、DGSX、MXR7、SDYS、SGBS、OCI-5、SGBS1及びGTR2-2としても知られている。

【0054】

ヒトGPC3には4つの既知のアイソフォーム (アイソフォーム1~4) が存在する。GPC3のこれら4つのアイソフォームの核酸配列及びアミノ酸配列は既知であり、GenBankアクセッション番号: NM_001164617及びNP_001158089 (アイソフォーム1)、NM_004484及びNP_004475 (アイソフォーム2)、NM_001164618及びNP_001158090 (アイソフォーム3)、ならびにNM_001164619及びNP_001158091 (アイソフォーム4) を含む。本開示のいくつかの実施形態では、本明細書に開示する抗体は、4つのヒトGPC3アイソフォームのうちの1つ以上、またはその保存的バリエーションに結合する。

【0055】

本明細書で使用される、アミノ酸残基／位置の「修飾」は、出発アミノ酸配列と比較した、一次アミノ酸配列の変化を指し、該変化は、該アミノ酸残基／位置を含む配列変異に由来する。例えば、典型的な修飾としては、該残基 (または該位置) の別のアミノ酸による置換 (例えば、保存的または非保存的置換)、該残基／位置に隣接する1つ以上 (一般に5個または3個未満) のアミノ酸の挿入、及び該残基／位置の欠失が挙げられる。「アミノ酸置換」、またはその変形は、所定の (出発) アミノ酸配列に含まれる既存のアミノ酸残基を、異なるアミノ酸残基で置き換えることを指す。一般に及び好ましくは、該修飾は、出発 (または「野生型」) アミノ酸配列を含むポリペプチドと比較して、バリエーションポリペプチドの少なくとも1つの物理生化学的活性に変更をもたらす。例えば、抗体の場合、変更される物理生化学的活性は、標的分子に対する結合親和性、結合能力及び／または結合効果であり得る。

【0056】

本明細書で使用される、「Tリンパ球」または「T細胞」という用語は、CD3を発現する、または発現したことがある (CD3+) 及びT細胞受容体を発現する、または発現したことがある (TCR+) 免疫細胞を指す。T細胞は、細胞性免疫において中心的な役割を果たす。「CD3及びTCRを発現したことがある」T細胞とは、CD3及び／またはTCRの細胞表面発現を排除するように操作されている。

【0057】

本明細書で使用される、「TCR」または「T細胞受容体」という用語は、アルファベータもしくはガンマデルタ受容体またはそれらの組み合わせを形成する二量体異種細胞表面シグナル伝達タンパク質を指す。 $\alpha\beta$ TCRは、MHC分子により提示される抗原を認識するが、 $\gamma\delta$ TCRは、MHCの提示とは独立して抗原を認識することができる。

【0058】

「MHC」 (主要組織適合遺伝子複合体) という用語は、ヒトにおける細胞表面抗原提示タンパク質をコードする遺伝子のサブセットを指し、これらの遺伝子は、ヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子と呼ばれる。本明細書では、略語MHCまたはHLAは、同義で使用する。

【0059】

本明細書で使用される、「活性化」は、検出可能な細胞増殖を誘導するように十分に刺激されたT細胞の状態を指す。活性化は、誘導されたサイトカイン産生、及び検出可能なエフェクター機能と関連している可能性もある。「活性化T細胞」という用語は、中でも、細胞分裂を起こしているT細胞を指す。

【0060】

本明細書で使用される、「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然起源または組み換え起源由来のインタクトな免疫グロブリン

10

20

30

40

50

の場合もあれば、インタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分の場合もある。抗体は、通常、免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、中和抗体、完全長またはインタクトなモノクローナル抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多価抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多特異性抗体（例えば、所望の生物学的活性を示す二重特異性抗体）、ダイアボディ、所望の生物学的活性または免疫学的活性を示す単ドメイン抗体（sdAb）、Fv、Fab及びF(ab)、ならびに一本鎖抗体及びヒト化抗体を含めた様々な形態で存在し得る（Harlow et al, 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al, 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al, 1988, Proc. Nat Acad. Sci. U S A 85: 5879-5883; Bird et al, 1988, Science 242: 423-426）。

10

20

30

40

50

【0061】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の部分、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片、ダイアボディ、線状抗体（米国特許第5,641,870号、実施例2、Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995] 参照）、一本鎖抗体分子、ジスルフィド結合断片可変（dsFv）、及び抗体断片から形成される多特異性抗体が挙げられる。1つの実施形態では、抗体断片は、インタクトな抗体の抗原結合部位を含み、ひいては抗原に結合する能力を保持する。同様に抗体断片に含まれるのは、CAR-T細胞またはCAR-NK細胞のキメラ抗原受容体で、例えば、GPC3腫瘍エピトープに対する標的化アームとして使用され得る抗体の部分（及び抗体の部分の組み合わせ、例えば、scFv）である。かかる断片は、必ずしもタンパク質分解断片というわけではなく、むしろ標的に対する親和性を付与することができるポリペプチド配列の部分である。

【0062】

抗体のパパイン消化により、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片、及び容易に結晶化する能力を反映して表記される残余の「Fc」断片が産生される。該Fab断片は、L鎖全体に加えて、H鎖の可変領域ドメイン（VH）、ならびに1つの重鎖の第一の定常ドメイン（CHI）からなる。各Fab断片は、抗原結合に関しては一価である、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きいF(ab')₂断片が得られ、これは、概して、二価の抗原結合活性を有する2つのジスルフィド結合Fab断片に対応し、依然として抗原を架橋することができる。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含むCHIドメインのカルボキシ末端にさらなる数個の残基を有する点でFab断片とは異なる。Fab'-SHとは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有するFab'の本明細書における呼称である。F(ab')₂抗体断片は、元々、ヒンジシステインを間に有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも既知である。

【0063】

該Fc断片は、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、該Fc領域における配列によって決定され、この領域はまた、ある特定の細胞型に見られるFc受容体（FcR）によって認識される部分である。

【0064】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、非共有結合で緊密に会合した1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv（scFv）種では、1つの重鎖可変ドメイン及

び1つの軽鎖可変ドメインは、軽鎖及び重鎖が二本鎖Fv種における構造に類似した「二量体」構造で会合し得るように、柔軟性ペプチドリンカーによって共有結合され得る。これらの2つのドメインの折り畳みにより、抗原結合のためのアミノ酸残基を提供し、抗原結合特異性を抗体に与える、6つの超可変ループ（H鎖及びL鎖から各3つのループ）が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的なCDRを3つのみ含むFvの半分）でも、全結合部位よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識してそれに結合する能力を有する。

【0065】

「sFv」または「scFv」とも略される「一本鎖Fv」は、連結されて単一のポリペプチド鎖となったVH及びVL抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、該sFvポリペプチドはさらに、該VH及びVLドメイン間にポリペプチドリンカーを含んでおり、それにより、該sFvは、抗原結合に所望される構造を形成することができる。sFvに関する総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995、下記を参照されたい。1つの実施形態では、抗GPC3抗体由来のscFvは、本明細書に開示するCAR-T細胞またはCAR-NK細胞の標的化アームとして使用される。

【0066】

本明細書で使用される、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団、すなわち、該集団を構成する個々の抗体が、微量で存在し得る、可能性のある自然発生の突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を指す。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して高度に特異的である。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の抗体によって汚染されずに合成され得るという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本発明に有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製される場合もあれば、細菌、真核性動物または植物細胞における組み換えDNA法を使用して作製される場合もある（例えば、米国特許第4,816,567号参照）。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載の技術を使用して、ファージ抗体ライブラリから単離され得る。

【0067】

本明細書で使用される、「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、配列が超可変性である、及び／または構造的に定義されたループを形成する、抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つの超可変領域を含み、3つがVHにあり（HI、H2、H3）、3つがVLにある（LI、L2、L3）。いくつかの超可変領域の描写が本明細書で使用され、本明細書に包含される。Kabatの相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づいており、これが最も一般的に使用されている（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）。Chothiaは、代わりに、構造的ループの位置に言及するものである（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)）。Kabatのナンバリング規則を使用してナンバリングした場合、Chothia CDR-H1ループの末端は、該ループの長さに応じてH32とH34の間で異なる（これは、Kabatのナンバリングスキームが、H35A及びH

35Bで挿入を配するためであり、35Aも35Bも存在しない場合、該ループは、32で終わり、35Aのみが存在する場合、該ループは、33で終わり、35Aも35Bも存在する場合、該ループは、34で終わる)。AbMの超可変領域は、KabatのCDRとChothiaの構造的ループとの間の折衷を示し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されている。「contact」の超可変領域は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づくものである。これらの超可変領域の各々の残基を以下に示す。

ループ	Kabat	AbM	Chothia	Contact
LI	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
HI	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
(Kabatナンバリング)				
HI	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothiaナンバリング)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101
【0068】				

超可変領域は、次の「伸長超可変領域」を含み得る：VL中、24～36または24～34 (LI)、46～56または50～56 (L2) 及び89～97 (L3)、ならびに VH中、26～35B (H1)、50～65、47～65または49～65 (H2)、及び93～102、94～102または95～102 (H3)。該可変ドメイン残基は、これらの定義の各々に対して、Kabat et al. (上掲) に従ってナンバリングされている。

【0069】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書に定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0070】

「Kabatにおける可変ドメイン残基のナンバリング」または「Kabatにおけるアミノ酸位置のナンバリング」という用語、及びその変形は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) における抗体の編成の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに対して使用されるナンバリングシステムを指す。このナンバリングシステムを使用して、実際の線状アミノ酸配列は、該可変ドメインのFRまたはCDRの短縮またはそれへの挿入に相当するより少ないアミノ酸またはさらなるアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一のアミノ酸の挿入 (Kabatによる残基52a)、及び重鎖FR残基82の後に挿入された残基 (例えば、Kabatによる残基82a、82b、及び82c等) を含み得る。残基のKabatのナンバリングは、所与の抗体の配列の相同領域で、「標準的な」Kabatによってナンバリングされた配列とのアラインメントによって、該抗体について決定され得る。

【0071】

Kabatのナンバリングシステムは、一般に、可変ドメインの残基 (ほぼ軽鎖の残基1～107及び重鎖の残基1～113) に言及する際に使用される (例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。 「EUのナンバリングシステム」または「EUインデックス」は、一般に、免疫グロブリン重鎖定常領域の残基に言及する際に使用される (例えば、Kabat et al.

10

20

30

40

50

、上掲で報告されているE Uインデックス)。「K a b a tにおけるE Uインデックス」とは、ヒトI g G l E U抗体の残基のナンバリングを指す。本明細書で別途述べられない限り、抗体の変域ドメイン内の残基番号への言及は、K a b a tのナンバリングシステムによる残基のナンバリングを意味する。

【0072】

「ブロッキング」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害または低減するものである。好ましいブロッキング抗体またはアンタゴニスト抗体は、該抗原の生物学的活性を実質的または完全に阻害する。

【0073】

目的の抗原またはエピトープに「結合する」抗体は、非特異的相互作用とは測定可能に異なる十分な親和性で該抗原またはエピトープに結合するものである。特異的結合は、例えば、分子の結合を、対照分子の結合と比較して特定することによって測定することができ、該対照分子は、一般に、結合活性を有しない、同様の構造の分子である。

【0074】

腫瘍細胞の成長を阻害する抗体は、がん細胞の測定可能な成長阻害をもたらすものである。1つの実施形態では、抗G P C 3抗体は、G P C 3腫瘍エピトープを提示するがん細胞の成長を阻害することが可能である。好ましい成長阻害性抗G P C 3抗体は、適切な対照と比較して、G P C 3発現腫瘍細胞の成長を20%より大きく、好ましくは、約20%~約50%、さらにより好ましくは、50%より大きく(例えば、約50%~約100%)阻害し、該対照は、通常、試験される抗体で処理されていない(またはアイソタイプ対照で処理された)腫瘍細胞である。

【0075】

抗G P C 3抗体は、(i)それらが結合する細胞の成長もしくは増殖を阻害し得るか、(ii)それらが結合する細胞の死を誘発し得るか、(iii)それらが結合する細胞の離層を阻害し得るか、(iv)それらが結合する細胞の転移を阻害し得るか、または(v)それらが結合する細胞を含む腫瘍の血管新生を阻害し得る。

【0076】

「アンタゴニスト」という用語は、最も広義に使用され、抗原の生物学的活性を部分的または完全にブロック、阻害、または中和する任意の分子を含む。適切なアンタゴニスト分子としては、具体的には、アンタゴニスト抗体または抗体断片、天然G P C 3ポリペプチドの断片またはアミノ酸配列バリエーション、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機低分子等が挙げられる。G P C 3ポリペプチドのアンタゴニストを同定する方法は、G P C 3ポリペプチドを候補アンタゴニスト分子と接触させること、及び該G P C 3ポリペプチドに通常関連する1つ以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含み得る。

【0077】

「抗G P C 3抗体」、「G P C 3抗体」、及び「G P C 3に結合する抗体」という用語は、同義で使用される。抗G P C 3抗体は、好ましくは、該抗体が診断薬及び/または治療薬として有用であるように、十分な親和性でG P C 3に結合することが可能である。

【0078】

1つの実施形態では、抗G P C 3抗体は、本明細書では、(i)表2に示される配列番号2の重鎖可変ドメイン及び/または配列番号4の軽鎖可変ドメインを含むか、または(ii)表1に示されるC D Rのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つを含む抗G P C 3モノクローナル抗体を特異的に指すために使用される。

【0079】

「単離された抗体」は、その天然の環境の構成成分から同定ならびに分離及び/または回収されたものである。その天然の環境の夾雑成分は、該抗体の治療的使用を妨げる物質であり、これらには、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が含まれ得る。

【0080】

基本的な4鎖抗体単位は、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖で構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgGの場合、該4鎖単位は、通常、約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つのジスルフィド共有結合によってH鎖に連結されるが、2つのH鎖は、該H鎖のアイソタイプに応じて1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結される。各H鎖及びL鎖は、規則的な間隔を置いた鎖内ジスルフィド架橋も有する。各H鎖は、N末端に可変ドメイン(VH)を有し、α鎖及びγ鎖の各々にはこれに3つの定常ドメイン(CH)が続き、μ及びεアイソタイプの場合は4つのCHドメインが続く。各L鎖は、N末端に可変ドメイン(VL)を有し、その他端に定常ドメイン(CL)が続く。該VLは、VHと整列し、該CLは、重鎖の第一の定常ドメイン(CH1)と整列している。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。VHとVLが対合することにより、単一の抗原結合部位が形成される。異なるクラスの抗体の構造及び特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71及びChapter 6を参照されたい。

10

【0081】

任意の脊椎動物種に由来するL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に異なる型のうちの1つに割り当てられ得る。それらの重鎖の定常ドメイン(CH)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てられ得る。5つのクラスの免疫グロブリン：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、それぞれ、α、δ、ε、γ、及びμと表記される重鎖を有する。γ及びαクラスは、CH配列及び機能における比較的わずかな相違に基づいてさらにサブクラスに分類され、例えば、ヒトは、以下のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2を発現する。抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」とは、当該抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。該重鎖の可変ドメインは、「VH」または「VH」と呼ばれ得る。該軽鎖の可変ドメインは、「VL」または「1/4」と呼ばれ得る。これらのドメインは、一般に、抗体の最も可変性が高い部分であり、抗原結合部位を含む。

20

【0082】

「可変」という用語は、可変ドメインのある特定のセグメントが、抗体間で配列が大幅に異なるという事実を指す。該Vドメインは、抗原結合を媒介し、特定の抗体の、その特定の抗原に対する特異性を定義する。しかしながら、可変性は、110アミノ酸長の可変ドメイン全体に均一に分布しているわけではない。代わりに、該V領域は、各9~12アミノ酸長の「超可変領域」と呼ばれる極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15~30個のアミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变のストレッチからなる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々、3つの超可変領域によって接続された主にβシートコンフィギュレーションを採用する4つのFRを含み、これらの領域は、該βシート構造を接続し、場合によってはその一部を形成するループを形成する。各鎖中の超可変領域は、FRによって極めて近接して一緒に保持され、他方の鎖からの超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 参照)。

30

40

【0083】

「インタクトな」抗体は、抗原結合部位ならびにCL及び少なくとも重鎖定常ドメインであるCH1、CH2及びCH3を含むものである。該定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン)の場合もあれば、そのアミノ酸配列バリエーションの場合もある。好ましくは、該インタクトな抗体は、1つ以上のエフェクター機

50

能を有する。

【0084】

本明細書で使用される、「合成抗体」という用語は、組み換えDNA技術を使用して作製される抗体を意味する。また、該用語は、抗体をコードするDNA分子を合成することにより作製された当該抗体を意味すると解釈されるべきであり、そのDNA分子は、抗体タンパク質、または該抗体を規定するアミノ酸配列を発現し、該DNAまたはアミノ酸配列は、利用可能かつ当技術分野で周知の合成DNAまたはアミノ酸配列技術を使用して得られたものである。

【0085】

「キメラ抗体」は、1つの種、例えば、ヒトに由来するフレームワーク残基、及び別の種、例えば、GPC3に特異的に結合するマウス抗体に由来するCDR（これは、一般に抗原結合を付与する）を有する。

【0086】

「ヒト」抗体（「完全ヒト」抗体とも呼ばれる）は、ヒトフレームワーク領域及びヒト免疫グロブリン由来のCDRのすべてを含む抗体である。一例では、該フレームワーク及び該CDRは、同じ起源のヒト重鎖及び／または軽鎖アミノ酸配列に由来する。しかしながら、1つのヒト抗体由来のフレームワークが、異なるヒト抗体由来のCDRを含むように操作される場合もある。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域、及び非ヒト（例えば、マウス、ラット、または合成）免疫グロブリン由来の1つ以上のCDRを含む免疫グロブリンである。該CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンを「ドナー」と呼び、該フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンを「アクセプター」と呼ぶ。1つの実施形態では、ヒト化免疫グロブリンにおいて、該CDRのすべてが、該ドナー免疫グロブリン由来である。定常領域は、存在する必要はないが、それらが存在する場合、それらはヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、例えば、約95%以上同一でなければならない。したがって、ヒト化免疫グロブリンの全部分は、場合により該CDRを除いて、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖及びヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンまたは抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから取り出されたアミノ酸による限られた数の置換を有し得る。ヒト化または他のモノクローナル抗体は、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさないさらなる保存的アミノ酸置換を有し得る。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作によって構築され得る（例えば、米国特許第5,585,089号参照）。

【0087】

抗体、Ig、抗体結合断片の抗原または他の分子（例えば、糖）のいずれかへの結合の文脈における「結合」という用語は、通常、最低2つの実体、または分子構造の間の相互作用または会合、例えば、抗体抗原相互作用を指す。

【0088】

「保存的」アミノ酸置換は、GPC3に対する抗体等のタンパク質の親和性に実質的に影響を及ぼさないか、または親和性を減少させない置換である。例えば、GPC3に特異的に結合するモノクローナル抗体は、多くとも約1、多くとも約2、多くとも約5、多くとも約10、または多くとも約15の保存的置換を含み得るとともに、GPC3ポリペプチドに特異的に結合し得る。「保存的バリエーション」という用語も同様に、抗体がGPC3に特異的に結合するという条件で、未置換親アミノ酸の代わりに置換アミノ酸を使用することを含む。非保存的置換は、GPC3に対する活性または結合を低減する置換である。

【0089】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換の表は、当業者には周知である。以下の6つの群は、互いに保存的置換であると見なされるアミノ酸の例である：

- 1) アラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）、
- 2) アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、

- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)、
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、及び
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

【0090】

本明細書で使用される、「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答は、抗体産生、もしくは特定の免疫適格細胞の活性化のいずれか、またはその両方を含み得る。当業者には、タンパク質またはペプチドを含めた任意の高分子が抗原として機能し得ることが理解されよう。さらに、抗原は組み換えまたはゲノムDNAに由来し得る。当業者には、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、それ故、本明細書で使用されるその用語「抗原」をコードすることが理解されよう。さらに、当業者には、抗原が、遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要がないことが理解されよう。本発明が、複数の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むがこれに限定されないこと、及びこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するための様々な組み合わせで配置されることは、容易に分かる。さらに、当業者には、抗原が、「遺伝子」によってコードされる必要が全くないことが理解されよう。抗原は、生成される場合もあれば、合成される場合もあり、生体サンプルから得られる場合もあることは、容易に分かる。かかる生体サンプルとしては、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞、または生体液を挙げることができるがこれらに限定されない。

10

20

【0091】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリンまたはT細胞受容体への特異的結合が可能な任意のタンパク質決定基、脂質または炭水化物決定基（例えば、特定の抗原結合部位）が含まれる。エピトープ決定基は、通常、分子の活性な表面分類、例えば、アミノ酸、脂質または糖側鎖からなり、通常、特定の3次元構造特性、及び特定の電荷特性を有する。平衡解離定数 (K_d) が、 $10^{-6} \sim 10^{-12}$ の範囲にある場合、抗体は抗原に特異的に結合すると言われる。単一の抗原が、2つ以上のエピトープを有する場合もある。したがって、異なる抗体が、抗原の異なる領域に結合する場合もあり、異なる生物学的効果を有する場合もある。エピトープは、コンフォメーションまたは線状のいずれかであり得る。コンフォメーションエピトープは、線状ポリペプチド鎖の異なるセグメントに由来する空間的に並置されたアミノ酸によって生じる。線状エピトープは、ポリペプチド鎖の隣接するアミノ酸残基によって生じるものである。

30

【0092】

本明細書で使用される、「キメラ抗原受容体 (CAR)」という用語は、例えば、人工T細胞受容体、T-ボディ、一本鎖免疫受容体、キメラT細胞受容体、またはキメラ免疫受容体を指す場合があり、また、特定の免疫エフェクター細胞に人工的な特異性をグラフトする、操作された受容体を包含する。CARは、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に付与するために使用される場合があり、それにより、例えば、養子細胞療法で使用するための多数の特異的T細胞を生成することを可能にし、特定の実施形態では、例えば、CARは、該細胞の特異性を腫瘍関連抗原に向ける。いくつかの実施形態では、CARは、細胞内活性化ドメイン (T細胞を、標的化部分が標的腫瘍細胞等の標的細胞と結合する際に活性化させる)、膜貫通ドメイン、及び長さが変化し得るとともに、疾患または障害に関連する、例えば、腫瘍-抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む。特定の態様では、CARは、CD3-ゼータの膜貫通ドメイン及びエンドドメインに融合した、モノクローナル抗体由来の一本鎖可変断片 (scFv) の融合を含む。他のCARデザインの特異性は、受容体のリガンド (例えば、ペプチド) またはパターン認識受容体、例えば、デクチンに由来し得る。ある特定の場において、活性化誘導細胞死を減少させるように該抗原認識ドメインの間隔を修正することができる。ある特定の場において、CARは、さらなる共刺激シグナル伝達のためのドメイン、例えば、CD3C、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10/12及び/またはOX40、4-1BB、1COS、T

40

50

L R（例えば、T L R 2）等を含む。場合によっては、分子は、共刺激分子を含めた C A R、イメージング（例えば、陽電子放出断層撮影）用のレポーター遺伝子、プロドラッグの添加時に T 細胞を条件付きで除去する遺伝子産物、ホーミング受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体とともに共発現され得る。さらに、当業者には、共刺激ドメインが、遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要がないことが理解されよう。本発明が、複数の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むがこれに限定されないこと、及びこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するための様々な組み合わせで配置されることは、容易に分かる。

【0093】

「免疫複合体」または「抗体薬物複合体」（ADC）という用語は、エフェクター分子の抗体またはその機能的断片への共有結合を指す。該エフェクター分子は、検出可能な標識でも免疫毒素でもよい。具体的な非限定的な毒素の例としては、アブリン、リシン、Pseudomonas 外毒素（PE、例えば、PE35、PE37、PE38、及び PE40）、ジフテリア毒素（DT）、ボツリヌス毒素、もしくはその修飾毒素、または直接もしくは間接的に細胞の成長を阻害するもしくは細胞を殺傷する他の毒物が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、PE 及び DT は、通常、肝毒性を介して死を引き起こす非常に毒性の高い化合物である。PE 及び DT は、しかしながら、該毒素の天然の標的化成分（PE のドメイン Ia 及び DT の B 鎖等）を除去し、それを異なる標的化部分、例えば、抗体で置き換えることによって、免疫毒素として使用するための形態に修正され得る。

10

20

【0094】

本明細書で使用される、「抗腫瘍効果」という用語は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の延長、またはがん状態に関連する様々な生理的症状の改善により明らかになり得る生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」はまた、第一に、腫瘍の発生を予防する本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞及び抗体の能力によって明らかにされ得る。

【0095】

「治療有効量」という用語は、研究者、獣医、医師または他の臨床医が求める、組織、系、または対象での生物学的または医学的反応を引き出す化合物の量を指す。「治療有効量」という用語には、投与された場合に、治療中の障害または疾患（例えば、固形がん）の 1 つ以上の兆候または症状の発症を予防するため、またはそれをある程度緩和するために十分な組成物の量が含まれる。治療有効量は、組成物、疾患及びその重症度、ならびに治療を受ける対象の年齢、体重等に応じて変化し得る。

30

【0096】

本明細書で使用される、疾患を「治療する」という用語は、対象が経験する疾患または障害の少なくとも 1 つの兆候または症状の頻度または重症度を減少させることを意味する。

【0097】

1 つ以上のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与には、同時（併用）及び任意の順序での連続投与が含まれる。

40

【0098】

本明細書で使用される、「医薬的に許容される」という用語は、当該化合物の生物学的活性または特性を無効にしない、比較的無毒な、塩、担体または希釈剤が挙げられるがこれらに限定されない物質を指す。すなわち、該物質は、望ましくない生物学的効果を引き起こすことも、それが含まれる組成物の任意の成分と有害に相互作用することもなく、個体に投与され得る。

【0099】

「コードすること」とは、特定のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列、例えば、遺伝子、cDNA、または inRNA 配列が、生物学的プロセスにおける規定のヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNA 及び mRNA）の配列または規定のアミノ酸の配列のい

50

ずれか及びそれから生じる生物学的特性を有する他のポリマー及び高分子の合成のための鑄型として機能する固有の特性を指す。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応する mRNA の転写及び翻訳が、細胞または他の生体系においてタンパク質を産生する場合、該タンパク質をコードする。コード鎖、すなわち、mRNA 配列と同一であり、通常は配列表に提供されるヌクレオチド配列、及び遺伝子または cDNA の転写のための鑄型として使用される非コード鎖の両方が、タンパク質またはその遺伝子もしくは cDNA の他の産物をコードすると言うことができる。

【0100】

「単離された」とは、天然の状態から変更または除去されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然の状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態（例えば、本開示のモノクローナル抗体）で存在する場合もあれば、非天然環境、例えば、宿主細胞に存在する場合もある。

【0101】

特に明記しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」には、互いに縮重した型であり、同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列が含まれる。タンパク質及び RNA をコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含み得る。

【0102】

「患者」、「対象」、「個体」等の用語は、本明細書では同義で使用され、本明細書に記載の方法に適した任意の動物を指す。ある特定の非限定的な実施形態では、該患者、対象または個体は、ヒトである。

【0103】

抗体に関して本明細書で使用される、「特異的に結合する」または「特異的に認識する」という用語は、サンプルに含まれる特定の抗原を認識するが、他の分子を実質的に認識も結合もしない抗体を意味する。例えば、1つの種に由来する抗原に特異的に結合する抗体は、1つ以上の種に由来するその抗原にも結合し得る。しかし、かかる異種間の反応性は、それ自体が抗体の分類を特異的であるとして変更するものではない。別の例では、抗原に特異的に結合する抗体は、該抗原の様々な対立形質とも結合し得る。しかしながら、かかる交差反応性は、それ自体が抗体の分類を特異的であるとして変更するものではない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合すること」という用語は、抗体、タンパク質、またはペプチドと第二の化学種との相互作用に関して使用することができ、該相互作用が、該化学種の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存すること、例えば、抗体が、一般にタンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識し、これに結合することを意味する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、エピトープ A（すなわち、遊離の標識されていない A）を含む分子の存在により、標識した「A」及び該抗体を含む反応において、該抗体に結合される標識された A の量は減少する。

【0104】

いくつかの実施形態では、特異的結合は、少なくとも約 1×10^{-8} M 以下の平衡解離定数を特徴とし得る（例えば、値が小さいほど強い結合を示す）。2つの分子が特異的に結合するかどうかを判断する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴等を含む。

【0105】

本明細書で使用される、「 K_D 」(M)という用語は、特定の結合タンパク質ーリガンド相互作用の解離平衡定数を指す。例えば、 K_D は、抗体、Ig、または抗体結合断片と抗原との間の解離平衡定数を指す場合もある。 K_D と結合親和性の間には逆相関があるため、 K_D 値が小さいほど、親和性が高い、すなわち、強い。したがって、「より高い親和性」または「より強い親和性」という用語は、相互作用を生じる能力がより高いこと、ひいてはより小さい K_D 値に関し、反対に、「より低い親和性」または「より弱い親和性」

10

20

30

40

50

という用語は、相互作用を生じる能力がより低いこと、ひいてはより大きい K_D 値に関する。解離平衡定数 K_D は、 $1/K$ に等しい。

【0106】

本明細書で使用される、「 k_a 」($M^{-1} \times \text{秒}^{-1}$)は、特定のタンパク質-抗原（例えば、抗体-抗原）相互作用の会合速度定数を指す。

【0107】

本明細書で使用される、「 k_d 」(秒^{-1})は、特定のタンパク質-抗原相互作用（例えば、抗体-抗原）の解離速度定数を指す。

【0108】

「がん」及び「がん性」という用語は、通常、制御されない細胞成長を特徴とする哺乳類における生理学的状態を指すか、または表す。「腫瘍」は、1つ以上のがん性細胞を含む。がんの例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病またはリンパ系悪性疾患が挙げられるがこれらに限定されない。かかるがんのより具体的な例としては、扁平上皮細胞癌（例えば、上皮性扁平上皮細胞癌）、皮膚癌、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌（「NSCLC」、肺の腺癌、及び肺扁平上皮癌を含めた肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化管癌を含めた胃（gastricまたはstomach）癌、膵臓癌（例えば、膵管腺癌）、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌（例えば、高悪性度卵巣癌、卵巣明細胞癌）、肝臓癌（例えば、肝細胞癌（HCC））、膀胱癌（例えば、尿路上皮膀胱癌）、精巣（胚細胞腫瘍）癌、肝癌（hepatoma）、乳癌、脳癌（例えば、星状細胞腫）、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓（kidneyまたはrenal）癌（例えば、腎細胞癌、腎芽細胞腫またはウィルムス腫瘍）、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌（hepatic carcinoma）、肛門癌、陰茎癌、及び頭頸部癌が挙げられる。さらなるがんの例としては、網膜芽細胞腫、卵胞膜細胞腫、男性化腫瘍、肝癌（hepatoma）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、多発性骨髄腫及び急性血液悪性腫瘍を含めた血液悪性腫瘍、子宮内膜または子宮癌、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、唾液腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、食道癌、肝癌（hepatic carcinoma）、肛門癌、陰茎癌、鼻咽頭癌、喉頭癌、カボジ肉腫、黒色腫、皮膚癌、神経鞘腫、乏突起膠腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、平滑筋肉腫、ならびに尿路癌が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

【0109】

好ましい実施形態では、該がんは、肝臓癌（例えば、HCC）である。別の好ましい実施形態では、該がんは、胃（gastricまたはstomach）癌（例えば、腺癌）である。別の好ましい実施形態では、該がんは、肺癌（例えば、扁平上皮癌）である。別の好ましい実施形態では、該がんは、卵巣癌（例えば、卵巣明細胞癌）である。「転移性がん」という用語は、原発組織のがん細胞が、発生部位から体内の1つ以上の他の部位に、血管またはリンパ管によって伝達され、原発組織以外の1つ以上の臓器に1つ以上の二次腫瘍を生じるがんの状態を意味する。顕著な例は、転移性乳癌である。

30

【0110】

本明細書で使用される、「GPC3関連がん」は、GPC3遺伝子または遺伝子産物の過剰発現と関連する、及び／またはGPC3腫瘍エピトープの提示と関連するがんである。適切な対照細胞は、例えば、がん罹患していない個体に由来する細胞、またはがんを有する対象に由来する非がん性細胞であり得る。

40

【0111】

本方法は、がんを有する対象を治療する方法を含む。特に、GPC3の発現に関連するがん。本方法はまた、ある特定の細胞行動、特に、がん細胞行動、特に、がん細胞のGPC3をそれらの細胞表面で調節するための方法も含む。

【0112】

「細胞増殖性障害」及び「増殖性障害」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖に関連付けられる障害を指す。1つの実施形態では、該細胞増殖性障害は、がんである。

【0113】

50

本明細書で使用される、「腫瘍」は、悪性か良性にかかわらず、すべての新生細胞の成長及び増殖、ならびにすべての前がん状態及びがん性細胞ならびに組織を指す。

【0114】

本明細書で使用される、「予測」及び「予想」という用語もまた同義である。ある意味では、予測または予想の方法は、本発明の予測／予想法を実施する者に、抗がん剤、好ましくは、本発明の抗GPC3抗体またはCAR-TもしくはCAR-NK細胞での治療に反応する可能性が高いと見なされる患者を選択させる（通常は治療の前であるが、必ずしもではない）ためである。

【0115】

本明細書で言及される「固形腫瘍」は、少なくとも約10または少なくとも約100個の腫瘍細胞の腫瘍塊を含む腫瘍である。該固形腫瘍は、軟部組織腫瘍、原発性固形腫瘍、または転移性病変であり得る。本開示に関連する固形腫瘍の例としては、例えば、様々な臓器系の肉腫、腺癌及び癌腫、例えば、肝臓、肺、胃腸（例えば、結腸）、尿生殖路（例えば、直腸、尿路上皮細胞）等に影響を与えるものが挙げられるがこれらに限定されない。腺癌としては、ほとんどの結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌及び食道癌等の悪性腫瘍が挙げられる。前述のがんの転移性病変も、本発明の方法及び組成物を用いて治療または予防され得る。

【0116】

いくつかの実施形態では、該固形腫瘍細胞は、グリピカン3（GPC3）を発現または過剰発現する。いくつかの実施形態では、該固形腫瘍細胞は、本明細書に記載の（例えば、204モノクローナル抗体）及び／またはU.S. 7, 919, 086、WO 2014/180306、WO 2018/019772、WO 2016/049459、WO 2003/000883、WO 2006/046751、WO 2007/047291、WO 2016/086813、WO 2016/047722、WO 2016/036973、WO 2020/072546、Cancer Res. 2008; 68:9832-9838; Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 19; 110(12):E1083-1に記載の抗GPC3抗体、T細胞受容体、またはキメラ抗原受容体によって特異的に結合されるGPC3のエピトープを発現または過剰発現する。これらの各々の内容は、参照により全体として、及びすべての目的のため、及び特に、該結合ドメイン、抗体、抗体断片、相補性決定領域、該相補性決定領域を含むポリペプチド、該相補性決定領域をコードする核酸、及びエピトープの特異性、ならびに本明細書に記載のエピトープ特異性を決定するためのアッセイに関して、組み込まれる。いくつかの実施形態では、該固形腫瘍細胞は、抗GPC3抗体であるGC33、または1G12、または204によって特異的に結合されるGPC3のエピトープを発現または過剰発現する。いくつかの実施形態では、該固形腫瘍は、GPC3断片を含むHLA：ペプチド複合体を発現または過剰発現する。いくつかの実施形態では、該HLAは、クラスI HLA、例えば、HLA-A2である。

【0117】

II. 本発明の組成物及び方法

A. 抗GPC3抗体の概要

1つの態様では、本発明は、抗GPC3抗体を、その断片、それを含む組成物、及びがんの治療を含めた様々な目的のためにそれを使用する方法を含めて提供する。1つの態様では、本発明は、細胞（例えば、腫瘍細胞）の表面で発現されるGPC3のベータ鎖に結合する抗体を提供する。任意に、該抗体は、モノクローナル抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びscFv断片を含めた抗体断片、ダイアボディ、単ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、または抗GPC3抗体のそのそれぞれの抗原エピトープへの結合を競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、任意に、CHO細胞もしくは細菌細胞において、または他の手段によって産生され得る。検出の目的で、本発明の抗GPC3抗体は、検出可能に標識される場合も、固体支持体に結合される場合等もある。

【0118】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、以下を含む重鎖可変領域を含む：

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFT EYAMHWVKQSHGKSL EWIGGINPNNGVTTYNQRFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDS AVYYCARGLLWYAYWGQGT LVTVSA（配列番号2）

【0119】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、以下を含む軽鎖可変領域を含む：

DIKMTQSPSSMYASLG ERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFS GSGSGQDYSLTIS SLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK（配列番号4）。

【0120】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号2を含む重鎖可変領域及び配列番号4を含む軽鎖可変領域を含む。

【0121】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、EYAMH（配列番号6）として記載のアミノ酸配列含むCDR1を含む重鎖可変領域を含む。

【0122】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、GINPNNGVTTYNQRFKG（配列番号8）として記載のアミノ酸配列含むCDR2を含む重鎖可変領域を含む。

【0123】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、GLLWYAY（配列番号10）として記載のアミノ酸配列含むCDR3を含む重鎖可変領域を含む。

【0124】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、KASQDINSYLS（配列番号13）として記載のアミノ酸配列含むCDR1を含む軽鎖可変領域を含む。

【0125】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、RANRLVD（配列番号15）として記載のアミノ酸配列含むCDR2を含む軽鎖可変領域を含む。

【0126】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、LQYDEFPLT（配列番号17）として記載のアミノ酸配列含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0127】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号6として記載のCDR1、配列番号8として記載のCDR2、及び配列番号10として記載のCDR3を含む重鎖可変領域を含む。

【0128】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号13として記載のCDR1、配列番号15として記載のCDR2、及び配列番号17として記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0129】

1つの態様では、GPC3に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号6として記載のCDR1、配列番号8として記載のCDR2、及び配列番号10として記載のCDR3を含む重鎖可変領域を含み、さらに、配列番号13として記載のCDR1、配列番号15として記載のCDR2、及び配列番号17として記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。1つの実施形態では、これらの配列を（本明細書に記載の組み合わせで）含む本発明の抗体は、ヒト化またはヒト抗体である。

10

20

30

40

50

【0130】

1つの態様では、本発明は、(i) 配列番号2を含む重鎖可変領域、及び／または(i) 配列番号4を含む軽鎖可変領域を含む抗GPC3抗体を含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、これらの抗体はさらに、ヒト下位群III重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の1つの実施形態では、これらの抗体はさらに、ヒトκ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

【0132】

1つの態様では、抗GPC3抗体は、腫瘍によって提示されるGPC3（例えば、HCC細胞で提示される）への結合をめぐって、配列番号2を含む重鎖可変領域及び配列番号4を含む軽鎖可変領域を含む抗GPC3抗体と競合する。

【0133】

本開示に包含される抗GPC3抗体のより包括的な説明を以下に示す。

【0134】

B. 検出方法

本発明の実施形態は、GPC3ポリペプチドを含む疑いがあるサンプルにおけるGPC3ポリペプチドの存在を特定する方法を対象とし、該方法は、該GPC3ポリペプチドに結合する抗体に該サンプルを曝露すること、及び該サンプルにおけるGPC3ポリペプチドへの該抗体の結合を特定することを含み、かかる結合の存在は、該サンプルにおけるGPC3ポリペプチドの存在を示す。任意に、該サンプルは、該GPC3ポリペプチドを発現する疑いがある細胞（がん細胞であり得る）を含み得る。該方法で使用する抗体は、任意に、検出可能に標識される場合もあれば、固体支持体に結合される場合等もある。

【0135】

該抗グリピカン3抗体のグリピカン3への結合は、好ましくは、本明細書に開示する免疫組織化学(IHC)法によって検出することができるが、該結合は、IHC法に限定されず、当業者に一般に知られる方法を含むことができることが理解され得る。例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定）、免疫蛍光、ウェスタンブロッティング等が使用され得る。関連する方法は、一般的なテキストである「Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988」に記載されている。

【0136】

例示的なIHCアッセイ

本明細書で論じる通り、腫瘍細胞の表面のGPC3レベルを正確に評価することが可能な診断方法に関する必要性が存在する。これは、少なくとも、ある特定の免疫療法（例えば、CAR-T療法）が、腫瘍細胞で発現される細胞表面GPC3と、対応する抗GPC3抗体または抗原結合断片との間の相互作用に依存するためである。この点で、他の従来技術の抗体の使用を超える利点を示す抗GPC3モノクローナル抗体に依存するインビトロIHC法を本明細書に開示する。具体的には、本明細書に開示するIHC法は、該アッセイがいくつかの有利な基準を示すことを必要とすることによって遂げられた。第一に、本開示のIHC IVDアッセイを、非特異的バックグラウンドの実質的な欠如を示すように制約した。IHC IVDとの関連での非特異的バックグラウンドは、組織サンプルの染色の分析及びスコアリングを複雑にする可能性があり、ひいては検出された標的（例えば、本開示との関連での膜結合型GPC3）の出現率（またはその欠如）の不正確な評価につながり得る。したがって、本明細書に開示する通り、及び実施例に例示する通り、本開示のIHC IVDアッセイは、非特異的バックグラウンドシグナルの実質的な欠如を示す。第二に、該アッセイを、該細胞表面で明瞭な境界線を示すように制約した。これは、有利には、該膜結合型GPC3染色の信頼性の高いスコアリングを可能にする。第三に、該アッセイを、鮮明で明らかな核の対比染色を示すように制約した。第四に、該アッ

セイを、該アッセイが上述した基準を満たすこと可能にする一方、高精度、感度、及び特異性、ならびに本明細書に開示及び例示するGPC3に対する低ナノモル親和性も示す抗体（本明細書に記載の204）に依存するように制約した。

【0137】

a. 組織調製物

本明細書で使用される、「組織調製物」という用語は、個体、体液（例えば、血液、血清、血漿、脊髄液）、組織培養物、組織切片等から得られる生物学的調製物を指す。好ましくは、該組織調製物は、対象由来の調製物、例えば、当該対象の腫瘍から得られる組織である。当技術分野で既知の方法である生検が、好ましくは、該組織を収集する方法として使用される。例では、該組織調製物は、肝臓組織、または肺組織、または胃組織、または卵巣組織であるが、しかしながら、GPC-3を発現する腫瘍細胞（複数可）を有する任意の組織を含めた他の組織源も本開示の範囲内である。例示的な説明として、生検は、対象の肝臓に、皮膚表面から細長い針を直接挿入することによって肝臓組織を収集するために使用され得る。該穿刺部位は、右胸下部の肋骨間でよいが、他の部位も本開示の範囲内である。該手順は、該穿刺部位の安全性を、例えば、超音波検査装置に依存して確認することを含み、その後、該穿刺部位を消毒し、皮膚から肝臓表面の領域を麻酔し、最後に該穿刺部位で皮膚を小切開した後、穿刺針を使用して穿刺することを含む。特に記載していないが、同様の生検方法を使用して、他の身体位置（例えば、肺、胃腸系、卵巣等）から組織を収集してもよく、かかる方法は、当業者には容易に理解されよう。

【0138】

本開示の組織調製物は、顕微鏡下透過光で観察されるため、該顕微鏡に使用される光の該調製物への十分な透過を容易にするために、薄片に切断される。薄片に切断する前に、該組織調製物を固定する。簡潔には、固定するべき組織調製物を、切断ツール（例えば、メス）を使用して、パラフィン包埋切片を調製するのに適したサイズ及び形状を有する断片に切断する。続いて、該断片を、固定を行うために使用される試薬である固定剤に浸漬する。使用される固定剤は、好ましくは、ホルマリンであり、より好ましくは、中性緩衝ホルマリンである。該中性緩衝ホルマリンの濃度は、該組織調製物の特性または物理的特性に応じて適切に選択される。該濃度は、使用のために、1～50%、好ましくは、5～25%、より好ましくは、10～15%の間で適切に変化させることができる。該組織調製物をその中に浸漬した固定剤は、真空ポンプを使用して適切に脱気される。該固定は、該組織調製物を該固定剤中に常圧及び室温を備えた条件下で数時間放置することによって行われる。該固定に要する時間は、1時間～7日間、好ましくは、2時間～3日間、より好ましくは、3時間～24時間、さらにより好ましくは、4時間～16時間の範囲内で適宜選択され得る。このようにして固定した調製物をさらに、リン酸緩衝液等に数時間浸漬する（この時間は、2時間～48時間、好ましくは、3時間～24時間、より好ましくは、4時間～16時間の範囲内で適宜選択され得る）。

【0139】

次に、該固定した組織調製物から、好ましくは、凍結切片法またはパラフィン切片法を使用して、切片が調製され得る。凍結切片法の好ましい例は、該組織を、O.C.T.化合物（Miles, Inc.）に添加することによって凍結させること、及びクリオスタット（凍結切片調製装置）を使用して該凍結組織を薄片に切断することを含む方法を含む。パラフィン切片法では、該固定した組織調製物を包埋剤に浸漬し、次いで、それを凝固させることにより、該切片に均一かつ適切な硬度を付与する。パラフィンが、該包埋剤として好ましくは使用され得る。該固定した組織調製物を、エタノール、またはエタノール洗浄液及びキシレン洗浄液の組み合わせを使用して脱水する。1つの例では、該組織調製物を、70%エタノール、80%エタノール、及び100%エタノールに順次浸漬することによって脱水する。該浸漬に要する時間及び浸漬回数は、1分～1時間～数日及び1回～3回の範囲内で適宜選択され得る。さらに、該浸漬は、室温で行われる場合もあれば、4℃で行われる場合もある。4℃での浸漬の場合、より長い浸漬時間（例えば、終夜）が好ましい。別の例では、組織調製物を、95% EtOH、100% EtOHに順次浸漬す

ることによって脱水する。この場合もやはり、各浸漬手順に要する時間及び浸漬回数は、1分～1時間～数日及び1回～3回の範囲内で適宜選択され得る。次に、液相をキシレンに置換した後、該組織調製物をパラフィンに包埋する。キシレンによる液相の置換に要する時間は、数分～数時間の範囲内で適宜選択され得る。この手順では、該置換は、室温で行われる場合も4℃で行われる場合もある。4℃での置換の場合、より長い置換時間（例えば、終夜）が好ましい。該パラフィン包埋に要する時間及びその回数は、1時間～数時間及び1回～4回の範囲内で適宜選択され得る。この手順では、該包埋は、室温で行われる場合も4℃で行われる場合もある。4℃での包埋の場合、より長い包埋時間（例えば、終夜）が好ましい。さらに、該組織調製物は、好ましくは、パラフィン包埋反応を自動的に処理するパラフィン包埋装置（例えば、EG1160、Leica Microsystems）の使用によって、パラフィン包埋され得る。

10

【0140】

このようにパラフィン包埋された組織調製物を、足場に接着して「ブロック」を調製し、これをその後マイクロトームを使用して、1～20 μm の厚さから選択される所望の厚さの薄片に切断する。このように切断された薄組織切片を、接着用の透明支持体としてのスライドガラスに静置する。この場合、該組織切片の剥離を防止するために0.01%ポリ－L－リジン（Sigma-Aldrich Co.）をコーティングして乾燥させたスライドガラスが、好ましくは使用され得る。接着させた組織切片を、空气中で数分～1時間から選択される適切な時間乾燥させる。

【0141】

いくつかのさらなるまたは代替的な例では、本開示は、組織マイクロアレイ（TMA）の使用を採用する。例では、TMAは、中空針を使用して、パラフィンブロック（ドナーブロック、FFPE組織）から組織のコア（例えば、管状切片）を抜き取ること、及びこのコアを、単一のパラフィンブロック（例えば、レシピエントブロック）の所定の位置に移すことによって構築される。TMAは、半自動プラットフォーム上で、構築された1つのスライド内で、対照サンプルと試験サンプル（例えば、陽性対照、陰性対照、様々な組織領域または型からの試験サンプル）とを比較するために使用され得る。例として、個々のアレイは、0.6 mm径の360個のコア、または1 mm径の187個のコア、または2 mm径の60個のコア等で構築され得る。かかる例は、説明であること及び非限定的であることを意図する。

20

【0142】

b. 抗原回復

本発明の例示的な方法では、ホルマリン固定によって反応性が低下した抗原の反応性を回復する。1つの例では、プロテアーゼ誘導エピトープ回復法（PIER法）が使用され得る。簡潔には、該方法は、免疫染色の前にプロテアーゼ（例えば、トリプシン、ペプシン等）で切片を消化することを含む。プロテアーゼ誘導エピトープ回復法に使用されるプロテアーゼは、そのタイプまたは起源が特に限定されず、一般に入手可能なプロテアーゼが使用のために適宜選択され得る。好ましいプロテアーゼの例としては、濃度0.05%のペプシンを含む0.01 Nの塩酸、さらに0.1%の CaCl_2 を含む濃度0.1%のトリプシンのTris緩衝液（pH 7.6）、ならびに10 mMのEDTA及び0.5%のSDSを含む濃度1～50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテアーゼKの10 mMのTris-HCl緩衝液（pH 7.8）が挙げられる。さらに、プロテアーゼKが使用される場合、その反応溶液のpHは、6.5～9.5から適宜選択され、SH試薬またはトリプシンもしくはキモトリプシン阻害剤が適宜使用され得る。ヒストファインHer2キット（MONO）（Nichirei Bioscience）に含まれるプロテアーゼもまた、かかる好ましいプロテアーゼの具体例に含まれる。該プロテアーゼ誘導エピトープ回復は、通常、37℃で行われる。しかしながら、反応温度は、25℃～50℃の範囲内で適宜変更され得る。該プロテアーゼ誘導エピトープ回復が37℃で行われる場合、反応時間は、例えば、1分～5時間から適宜選択され、例えば、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、または4時間である。該PIER処理の完了後、このように処理された組織調製

30

40

50

物を洗浄緩衝液で洗浄する。PBS（リン酸緩衝生理食塩水）が、該洗浄緩衝液として、好ましくは使用される。さらに、Tris-HCl緩衝液もまた、好ましくは使用される。該洗浄条件は、通常、室温で5分間、3回の洗浄を行うことを含む方法を採用する。しかしながら、該洗浄時間及び温度は、適宜変更され得る。

【0143】

別の例示的な方法では、ホルマリン固定によって反応性が低下した抗原の反応性を、熱誘導エピトープ回復法（HIER法）によって回復する。具体的には、マイクロ波、煮沸、またはオートクレーブを使用した加熱により、高温処理による該抗原の加水分解の結果として、抗体へのエピトープの結合が可能になるとされる。該煮沸処理を780Wの出力で行って当該溶液の温度を約98℃に維持する場合、該処理を含めた回復に要する時間は、5分～60分から適宜選択され、例えば、10分である。該抗原回復処理は、10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液、及び市販のDiva Decloaker溶液（BioCare Medical, LLC, Pacheco, CA）、BOND Epitope Retrieval Solution 1（ER1）またはBOND Epitope Retrieval Solution 2（ER2）（Leica Biosystems Richmond, Inc, Richmond, IL）等で行われ得る。膜結合型GPC3が、本開示の204抗体によって検出され、感知できるほどの非特異的バックグラウンドを伴わず、細胞表面の染色の境界線を示すことができるように、回復処理の結果として、抗グリピカン3抗体によって認識される抗原のエピトープが、当該抗体に対する親和性を獲得する限り、任意の緩衝液または水溶液が好ましくは使用される。該回復処理の完了後、このように処理された組織調製物を、スライドが冷却されるまでDI水を徐々に添加しながら、室温で30分間放置する。

【0144】

c. IHC IVDアッセイに使用するための抗グリピカン3抗体

本発明のIHC IVD法に使用するために好ましい抗グリピカン3抗体は、204またはその部分である。実施例に詳細に記載される204抗体は、例えば、GC33抗体（WO 2006/006693）及び1G12抗体（WO 2003/100429）と比較して好ましい。これは、該204抗体が、予想外かつ有利にも、より少ない非特異的バックグラウンド染色、細胞表面の境界線、及びヘマトキシリンによる鮮明な核の対比染色を示すことが分かったからである。したがって、204を使用したIHC染色は、組織サンプルにおいて、1G12染色と比較して、高い膜結合型のHスコアを高い頻度でもたらすことが分かった（例えば、図9参照）。これにより、本明細書に開示する204が、1G12抗体よりも高い感度を有し、かつGPC3発現細胞の細胞膜を優先的に染色することが可能な抗GPC3モノクローナル抗体を含むことが実証され、上記のことは、解決を必要とする当該技術分野で認識されている問題である（例えば、Phung et al., 2012. mAbs Landes Bioscience, 4:5; 592-599参照）。以下の実施例1で論じる通り、本発明において好ましくは使用される抗グリピカン3抗体は、免疫抗原としてのグリピカン3で非ヒト動物を免疫することによって得た。かかる抗グリピカン3抗体を調製するための一般的な方法は、下記実施例ならびにWO 2003/100429及びWO 2006/006693に記載されている。

【0145】

実施形態では、該好ましい抗体は、配列番号6として本明細書に記載の相補性決定領域（CDR）1、配列番号8として本明細書に記載のCDR2、配列番号10として本明細書に記載のCDR3を含む該抗体の重鎖、ならびに配列番号13として本明細書に記載のCDR1、配列番号15として本明細書に記載のCDR2、及び配列番号17として本明細書に記載のCDR3を含む該抗体の軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、該好ましい抗体は、配列番号2として本明細書に記載の重鎖可変領域（HCVR）及び配列番号4として本明細書に記載の軽鎖可変領域（LCVR）を含む。

【0146】

d. 組織調製物と抗グリピカン3抗体の反応

任意に上記の抗原回復処理に供された組織調製物を、一次抗体としての該抗GPC3抗体（例えば、204）と反応させる（すなわち、接触させる）。該反応は、該抗GPC3抗体が、該抗原（例えば、GPC3）のエピトープを特異的に認識し、それによって抗原抗体複合体を形成するのに適した条件下で行われる。

【0147】

該反応は、通常、4℃で終夜、または37℃で1時間行われる。しかしながら、該反応条件は、該抗体による該抗原のエピトープの認識及び抗原抗体複合体の形成に適した範囲内で適宜変更され得る。例えば、該反応温度は、4℃～50℃の範囲内で変更することができ、該反応時間は、1分～7日の間で変更することができる。低温での反応の場合、より長い反応時間が好ましい。該一次抗体反応の完了後、該組織調製物を洗浄緩衝液で洗浄する。PBS（リン酸緩衝生理食塩水）が、該洗浄緩衝液として、好ましくは使用される。さらに、Tris-HCl緩衝液もまた、好ましくは使用され得る。該洗浄条件は、通常、室温で5分間、3回の洗浄を行うことを含む方法を採用する。しかしながら、該洗浄時間及び温度は、適宜変更され得る。

【0148】

次に、該一次抗体反応に供した組織調製物を、該一次抗体を認識する二次抗体と反応させる。当該二次抗体を可視化するための標識物質で予め標識された二次抗体が通常使用される。該標識物質の好ましい例としては、以下が挙げられる：蛍光色素、例えば、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、Cy2（Amersham Biosciences）、及びAlexa488（Molecular Probes, Inc.）、酵素、例えば、ペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ、ならびにコロイド金。

【0149】

該二次抗体との反応は、該抗GPC3抗体及び該抗GPC3抗体を認識する二次抗体による抗原抗体複合体の形成に適した条件下で行われる。該反応は、通常、室温または37℃で30分～1時間行う。しかしながら、該反応条件は、該抗GPC3抗体及び該二次抗体による抗原抗体複合体の形成に適した範囲内で適宜変更され得る。例えば、該反応温度は、4℃～50℃の範囲内で変更することができ、該反応時間は、1分～7日の間で変更することができる。低温での反応の場合、より長い反応時間が好ましい。該二次抗体反応の完了後、該組織調製物を洗浄緩衝液で洗浄する。PBS（リン酸緩衝生理食塩水）が、該洗浄緩衝液として、好ましくは使用される。さらに、Tris-HCl緩衝液もまた、好ましくは使用され得る。該洗浄条件は、通常、室温で5分間、3回の洗浄を行うことを含む方法を採用する。しかしながら、該洗浄時間及び温度は、適宜変更され得る。

【0150】

次に、該二次抗体反応に供した組織調製物を、該標識物質を可視化するための物質と反応させる。ペルオキシダーゼを該二次抗体のための標識物質として使用する場合、該組織調製物を、0.02%過酸化水素水溶液と、0.1MのTris-HCl緩衝液（pH7.2）で濃度0.1%に調整したDAB（ジアミノベンジン）溶液をインキュベーションの直前に等量混合することによって得た反応溶液とインキュベートする。DABに加えて、DAB-Ni及びAEC+（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）、DAB sparkle（Biocare Medical, Pacheco, CA）等の発色基質を適宜選択することができる。インキュベーションの過程で、発色の程度を顕微鏡下でときどき観察する。適切な発色が確認された時点で、該組織調製物をPBSに浸漬することによって、可視化反応を終了する。

【0151】

該二次抗体のための標識物質としてアルカリホスファターゼを使用する場合、該組織調製物を、BCIP（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート）／NBT（ニトロ・ブルー・テトラゾリウム）（Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA）基質溶液（濃度0.4mMのNBT及び濃度0.38mMのBCIPを、10mMのMgCl₂及び28mMのNaClを含む50mMの炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.8）に溶解する）とともにインキュベートする。さらに

、BCIP及びNBTに加えて、Permanent Red、Fast Red、またはFuchsin+（すべてAgilent）を適宜使用してもよい。該インキュベーションの前に、該組織調製物を、濃度1mMのレバミゾールクロリド（内因性アルカリホスファターゼの阻害剤、Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan）、0.1Mの塩化ナトリウム、及び50mMの塩化マグネシウムを含む0.1MのTris-HCl緩衝液（pH9.5）とともに、室温で1分～数時間ブレインキュベートしてもよい。インキュベーションの過程で、該組織調製物を顕微鏡下でときどき観察する。最終的な反応生成物である紫色ホルマザンの沈殿が観察された時点で、該組織調製物を水で洗浄するか、または2%ポリビニルアルコールを含むTBSを添加することによって反応を終了する。次いで、該組織調製物をTBST（0.1%Tween 20を含むTBS）で洗浄する。該二次抗体の標識としてコロイド金を使用する場合、該コロイド金を、金属銀を該金粒子に付着させることにより、銀増感によって可視化する。銀増感法は、当業者に一般に知られている。

10

【0152】

実施形態では、所望の抗体抗原複合体の検出はまた、核染色と組み合わせることができる。例えば、核染色は、ヘテロクロマチン及び核小体を含む核成分を染色するヘマトキシリンを使用して行うことができる。代表的な例として、CATヘマトキシリン（Biocare Medical, Pacheco, CA）が、核染色の組織学的実証のために使用され得る。通常使用されるヘマトキシリン溶液は、アルミニウムで媒染され、通常は、媒染剤塩としてアルミニウムミョウバン（硫酸アルミニウム・アンモニウム）を使用する。該アルミニウム塩は、それ自体が酸化剤に含まれないため、ヘマトキシリンをヘマテインに変換させるための空気または化学物質にヘマトキシリン溶液を曝露することが必要である。ミョウバン・ヘマトキシリン溶液（例えば、CAT Hematoxylin）に酸を添加することにより、核に対する染色の選択性が高まり、化学酸化剤の急速な酸化作用を弱めると考えられる。この後者の機能により、該溶液が一部のヘマトキシリンとヘマテインとの平衡を維持し、良好な染色の確保が可能になる。グリセロールは、該系を過酸化に対して安定化させる傾向があり、急速な蒸発を防止する助けとなる。

20

【0153】

いずれかの蛍光色素、例えば、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、Cy2（Amersham Biosciences, Amersham, UK）、及びAlexa488（Molecular Probes, Inc., Eugene, OR）を、該二次抗体のための標識物質として使用する場合、該可視化物質反応のステップは必要ない。該蛍光物質の励起波長の光の照射によって放出される光は、蛍光顕微鏡の使用によって適宜検出され得る。

30

【0154】

例示的な実施形態では、対象におけるGPC3発現細胞の存在を検出するためのインビトロ免疫測定法は、以下のステップを含む：a）該対象からの組織調製物を、ホルマリン固定パラフィン包埋切片として提供し、該ホルマリン固定パラフィン包埋切片を、透明支持体に付着させるステップ、（b）該組織調製物を、脱パラフィン処理に供するステップ、（c）任意に、該組織調製物を、抗原回復処理に供するステップ、（d）抗GPC3抗体とステップ（c）で処理された組織調製物の細胞の細胞膜に存在するGPC3の複合体の形成に十分な条件下で、該抗GPC3抗体を該組織調製物と接触させるステップ、（e）免疫組織化学を使用することにより、該複合体の存在を検出するステップ、ここで、該複合体が存在する場合、該対象は、GPC3発現腫瘍を有すると診断され、該抗GPC3抗体は、GPC3のベータ鎖のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体であり、該抗GPC3抗体の重鎖は、配列番号6として記載の相補性決定領域（CDR）1、配列番号8として記載のCDR2、及び配列番号10として記載のCDR3を含み、該抗体の軽鎖は、配列番号13として記載のCDR1、配列番号15として記載のCDR2、及び配列番号17として記載のCDR3を含む。例では、該GPC3発現腫瘍は、肝細胞癌、非小細胞肺癌、卵巣明細胞癌、及び胃癌からなる群から選択される。例では、該抗GPC

40

50

C3抗体の重鎖は、配列番号2として記載の重鎖可変領域（HCVR）を有する。例では、該抗GPC3抗体の軽鎖は、配列番号4として記載の軽鎖可変領域（LCVR）を有する。例では、該抗GPC3抗体は、204であり、該204抗体は、GPC3のベータ鎖のエピトープを特異的に認識し、該エピトープは、1G12によって特異的に認識されるエピトープとは異なり、さらにそれは、GC33によって特異的に認識されるエピトープとは異なる。例では、該抗原回復処理は、熱誘導エピトープ回復（HIER）法に基づく。例では、該HIER法は、ステップ（c）の組織調製物を、105～115℃に、10～20分の時間枠の間加熱することを含み、好ましくは、該組織調製物は、110℃に15分間加熱される。いくつかの例では、該抗原回復処理は、さらにまたは代替的に、プロテアーゼ誘導エピトープ回復（PIER）法に基づく。PIER法を使用する例では、該PIER法で使用されるプロテアーゼは、ペプシン、トリプシン、及びプロテアーゼKからなる群から選択される。例では、免疫組織化学を使用することによる該複合体の存在の検出は、酵素反応を含む。例では、ステップ（e）はさらに、ステップ（d）の組織調製物を、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）酵素にコンジュゲートされた二次抗体と接触させること、及びHRPが触媒する反応で、過酸化水素による3,3'-ジアミノベンジジンの酸化を介して該複合体を可視化することを含む。例では、該複合体の存在の検出は、さらに、検出された複合体の量のスコアリングを含む。いくつかの例では、該スコアリングは、病理学者によって行われる。いくつかの例では、該複合体の存在の検出は、デジタル化を介して行われ、該スコアリングは、該検出された複合体のデジタル化に基づいて自動化される。いくつかの例では、該スコアリングはさらに、免疫組織化学を介して検出された複合体の染色強度を、整数スケール0（陰性）～3+を使用して特定すること、各強度レベルで正に染色された細胞のパーセンテージを記録すること、及び各強度レベルで正に染色された細胞のパーセンテージに基づいて、膜結合型のHスコアを計算することを含む。

10

20

30

40

50

【0155】

e. IHC IVDアッセイの自動化

本明細書に開示するIHC IVDアッセイは、手動で行われる場合もあれば、自動化される場合もある。本開示のIHC IVDアッセイを行うことができる自動システムの関連例としては、Intel lipath FLX（登録商標）（Biocare Medical, Pacheco, CA）、Autostainer Link 48（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）、BOND-I II完全自動IHC染色システム（Leica Biosystems, Richmond, IL）等が挙げられるがこれらに限定されない。

【0156】

f. GPC3発現組織の分類及び治療効果の予測

GPC3は、例えば、がん性組織（例えば、肝臓癌組織）における消化の際に、そのN末端部分を血清中に放出し得ることが知られている（WO 2004/022739）。したがって、GPC3のN末端部分と反応する抗体は、消化後に細胞表面に固定されたままであるGPC3ポリペプチドのC末端部分に結合することが可能であるとは予想されない。下記実施例に記載の通り、該204抗体は、腫瘍組織での消化後に細胞膜に固定されたままであるGPC3のC末端部分を特異的に認識するその能力に少なくとも部分的に起因して、本明細書に開示するIHC IVDアッセイにおける使用に有利である。

【0157】

抗GPC3抗体は、肝臓癌の治療及び予防の点で有用であることが知られており（例えば、WO 2004/022739参照）、固形腫瘍細胞の表面で発現されるGPC3内のエピトープに特異的に結合するCAR構築物を発現する細胞によって付与される抗腫瘍活性の証拠がある（例えば、WO 2020/072546参照）。抗体、CAR等に依存する免疫療法は、細胞表面GPC3に結合することによって機能するため、治療効果の任意の予測が、主に膜結合型GPC3の発現を説明することが望ましい。換言すれば、GPC3発現腫瘍細胞（例えば、固形腫瘍細胞）に対する治療的抗GPC免疫療法（例えば

、抗体、CAR等)の治療効果が、抗GPC3標的化剤が結合するエピトープが該GPC3発現細胞に存在するか否かに応じて予測される場合、本方法は、細胞膜に固定されたままであるGPC3のC末端部分に特異的に結合する抗GPC3標的化剤に依存することが望ましい。本明細書で論じる通り、及び実施例に例示する通り、本開示のIHC IVD法での使用の点で好ましい204抗体は、GPC3のC末端部分を特異的に認識し、腫瘍細胞の細胞表面で発現されるGPC3に優先的に結合する。したがって、本明細書に開示するIHC IVD法における204抗体及びその使用は、該アッセイの結果が、抗GPC3抗体、抗GPC3 CAR(複数可)を発現する細胞等を含むがこれらに限定されない抗GPC3剤の治療効果の予測に適用可能であるという点で有利である。

【0158】

GPC3発現細胞／組織の分類は、染色強度及び膜結合型のHスコアの1つ以上に基づくスコアリングシステムに依存するが、必ずしも該パラメータに限定されない。簡潔には、本開示のIHC IVDアッセイにおける染色強度は、半定量的整数スケール0(陰性)~3(または「3+」)を使用してスコアリングする。各強度レベルにおける陽性染色細胞のパーセンテージを記録する。スコアリングは、好ましくは、細胞膜へのGPC3の局在化(アピカル及び周縁)に基づくが、いくつかの例では、任意の細胞質染色を説明することもできる。Hスコアは、0~300の値として計算され、以下のように定義される： $1 \times (\text{強度} 1 + \text{での細胞染色のパーセンテージ}) + 2 \times (\text{強度} 2 + \text{での細胞染色のパーセンテージ}) + 3 \times (\text{強度} 3 + \text{での細胞染色のパーセンテージ}) = \text{Hスコア}$ 。Hスコアが高いほど、GPC3発現腫瘍細胞に対する治療的抗GPC3療法(例えば、抗GPC3免疫療法)の予測される治療効果の指標が大きくなる。いくつかの例では、該スコアリングは、認定病理学者によって行われ得る。さらに、または代替的に、該スコアリングが自動化され得ることは、本開示の範囲内である。例えば、本開示は、GPC3及び抗GPC3抗体(例えば、204)から生じる抗原抗体複合体の顕微鏡下での検出の程度及びパターンの差のデジタル化を提供する。病理学者によって該スコアリングが行われる、及び／または該スコアリングがデジタル化される例では、試験サンプルは、対照サンプル、例えば、アイソタイプ対照サンプルまたは該細胞表面でのGPC3の発現を欠く同様の組織調製物に対して正規化され得る。

【0159】

g. IHC IVDアッセイに基づく診断及び／または治療方法

本開示のIHC IVD法は、細胞膜でGPC3を発現する対応する細胞を含むがんを有するとして患者を診断するのに有用である。本開示のIHC IVD法はさらに、患者がまだ抗GPC3療法を受けていない場合に、該患者を抗GPC3療法(例えば、抗体ベースの免疫療法、CARベースの免疫療法等)で治療するか否かを判断する際に有用である。該IHC IVD法はまた、患者がすでにある程度の期間、抗GPC3療法を受けている場合に、該患者の該療法での治療を継続するかどうかを判断する際にも有用である。いくつかの例では、抗GPC3療法の用量及び／または投与間隔は、本明細書に開示するIHC IVDアッセイの結果に応じて調整され得る(例えば、用量は増加する場合も減少する場合もあり、投与間隔は延長される場合も短縮される場合もある等)。したがって、本明細書に開示するIHC IVDアッセイは、患者が特定のがん、すなわち、該腫瘍を含む細胞の表面でGPC3を発現する固形腫瘍を有すると診断するために使用することができ、また、がん性細胞の表面のGPC3を特異的に標的とするがん治療が挙げられるがこれに限定されないがん治療に対する患者の反応をモニタリングする手段として使用することもできる。

【0160】

したがって、1つの態様では、本発明は、GPC3を含むことが疑われるサンプルにおけるGPC3の存在を判断する方法を提供し、該方法は、該サンプルを本発明の抗体に曝露し、該サンプルにおける該抗体のGPC3への結合を特定することを含み、該サンプルにおける該抗体のGPC3への結合は、該サンプルにおける該タンパク質の存在を示す。1つの実施形態では、該サンプルは、生体サンプル(例えば、組織調製物)である。さらな

10

20

30

40

50

る実施形態では、該生体サンプルは、肝臓癌細胞を含む。1つの実施形態では、該生体サンプルは、肝臓癌障害及び／または肝臓癌細胞増殖性障害を起こしている、または起こしていることが疑われる哺乳類に由来する。さらなる実施形態では、該生体サンプルは、卵巣癌細胞を含む。1つの実施形態では、該生体サンプルは、卵巣癌障害及び／または卵巣癌細胞増殖性障害を起こしている、または起こしていることが疑われる哺乳類に由来する。さらなる実施形態では、該生体サンプルは、胃癌（腺癌）細胞を含む。1つの実施形態では、該生体サンプルは、胃（*g a s t r i c*または*s t o m a c h*）障害及び／または胃（*g a s t r i c*または*s t o m a c h*）細胞増殖性障害を起こしている、または起こしていることが疑われる哺乳類に由来する。さらなる実施形態では、該生体サンプルは、肺癌細胞を含む。1つの実施形態では、該生体サンプルは、扁平上皮癌障害及び／または肺癌細胞増殖性障害を起こしている、または起こしていることが疑われる哺乳類に由来する。1つの実施形態では、該生体サンプルは、皮膚細胞を含む。さらなる実施形態では、該生体サンプルは、メルケル細胞癌、または黒色腫に罹患しているか、または罹患していると疑われる哺乳類に由来する。

10

20

30

40

50

【0161】

1つの態様では、(i) GPC3を発現する細胞、例えば、肝臓癌細胞、卵巣癌細胞、肺癌細胞、または胃（*g a s t r i c*もしくは*s t o m a c h*）癌細胞の増加、あるいは(ii)腫瘍内のGPC3発現の増加と関連する細胞増殖性障害の診断方法を提供する。1つの実施形態では、該方法は、生体サンプル（例えば、組織調製物）の試験細胞を、本開示の抗GPC3抗体と接触させること、該抗体のGPC3への結合を検出することによって、該サンプルの試験細胞に結合した抗体のレベルを特定すること、及び対照サンプルの細胞に結合した抗体のレベルを比較することを含み、該結合した抗体のレベルは、該試験サンプル及び対照サンプルのGPC3発現細胞の数に正規化され、該試験サンプルで結合した抗体のレベルが、該対照サンプルと比較して高いことは、GPC3を発現する細胞と関連する細胞増殖性障害の存在を示す。

【0162】

1つの態様では、抗GPC3免疫療法が、がんに与える治療効果を予測する方法を提供し、該がんは、該がんの細胞がGPC3を発現することの特徴とし、該方法は、本明細書に開示するIVD IHCアッセイを介して対象における該細胞の存在を検出することを含む。実施形態では、該抗GPC3抗体と、該がん細胞の膜で発現されるGPC3との複合体が検出された場合、該抗GPC3免疫療法が、該対象のがんに対して治療効果を有すると予測される。実施形態では、該治療効果を予測する方法は、該対象が、あらゆる抗GPC3免疫療法を受ける前に行われる。いくつかの実施形態では、該治療効果を予測する方法は、該対象が、すでに抗GPC3免疫療法を受けている過程で行われる。

【0163】

h. 関連する検出スキーム及びアッセイ方法

本発明は、本明細書に開示する抗GPC3抗体を使用したIHC法に焦点を合わせているが、本発明の抗GPC3抗体は、任意の既知のアッセイ法、例えば、ELISA、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ（Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158, CRC Press, Inc.）等にも使用してもよいことが理解され得る。

【0164】

検出標識は、結合または認識事象の局在化、可視化、及び定量化に有用であり得る。本発明の標識抗体により、細胞表面GPC3を検出することができる。検出可能に標識した抗体の別の使用は、ビーズベースのイムノキャプチャーの方法であり、該方法は、ビーズを蛍光標識抗体とコンジュゲートさせ、リガンドの結合の際の蛍光シグナルを検出することを含む。同様の結合検出法は、抗体-抗原相互作用を測定及び検出するために表面プラズモン共鳴（SPR）作用を使用する。検出標識、例えば、蛍光色素及び化学発光色素（Briggs et al (1997) “*Synthesis of Functiona*”

lised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids,” J. Chem. Soc, Perkin-Trans. 1:1051-1058) は、検出可能なシグナルを提供し、一般に、抗体を標識するのに適用可能であり、好ましくは、以下の特性を有する：(i) 該標識抗体は、少量の抗体が、無細胞及び細胞ベースの両アッセイで高感度で検出されるように極めて高いシグナルを低いバックグラウンドで生じるべきである、ならびに(ii) 該標識抗体は、該蛍光シグナルが観察され、モニタリングされ、大きく退色することなく記録され得るように、光安定性であるべきである。標識抗体の膜または細胞表面、特に生細胞への細胞表面結合を伴う用途については、該標識は、好ましくは、(iii) 有効なコンジュゲート濃度及び検出感度を達成するために良好な水溶性を有し、かつ(iv) 生細胞の正常な代謝プロセスを攪乱することも早期細胞死をもたらすこともないように、生細胞に対して無毒である。

10

【0165】

細胞の蛍光強度及び蛍光標識事象、例えば、ペプチド-色素複合体の細胞表面結合の直接定量は、システム(FMAT(登録商標)8100 HTSシステム、Applied Biosystems, Foster City, Calif.)で行ってもよく、該システムは、生細胞またはビーズによるmix-and-readの非放射性アッセイを自動化する(Miraglia, “Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology”, (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204)。標識抗体の使用としてはまた、細胞表面受容体結合アッセイ、イムノキャプチャーアッセイ、蛍光結合免疫吸着アッセイ(FLISA)、カスパーゼ切断(Zheng, “Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo”, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23, US 6372907)、アポトーシス(Vermes, “A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V” (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51)及び細胞毒性アッセイも挙げられる。蛍光微量分析技術を使用して、該細胞表面を標的とする分子による上方または下方制御を識別することができる(Swartzman, “A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology”, (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

20

30

【0166】

本発明の標識抗体は、様々な生物医学的画像化及び分子画像化の方法及び技術、例えば、(i) MRI(磁気共鳴画像)、(ii) マイクロCT(コンピュータ断層撮影)、(iii) SPECT(単一光子放射断層撮影)、(iv) PET(陽電子放射断層撮影) Chen et al(2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49、(v) 生物発光、(vi) 蛍光、及び(vii) 超音波によるイメージングバイオマーカー及びプローブとして有用である。免疫シンチグラフィは、放射性物質で標識した抗体を動物またはヒト患者に投与し、該抗体が局在する体内の部位で画像を取得する、イメージング法である(US 6528624)。イメージングバイオマーカーを客観的に測定し、正常な生物学的プロセス、病態プロセス、または治療介入に対する薬理学的反応の指標として評価することができる。

40

【0167】

50

ペプチドの標識方法は周知である。Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc. Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2, Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2, Glazer et al (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York, Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York, Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York, 及び Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.), De Leon-Rodriguez et al (2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155, Lewis et al (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324, Li et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115, Mier et al (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237を参照されたい。

10

20

30

40

【0168】

本発明の標識抗体はまた、親和性精製剤としても使用され得る。このプロセスでは、該標識抗体は、固相、例えば、Sephadex樹脂または濾紙に、当技術分野で周知の方法を使用して固定される。該固定化抗体を、精製すべき抗原を含むサンプルと接触させ、その後、該固定化ポリペプチドバリエーションに結合した精製すべき抗原を除いた該サンプル中のすべての物質を実質的に除去する適切な溶媒で該支持体を洗浄する。最後に、該支持体を、別の適切な溶媒、例えば、pH 5.0のグリシン緩衝液で洗浄することにより、該抗原が該ポリペプチドバリエーションから放出される。

【0169】

1つの態様では、本発明の抗GPC3抗体は、別のGPC3抗体によって結合されるGPC3の同じエピトープに結合する。別の実施形態では、本発明のGPC3抗体は、配列番号2及び配列番号4の可変ドメインを含むモノクローナル抗体の断片（例えば、Fab断片）、または配列番号2及び配列番号4の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメイン及びIgG由来の定常ドメインを含むキメラ抗体によって結合されるGPC3の同じエピトープに結合する。

【0170】

C. 本開示に包含される抗GPC3抗体の包括的な説明

1つの実施形態では、本発明は、診断薬及び／または治療薬として本明細書で使用され得る抗GPC3抗体を提供する。例示的な抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、及びヒト抗体が挙げられる。

【0171】

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原及びアジュバントの複数回皮下（sc）または腹腔内（ip）注射により、動物内で増やされる。該関連抗原（特に、合成ペプチドが使用される場合）を、免疫化される種において免疫原性であるタンパク質コンジュゲ

50

ートすることが有用であり得る。例えば、該抗原は、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターに、二官能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介したコンジュゲーション）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOC12、またはRTST=C=NR（R及びR'は、異なるアルキル基である）を使用してコンジュゲートされ得る。

【0172】

動物を、例えば、100 μgまたは5 μgのタンパク質またはコンジュゲート（それぞれ、ウサギまたはマウスの場合）を、3体積のフロイント完全アジュバントと混合し、該溶液を複数の部位で皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、または誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、該動物を、元の量の1/2～1/10のペプチドまたはコンジュゲートを含むフロイント完全アジュバントで複数の部位での皮下注射によりブーストする。7～14日後、該動物から採血し、血清の抗体力価をアッセイする。該力価がプラトーに達するまで動物をブーストする。コンジュゲートは、タンパク質融合物として組み換え細胞培養物でも作製され得る。また、ミョウバン等の凝集剤が、免疫応答を高めるために好適に使用される。

【0173】

2. モノクローナル抗体

目的の抗原に対するモノクローナル抗体（mAb）は、当技術分野で既知の任意の技術を使用して調製され得る。これらとしては、Kohler and Milsteinによって最初に記載されたハイブリドーマ技術（1975, Nature 256, 495-497）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72）、及びEBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）が挙げられるがこれに限定されない。選択されたリンパ球抗体法（SLAM）（Babcock, J. S., et al., A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. 93(15): p. 7843-8.）及び（McLean GR, Olsen OA, Watt IN, Rathanaswami P, Leslie KB, Babcock JS, Schrader JW. Recognition of human cytomegalovirus by human primary immunoglobulins identifies an innate foundation to an adaptive immune response. J Immunol. 2005 Apr 15;174(8):4768-78.）かかる抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、及びIgDを含めた任意の免疫グロブリンクラスならびにその任意のサブクラスのものであり得る。本発明で使用されるmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロで増殖させる場合もインビボで増殖させる場合もある。

【0174】

モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495（1975）によって最初に記載されたハイブリドーマ法を使用して作製される場合もあれば、組み換えDNA法によって作製される場合もある（米国特許第4,816,567号）。該ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物、例えば、ハムスターを、上記の通りに免疫化し、免疫化に使用されたタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生することが可能であるリンパ球を誘発する。別の方法として、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。免疫化後、リンパ球を単離し、次いで適切な融合

剤、例えば、ポリエチレングリコールを使用して骨髓腫細胞株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

【0175】

このように調製したハイブリドーマ細胞を、適切な培地に播種し、成長させる。この培地は、好ましくは、未融合の親骨髓腫細胞 (融合パートナーとも呼ばれる) の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を含む。例えば、該親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRTまたはHPR T) を欠く場合、該ハイブリドーマの選択培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み (HAT培地)、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の成長を防止する。

10

【0176】

好ましい融合パートナーである骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定したハイレベルの産生を支持し、該未融合の親細胞を不可として選択する選択培地に対する感度が高いものである。好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫株、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、ならびにAmerican Type Culture Collection, Manassas, Va., USA. から入手可能なSP-2及び派生物、例えば、X63-Ag8-653細胞である。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘト口骨髓腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、及びBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

20

【0177】

ハイブリドーマ細胞が成長する培地は、該抗原に対するモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によって決定される。

30

【0178】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980) に記載のスキチャード解析によって特定され得る。

【0179】

所望の特異性、親和性、及び／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を特定した後、該クローンを、限界希釈手順によってサブクロニングし、標準的な方法 (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)) で成長させてもよい。この目的に適した培地としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が挙げられる。さらに、該ハイブリドーマ細胞は、動物の腹水腫瘍としてインビボで、例えば、該細胞をマウスにi.p. 注射することによって成長させてもよい。

40

【0180】

該サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、従来の抗体精製手順、例えば、アフィニティークロマトグラフィー (例えば、プロテインAもしくはプロテインG-Sepharoseを使用して) またはイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等によって、培地、腹水、または血清から適切に分離される。

50

【0181】

該モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離及び配列決定される。該ハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの好ましい源としての機能を果たす。単離後、該DNAを発現ベクターに配してもよく、これをその後宿主細胞、例えば、他の場合には抗体タンパク質を産生しないE. coli細胞、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞にトランスフェクトして、該組み換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成が得られる。該抗体をコードするDNAの細菌における組み換え発現に関する総説記事としては、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) 及びPlickthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992) が挙げられる。

10

【0182】

さらなる実施形態では、モノクローナル抗体または抗体断片は、それぞれ、マウス及びヒト抗体を、ファージライブラリを使用して単離することを記載しているMcCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990), Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) に記載の技術を使用して生成された抗体ファージライブラリから単離され得る。続報に記載されているのは、鎖シャフリングによる高親和性（nM範囲）ヒト抗体の産生（Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)）、ならびに極めて大きなファージライブラリを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染及びインビボ組み換え（Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)）である。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体を単離するための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替案である。

20

【0183】

該抗体をコードするDNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン（CH及びCO配列）で、相同マウス配列を置換すること（米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)）によって、または該免疫グロブリンのコード配列を、非免疫グロブリンポリペプチド（異種ポリペプチド）のコード配列の全部及び一部と融合させることによって、キメラまたは融合抗体ポリペプチドを産生するように改変され得る。該非免疫グロブリンポリペプチドの配列は、抗体の定常ドメインと置き換わることができるか、または、それらは、抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインを置換し、抗原に対する特異性を有する抗原結合部位及び異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体が創出される。

30

【0184】

3. キメラ、ヒト化、及びヒト抗体

いくつかの実施形態では、該抗GPC3抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載されている。1つの例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または非ヒト霊長類、例えば、サルに由来する可変領域）及びヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変化した「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、それらの抗原結合断片が含まれる。

40

【0185】

いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。通常、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するために

50

ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（またはそれらの部分）が非ヒト抗体に由来し、FR（またはそれらの部分）がヒト抗体配列に由来する1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を復元または向上させるために、非ヒト抗体（例えば、CDR残基が由来する抗体）からの対応する残基で置換される。

【0186】

本発明の抗GPC3抗体はさらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。非ヒト（例えば、マウスまたはウサギ）抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列）であり、これらは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラットまたはウサギのCDRの残基で置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。場合によっては、該ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、取り込まれたCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。一般に、該ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常は2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、ここで、該CDR領域のすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、該FR領域のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。該ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、通常は、ヒト免疫グロブリンのものも含む [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986)、Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988)、及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)]。

【0187】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当技術分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源から、それに導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、「取り込み」残基と呼ばれ、これらは、通常、「取り込み」可変ドメインから採取される。ヒト化は、本質的に、Winter及びその同僚の研究者達の方法 [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986)、Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988)、Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)] に従い、げっ歯類のCDRまたはCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列に置換することによって行われ得る。したがって、かかる「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第4,816,567号）であり、実質的にインタクトに満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。実際に、ヒト化抗体は、通常は、いくつかのCDR残基及びおそらくはいくつかのFR残基が、げっ歯類の抗体における類似の部位からの残基で置換されたヒト抗体である。

【0188】

該ヒト化抗体の作製に使用される軽及び重の両ヒト可変ドメインの選択は、該抗体がヒトの治療上の使用を目的とする場合に、抗原性及びHAMA反応（ヒト抗マウス抗体）を減少させるために極めて重要である。HAMA反応の低減または排除は、適切な治療薬の臨床開発の重要な側面である。例えば、Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80: 937、Jaffers et al., Transplantation (1986), 41: 572、Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135: 1530、Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3: 138、Miller et al., Blood (1983), 62: 988、Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147: 1352、Reichman

n et al., Nature (1988), 332:323、Jung et al., Cancer Res. (1990), 50:1495を参照されたい。本明細書に記載の通り、本発明は、HAMA反応が減少するように、または排除されるようにヒト化された抗体を提供する。これらの抗体のバリエーションはさらに、当技術分野で既知の常法を使用して得ることができ、その一部は、以下にさらに説明されている。いわゆる「最良適合」法に従って、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対してスクリーニングされる。げっ歯類のものに最も近いヒトVドメインの配列が特定され、その中のヒトフレームワーク領域（FR）が、該ヒト化抗体に受け入れられる（Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)、Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)）。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定の低位群のすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークが、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用されてもよい（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)、Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)）。

10

【0189】

例えば、本明細書に記載の抗体からのアミノ酸配列は、該フレームワーク及び／または超可変配列（複数可）の多様化のための出発（親）配列の役割を果たし得る。出発超可変配列が連結される選択されたフレームワーク配列は、本明細書ではアクセプターヒトフレームワークと呼ばれる。該アクセプターヒトフレームワークは、ヒト免疫グロブリン（そのVL及び／またはVH領域）からであり得るか、またはそれに由来し得るが、かかるフレームワークは、ヒト患者において免疫原性が最小であるか、または免疫原性を有さないということが実証されているため、好ましくは、該アクセプターヒトフレームワークは、ヒトコンセンサスフレームワーク配列からであるか、またはそれに由来する。

20

【0190】

該アクセプターがヒト免疫グロブリンに由来する場合、任意に、該ドナーフレームワーク配列を、ヒトフレームワーク配列のコレクションの中の様々なヒトフレームワーク配列と整列させることによって、該ドナーフレームワーク配列に対するその相同性に基づいて選択されるヒトフレームワーク配列を選択し、最も相同性の高いフレームワーク配列を該アクセプターとして選択してもよい。

30

【0191】

1つの実施形態では、本明細書におけるヒトコンセンサスフレームワークは、VH低位群III及び／またはVLカッパ低位群Iコンセンサス重鎖フレームワーク配列からであるか、またはそれに由来する。

【0192】

該アクセプターは、選択されたヒトフレームワーク配列と配列が同一でもよいが、それがヒト免疫グロブリンからであるか、ヒトコンセンサスフレームワークからであるかにかかわらず、本発明は、該アクセプター配列が、該ヒト免疫グロブリン配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列に対して既存のアミノ酸置換を含み得ることを企図する。これらの既存の置換は、好ましくは、最小であり、通常は、ヒト免疫グロブリン配列またはコンセンサスフレームワーク配列に対してのみ、4、3、2または1個のアミノ酸の不一致である。

40

【0193】

非ヒト抗体の超可変領域残基は、該VL及び／またはVHアクセプターヒトフレームワークに組み込まれる。例えば、KabattのCDR残基、Chothiaの超可変ループ残基、Abmの残基、及び／またはcontactの残基に対応する残基を組み込んでもよい。任意に、以下の伸長超可変領域残基が組み込まれる：24～34（LI）、50～56（L2）及び89～97（L3）、26～35B（HI）、50～65、47～65または49～65（H2）及び93～102、94～102、または95～102（H3）。

50

【0194】

超可変領域残基の「組み込み」が本明細書で論じられるが、これは、様々な方法で達成することができることが理解されよう。例えば、所望のアミノ酸配列をコードする核酸は、マウス可変ドメイン配列をコードする核酸を、そのフレームワーク残基が、アクセプターヒトフレームワーク残基に変更されるように変異させることによって、またはヒト可変ドメイン配列をコードする核酸を、該超可変ドメイン残基が、非ヒト残基に変更されるように変異させることによって、または所望の配列をコードする核酸を合成することによって等で生成することができる。

【0195】

本明細書に記載の通り、超可変領域グラフトバリエーションは、該ヒトアクセプター配列をコードする核酸のKunkel突然変異生成によって、超可変領域ごとに別々のオリゴヌクレオチドを使用して生成され得る。Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)。常用の技術を使用して、該フレームワーク及び／または超可変領域内に適切な変化を導入し、適切な超可変領域-抗原相互作用を補正及び再構築することができる。

【0196】

したがって、1つの実施形態では、本発明は、宿主対象において、配列番号2及び4の配列を含む抗体と比較して、実質的に低いレベルのヒト抗マウス抗体反応(HAMA)を誘発する、及び／または誘発すると予想されるヒト化抗体を提供する。別の例では、本発明は、最小のヒト抗マウス抗体反応(HAMA)を誘発する、及び／または誘発すると予想される、またはそれを誘発しない、及び／または誘発しないと予想されるヒト化抗体を提供する。1つの例では、本発明の抗体は、臨床的に許容されるレベル以下の抗マウス抗体反応を誘発する。

【0197】

本発明のヒト化抗体は、1つ以上のヒト及び／またはヒトコンセンサス非超可変領域(例えば、フレームワーク)配列をその重鎖及び／または軽鎖可変領域に含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の修飾が、該ヒト及び／またはヒトコンセンサス非超可変領域配列内に存在する。1つの実施形態では、本発明の抗体の重鎖可変ドメインは、ヒトコンセンサスフレームワーク配列を含み、これは、1つの実施形態では、下位群I E Iのコンセンサスフレームワーク配列である。1つの実施形態では、本発明の抗体は、少なくとも1つのアミノ酸位置が修飾されたバリエーション下位群I E Iのコンセンサスフレームワーク配列を含む。

【0198】

当技術分野で知られるように、及び本明細書でより詳細に記載の通り、抗体の超可変領域を描写するアミノ酸位置／境界は、状況及び当技術分野で既知の様々な定義に応じて変化し得る(以下に記載の通り)。可変ドメイン内のいくつかの位置は、ハイブリッド超可変位置と見なされ得る。これは、これらの位置が、一組の判断基準下で超可変領域内にあると見なされ得るが、異なる組の判断基準下では超可変領域外にあると見なされ得るためである。これらの位置のうちの1つ以上は、伸長超可変領域にも見出され得る(さらに以下で定義される)。本発明は、これらのハイブリッド超可変位置に修飾を含む抗体を提供する。1つの実施形態では、これらの超可変位置としては、重鎖可変ドメインの26~30、33~35B、47~49、57~65、93、94及び101~102位の1つ以上が挙げられる。1つの実施形態では、これらのハイブリッド超可変位置としては、軽鎖可変ドメインの24~29、35~36、46~49、56、及び97位の1つ以上が挙げられる。1つの実施形態では、本発明の抗体は、1つ以上のハイブリッド超可変位置が修飾されたヒトバリエーションヒト下位群のコンセンサスフレームワーク配列を含む。

【0199】

本発明の抗体は、該抗体が、所望の生物学的特性(例えば、所望の結合親和性)を示す限り、任意の適切なヒトまたはヒトコンセンサス軽鎖フレームワーク配列を含むことができる。1つの実施形態では、本発明の抗体は、ヒトκ軽鎖のフレームワーク配列の少なく

とも一部（または全部）を含む。1つの実施形態では、本発明の抗体は、ヒトκ下位群Ⅰのフレームワークコンセンサス配列の少なくとも一部（または全部）を含む。

【0200】

ファージ（ミド）提示（本明細書の一部の文脈ではファージ提示とも呼ばれる）は、配列のランダム化によって生成されたライブラリにおいて、多くの異なる潜在的バリエーション抗体を生成及びスクリーニングするための便宜的かつ迅速な方法として使用され得る。しかしながら、当業者には、改変された抗体を作製及びスクリーニングするための他の方法が利用可能である。

【0201】

ファージ（ミド）提示技術は、リガンド、例えば、抗原に結合する新規なタンパク質を生成及び選択するための強力なツールを提供している。ファージ（ミド）提示の技術を使用することにより、高親和性で標的分子に結合する配列について迅速に分類され得るタンパク質バリエーションの大きなライブラリの生成が可能になる。バリエーションポリペプチドをコードする核酸は、一般に、ウイルスコートタンパク質、例えば、gene IIIタンパク質またはgene VIIタンパク質をコードする核酸配列に融合される。該タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸配列が、gene IIIタンパク質の部分をコードする核酸配列に融合される一価のファージミド提示系が開発されている。（Bass, S., Proteins, 8:309 (1990)、Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3:205 (1991)）。一価のファージミド提示系において、該遺伝子融合物は、低レベルで発現され、野生型gene IIIタンパク質も発現されるため、当該粒子の感染性が保持される。ペプチドライブラリを生成し、それらのライブラリをスクリーニングする方法は、多くの特許（例えば、米国特許第5,723,286号、米国特許第5,432,018号、米国特許第5,580,717号、米国特許第5,427,908号、及び米国特許第5,498,530号）に開示されている。

【0202】

抗体または抗原結合ポリペプチドのライブラリは、単一の遺伝子を、ランダムなDNA配列を挿入することにより改変すること、または関連する遺伝子のファミリーをクローニングすることを含めたいくつかの方法によって調製されている。ファージ（ミド）提示を使用して抗体または抗原結合断片を提示するための方法は、米国特許第5,750,373号、第5,733,743号、第5,837,242号、第5,969,108号、第6,172,197号、第5,580,717号、及び第5,658,727号に記載されている。該ライブラリはその後、所望の特性を有する抗体または抗原結合タンパク質の発現についてスクリーニングされる。

【0203】

最適なアミノ酸を鋳型核酸に置換する方法は、当技術分野で十分に確立されており、その一部を本明細書に記載する。例えば、超可変領域残基は、Kunkel法を用いて置換され得る。例えば、Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)を参照されたい。

【0204】

該オリゴヌクレオチドの配列は、変更される超可変領域残基のために設計された1つ以上のコドンセットを含む。コドンセットとは、所望のバリエーションアミノ酸をコードするために使用される異なるヌクレオチドトリプレット配列のセットである。コドンセットは、IUBコードに従って以下に示される通り、特定のヌクレオチドまたはヌクレオチドの等モル混合物を示す記号を用いて表すことができる。

IUBコード

G グアニン

A アデニン

T チミン

C シトシン

R (A または G)
Y (C または T)
M (A または C)
K (G または T)
S (C または G)
W (A または T)
H (A または C または T)
B (C または G または T)
V (A または C または G)
D (A または G または T) H
N (A または C または G または T)

10

【0205】

例えば、コドンセット DVK において、D は、ヌクレオチド A でも G でも T でもよく、V は、A でも G でも C でもよく、K は、G でも T でもよい。このコドンセットは、18 個の異なるコドンを提示することができ、アミノ酸 Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly、及び Cys をコードすることができる。

【0206】

オリゴヌクレオチドまたはプライマーセットは、標準的な方法を使用して合成され得る。オリゴヌクレオチドのセットは、例えば、固相合成によって合成することができ、該コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットのすべての可能な組み合わせを表し、かつ所望のアミノ酸群をコードする配列を含む。ある特定の位置に選択されたヌクレオチドの「縮重」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である。ある特定のコドンセットを有するかかるヌクレオチドのセットは、市販の核酸合成装置（例えば、Applied Biosystems, Foster City, Calif から入手可能）を使用して合成することができるか、または商業的に得ることができる（例えば、Life Technologies, Rockville, Md. 製）。したがって、特定のコドンセットを有する合成されたオリゴヌクレオチドのセットは、通常は、異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含み、その違いは、全配列内のコドンセットによって確立される。本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、可変ドメインの核酸鑄型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、クローニング目的のための制限酵素部位も含み得る。

20

30

【0207】

1つの方法では、バリエーションアミノ酸をコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチドによる突然変異誘発によって創出され得る。この技術は、当技術分野で周知であり、Zoller et al. Nucleic Acids Res. 10:6487-6504 (1987) によって記載されている。簡潔には、バリエーションアミノ酸をコードする核酸配列は、所望のコドンセットをコードするオリゴヌクレオチドセットを DNA 鑄型にハイブリダイズすることによって創出され、ここで、該鑄型は、可変領域の核酸鑄型配列を含むプラスミドの一本鎖形態である。ハイブリダイゼーション後、DNA ポリメラーゼを使用して該鑄型の二次相補鎖全体を合成し、これが結果として該オリゴヌクレオチドプライマーを組み込み、該オリゴヌクレオチドセットによって提供されるコドンセットを含む。

40

【0208】

一般に、少なくとも 25 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが使用される。最適なオリゴヌクレオチドは、該変異（複数可）をコードするヌクレオチド（複数可）のいずれかの側の鑄型に完全に相補的な 12~15 個のヌクレオチドを有する。これは、該オリゴヌクレオチドが、確実に該一本鎖 DNA 鑄型分子に適切にハイブリダイズするようにする。該オリゴヌクレオチドは、当技術分野で既知の技術、例えば、Crease et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978) によって記載されているものを使用して容易に合成される。

50

【0209】

該DNA鑄型は、バクテリオファージM₁₃ベクター（市販のM₁₃ mp 18及びM₁₃ mp 19ベクターが適する）のいずれかに由来するベクター、またはViera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)によって記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。したがって、変異させるDNAは、一本鎖鑄型を生成するために、これらのベクターの1つに挿入され得る。

【0210】

一本鎖鑄型の産生は、上記Sambrook et al.のセクション4.21~4.41に記載されている。天然のDNA配列を改変するため、該オリゴヌクレオチドを、適切なハイブリダイゼーション条件下で該一本鎖鑄型にハイブリダイズする。次いで、DNA重合酵素、通常はT7 DNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を添加して、オリゴヌクレオチドを合成のためのプライマーとして用いて該鑄型の相補鎖を合成する。したがって、ヘテロ二本鎖分子は、DNAの一方の鎖が遺伝子1の突然変異形態をコードし、他方の鎖（元の鑄型）が遺伝子1の天然の未改変の配列をコードするように形成される。このヘテロ二本鎖分子は、その後適切な宿主細胞、通常は、原核生物、例えば、E. coli JM101に形質転換される。細胞を成長させた後、それらをアガロースプレートにプレーティングし、32-リン酸で放射標識したオリゴヌクレオチドプライマーを使用してスクリーニングし、変異したDNAを含む細菌のコロニーを特定する。

【0211】

直前に記載した方法を、該プラスミドの両方の鎖が変異（複数可）を含むホモ二本鎖分子が創出されるように修正してもよい。該修正は、以下の通りである：該一本鎖オリゴヌクレオチドを、上記の一本鎖鑄型にアニールする。3つのデオキシリボヌクレオチド、すなわち、デオキシリボアデノシン（dATP）、デオキシリボグアノシン（dGTP）、及びデオキシリボチミジン（dTTP）の混合物を、dCTP-（aS）と呼ばれる修飾チオデオキシリボシトシン（Amershamから入手可能）と混合する。この混合物を、鑄型-オリゴヌクレオチド複合体に添加する。この混合物にDNAポリメラーゼを添加した後、変異した塩基以外は鑄型と同一のDNA鎖が生じる。さらに、この新たなDNA鎖は、dCTPの代わりにdCTP-（aS）を含み、これは、制限エンドヌクレアーゼ消化からそれを保護する役割を果たす。

【0212】

該二本鎖ヘテロ二本鎖の鑄型鎖に、適切な制限酵素でニックを入れた後、該鑄型鎖を、突然変異誘発部位（複数可）を含む領域を過ぎて、ExoIIIヌクレアーゼまたは別の適切なヌクレアーゼで消化することができる。反応をその後停止することにより、一部のみが一本鎖である分子が残る。次いで、4つすべてのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、ATP、及びDNAリガーゼの存在下、DNAポリメラーゼを使用して完全な二本鎖DNAホモ二本鎖を形成する。このホモ二本鎖分子を次いで適切な宿主細胞に形質転換することができる。

【0213】

前述したように、該オリゴヌクレオチドセットの配列は、該鑄型核酸にハイブリダイズする上で十分な長さのものであり、必ずしもではないが、制限酵素部位も含み得る。該DNA鑄型は、バクテリオファージM₁₃ベクターのいずれかに由来するベクター、またはViera et al. Meth. Enzymol., 153:3 (1987)によって記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成され得る。したがって、変異させるDNAは、一本鎖鑄型を生成するために、これらのベクターの1つに挿入される必要がある。一本鎖鑄型の産生は、上記Sambrook et al.のセクション4.21~4.41に記載されている。

【0214】

別の方法によれば、抗原結合は、抗体のヒト化の過程で、修復された超可変領域の選択

により復元され得る（2005年2月18日に出願された出願番号第11／061,841号参照）。該方法は、非ヒト超可変領域を、アクセプターフレームワークに組み込むこと、及びさらに、該アクセプターフレームワーク配列を改変することなく、1つ以上の超可変領域に1つ以上のアミノ酸置換を導入することを含む。別の方法として、該1つ以上のアミノ酸置換の導入は、該アクセプターフレームワーク配列の改変を伴ってもよい。

【0215】

別の方法によれば、ライブラリを、上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットを提供することによって生成することができ、各セットは、異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを有し、該異なる配列は、該オリゴヌクレオチドの配列内に提供されたコドンセットにより確立される。該上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットは、可変ドメイン鑄型核酸配列とともに、PCR産物の「ライブラリ」を生成するためのポリメラーゼ連鎖反応に使用され得る。該PCR産物は、他の関連するまたは関連しない核酸配列、例えば、ウイルスコートタンパク質及び二量体化ドメインに、確立された分子生物学技術を使用して融合され得ることから、「核酸カセット」と呼ばれ得る。

【0216】

該PCRプライマーの配列は、超可変領域の溶媒露出及び多様性に富む位置のために設計されたコドンセットの1つ以上を含む。上記のコドンセットとは、所望のバリエーションアミノ酸をコードするために使用される異なるヌクレオチドトリプレット配列のセットである。適切なスクリーニング／選択ステップを通じて選択された、所望の基準を満たす抗体選択物は、標準的な組み換え技術を使用して単離及びクローニングされ得る。

【0217】

抗体が抗原に対する高い結合親和性及び他の好ましい生物学的特性を保持してヒト化されることがさらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法によれば、ヒト化抗体は、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析過程によって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元コンフォメーション構造を例示及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検査により、該候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性の高い役割の分析、すなわち、該候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響する残基の分析が可能になる。このように、所望の抗体の特性、例えば、該標的抗原（複数可）に対する親和性の増加が達成されるように、FR残基を、該レシピエント及び取り込み配列から選択すること及び組み合わせることができる。概して、該超可変領域残基は、抗原結合への影響に直接、かつほとんど実質的に関与している。

【0218】

ヒト化抗GPC3抗体の様々な形態が企図される。例えば、該ヒト化抗体は、抗体断片、例えば、Fabでもよい。代替的に、該ヒト化抗体は、インタクトな抗体、例えば、インタクトなIgG抗体でもよい。

【0219】

ヒト化に代わるものとして、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化により、内因性の免疫グロブリン産生なしで、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生することが可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することができる。例えば、キメラ及び生殖細胞系列変異マウスにおける抗体重鎖連結領域（JH）遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体産生の完全阻害をもたらすと言われている。かかる生殖細胞系列変異マウスへのヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子アレイの移動は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)、Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)、Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993)、米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、第5,591,669号（すべてGenPharm）、第5,545,807号、及びWO 97/17852

を参照されたい。

【0220】

別の方法として、ファージ提示技術 (McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]) を使用して、インビトロで、免疫化されていないドナーからの免疫グロブリン可変 (V) ドメインの遺伝子レパートリーから、ヒト抗体及び抗体断片を産生することができる。この技術によれば、抗体Vドメインの遺伝子は、糸状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれか、例えば、M13またはfdにインフレームでクローニングされ、該ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として提示される。該糸状粒子は、該ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むため、該抗体の機能特性に基づく選択はまた、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択につながる。したがって、該ファージは、B細胞のいくつかの特性を再現する。ファージ提示は、例えば、Johnson, Kevin S, and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993) に概説される様々な様式で行うことができる。いくつかのV遺伝子断片源をファージ提示に用いることができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) は、免疫化マウスの脾臓由来のV遺伝子の小規模ランダムコンビナトリアルライブラリから、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、またはGriffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993) によって記載されている技術に基本的に従って、免疫化されていないヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構築することができ、また、抗原 (自己抗原を含む) の多様なアレイに対する抗体を単離することができる。米国特許第5,565,332号及び第5,573,905号も参照されたい。

10

20

【0221】

上記の通り、ヒト抗体はまた、活性化B細胞によってインビトロで生成してもよい (米国特許第5,567,610号及び第5,229,275号参照)。

【0222】

別の実施形態では、本開示の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。GPC3に対するかかるヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなくヒトの免疫系の一部を有するトランスジェニックまたは染色体移植 (transchromosomal) マウスを使用して生成することができる。これらのトランスジェニック及び染色体移植マウスは、本明細書ではそれぞれ、HuMAb Mouse (商標) 及びKM Mouse (商標) と呼ばれるマウスを含み、本明細書ではまとめて「ヒトIgマウス」と呼ばれる。HuMAb Mouse (商標) (Medarex, Inc.) は、再配列されていないヒト重鎖 (μ 及び γ) ならびに κ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座を、内因性 μ 及び κ 鎖遺伝子座を不活性化する標的変異とともに含む (例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474):856-859 参照)。したがって、該マウスは、マウスIgMまたは κ の発現の低下を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチ及び体細胞変異を受け、高親和性のヒトIgG κ モノクローナル抗体が生じる (Lonberg, N. et al. (1994)、上掲、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101 に概説、Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93、及びHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMAb Mouse (商標) の調製及び使用、ならびにかかるマウスが有するゲノム修飾は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295、Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5:647-656

30

40

50

、Tuail lon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724、Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123、Chen, L et al. (1993) EMBO J. 12:821-830、Tuail lon et al. , (1994) J. Immunol. 152:2912-2920、Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6:579-591、及びFishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851にさらに記載されている。これらのすべての内容は、参照により全体として具体的に本明細書に組み込まれる。さらに、米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,789,650号、第5,877,397号、第5,661,016号、第5,814,318号、第5,874,299号、及び第5,770,429号、すべてLonberg and Kay、米国特許第5,545,807号、Surani et al.、PCT公開第WO 92/03918号、第WO 93/12227号、第WO 94/25585号、第WO 97/13852号、第WO 98/24884号、及び第WO 99/45962号、すべてLonberg and Kay、ならびにPCT公開第WO 01/14424号、Korman et al.。別の実施形態では、本開示のヒト抗体は、導入遺伝子及び導入染色体にヒト免疫グロブリン配列を有するマウス、例えば、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入染色体を有するマウスを使用して増やすことができる。このマウスは、本明細書では、「KM Mouse (商標)」と呼ばれ、Ishida et al. のPCT公開第WO 02/43478に詳細に記載されている。

10

20

【0223】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的なトランスジェニック動物系が当技術分野で利用可能であり、それを本開示の抗GPC3抗体を増やすために使用することができる。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と呼ばれる代替的なトランスジェニック系を使用することができ、かかるマウスは、例えば、Kucheralapati et al. の米国特許第5,939,598号、第6,075,181号、第6,114,598号、第6,150,584号及び第6,162,963号に記載されている。

【0224】

30

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的な染色体移植動物系が当技術分野で利用可能であり、それを本開示の抗GPC3抗体を増やすために使用することができる。例えば、「TCマウス」と呼ばれるヒト重鎖導入染色体及びヒト軽鎖導入染色体の両方を有するマウスを使用することができ、かかるマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖及び軽鎖導入染色体を有するウシが、当技術分野で記載されており（例えば、Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894及びPCT出願第WO 2002/092812号）、それを本開示の抗GPC3抗体を増やすために使用することができる。

【0225】

40

4. 抗体断片

ある特定の状況では、全抗体ではなく抗体断片を使用することが有利である。より小さいサイズの断片により、迅速なクリアランスが可能になり、固形腫瘍へのアクセスが改善され得る。

【0226】

抗体断片の産生のために様々な技術が開発されている。従来、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解消化により得られていた（例えば、Morimoto et al. , Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)、及びBrennan et al. , Science 229:81 (1985) 参照）。しかしながら、これらの断

50

片は、現在、組み換え宿主細胞により直接産生され得る。Fab、Fv及びScFv抗体断片はすべて、E. coliで発現され、E. coliから分泌され得るため、これらの断片の容易な大量産生が可能になる。抗体断片は、上記の抗体ファージライブラリから単離され得る。別の方法として、Fab'-SH断片は、E. coliから直接回収することができ、化学的にカップリングしてF(ab')₂断片を形成することができる(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別のアプローチによれば、F(ab')₂断片は、組み換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含むインビボ半減期が延長したFab及びF(ab')₂断片が、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体断片を産生するための他の技術は、当業者には明らかであろう。他の実施形態では、最適な抗体は、一本鎖Fv断片(scFv)である。WO 93/16185、米国特許第5,571,894号、及び米国特許第5,587,458号を参照されたい。Fv及びsFvは、定常領域を欠くインタクトな結合部位を有する唯一の種であり、ひいては、これらは、インビボでの使用中の非特異的結合の低減に適している。sFv融合タンパク質は、sFvのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにエフェクタータンパク質の融合をもたらすように構築され得る。Antibody Engineering, ed. Borrebaeck、上掲を参照されたい。該抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されるように、「線状抗体」でもあり得る。

10

【0227】

1つの実施形態では、抗GPC3抗体由来のscFvは、CAR修飾免疫細胞、好ましくは、本明細書に開示するCAR-TまたはCAR-NK細胞で使用される。抗GPC3抗体断片に含まれるのは、CAR-TまたはCAR-NK細胞のキメラ抗原受容体で、GPC3腫瘍エピトープに対する標的化アームとして使用され得る抗GPC3抗体の部分(及び抗GPC3抗体の部分の組み合わせ、例えば、scFv)である。かかる断片は、必ずしもタンパク質分解断片というわけではなく、むしろ標的に対する親和性を付与することができるポリペプチド配列の部分である。

20

【0228】

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、本明細書に記載のGPC3タンパク質の2つの異なるエピトープに結合し得る。他のかかる抗体は、GPC3結合部位と別のタンパク質に対する結合部位を結合し得る。代替的に、抗GPC3アームは、細胞防御機構を該GPC3発現細胞に集中及び局在化させるために、白血球上の引き金分子、例えば、T細胞受容体分子(例えば、CD3)、またはIgGに対するFc受容体(FcγR)、例えば、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、及びFcγRIII(CD16)に結合するアームと結合され得る。二重特異性抗体もまた、GPC3を発現する細胞に細胞毒性薬を局所化させるために使用され得る。これらの抗体は、GPC3結合アーム、及び細胞毒性薬(例えば、サポリン、抗インターフェロン-α、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート、または放射性同位体ハプテン)に結合するアームを有する。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として調製され得る。

30

40

【0229】

WO 96/16673は、二重特異性抗ErbB2/抗FcγRIII抗体を記載しており、米国特許第5,837,234号は、二重特異性抗ErbB2/抗FcγRI抗体を開示している。二重特異性抗ErbB2/Fcα抗体は、WO 98/02463に示されている。米国特許第5,821,337号は、二重特異性抗ErbB2/抗CD3抗体を教示している。二重特異性抗体を作製する方法は、当技術分野で知られている。完全長二重特異性抗体の従来の産生は、2本の免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいており、該2本の鎖は、異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のラ

50

ンダムな組み合わせのため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）が可能性のある 10 個の異なる抗体分子の混合物を産生し、それらのうちの 1 つのみが正しい二重特異性構造を有する。

【0230】

通常はアフィニティークロマトグラフィーのステップにより行われる正しい分子の精製は、やや煩雑であり、その生成物の収率は低い。同様の手順が、WO 93/08829、及び Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

【0231】

6. エフェクター機能の操作

本発明の抗体を、エフェクター機能に関して、例えば、該抗体の抗体依存性細胞介在性細胞傷害性 (ADCC) 及び／または補体依存性細胞傷害性 (CDC) を増強するように修飾することが望ましい場合がある。これは、1 つ以上のアミノ酸置換を該抗体の Fc 領域に導入することによって達成され得る。

【0232】

代替的に、またはさらに、システイン残基（複数可）を該 Fc 領域に導入し、それによって、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させてもよい。このように生成されたホモ二量体抗体は、内在化能力の改善、及び／または補体介在性細胞殺傷及び抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) の増加を有し得る。Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) 及び Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照されたい。抗腫瘍活性が向上したホモ二量体抗体はまた、Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993) に記載のヘテロ二官能性架橋剤を使用しても調製され得る。代替的に、二重 Fc 領域を有する抗体を操作することができ、該抗体は、それによって向上した補体溶解及び ADCC 能力を有し得る。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。該抗体の血清半減期を延長するために、例えば、米国特許第 5,739,277 号に記載のように、サルベージ受容体結合エピトープを該抗体（特に、抗体断片）に組み込んでもよい。本明細書で使用される、「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、IgG 分子のインビボ血清半減期の延長に関与する IgG 分子（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4）の Fc 領域のエピトープを指す。

【0233】

D. 抗体を作製する特定の方法

1. 所望の特性を有する抗GPC3抗体のスクリーニング

GPC3 ポリペプチドに結合する抗体を生成するための技術は、上記で説明されている。例えば、本発明は、GPC3 抗体（これは、本明細書に定義する通り、その完全長及び断片を含む）の作製方法であって、該方法は、適切な宿主細胞で該抗体（またはその断片）をコードする本発明の組み換えベクターを発現させること、及び該抗体を回収することを含む。所望により、ある特定の生物学的特性を有する抗体をさらに選択してもよい。

【0234】

本発明の抗GPC3抗体の成長阻害効果は、当技術分野で既知の方法によって、例えば、GPC3 ポリペプチドを、内因的に、またはGPC3 遺伝子のトランスフェクション後に発現する細胞を使用して評価され得る。例えば、適切な腫瘍細胞株及びGPC3 トランスフェクト細胞を、様々な濃度の本発明の抗GPC3 モノクローナル抗体で数日間（例えば、2～7日間）処理し、クリスタルバイオレットまたはMTTで染色しても、他の比色アッセイによって分析してもよい。増殖を測定する別の方法は、本発明の抗GPC3抗体の存在下又は非存在下で処理した細胞による³H-チミジンの取り込みを比較することによる。処理後、該細胞を回収し、DNAに取り込まれた放射能の量をシンチレーションカウンタで定量する。適切な陽性対照は、その細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体での選択された細胞株の処理を含む。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は

10

20

30

40

50

、当技術分野で知られる様々な方法で特定され得る。該腫瘍細胞は、GPC3ポリペプチドを過剰発現するものであり得る。該抗GPC3抗体は、GPC3発現腫瘍細胞の細胞増殖を、未処理の腫瘍細胞と比較して、インビトロまたはインビボで約25～100%、より好ましくは、約30～100%、さらにより好ましくは、約50～100%または70～100%、1つの実施形態では、約0.5～30 μ g/mlの抗体濃度で阻害する。成長阻害は、細胞培養において約0.5～30 μ g/mlまたは約0.5nM～200nMの抗体濃度で測定することができ、ここで、該成長阻害は、該抗体への該腫瘍細胞の曝露の1～10日後に特定される。該抗GPC3抗体を約1 μ g/kg～約100mg/kg体重で投与することによって、腫瘍サイズの減少または腫瘍細胞増殖の減少が、該抗体の最初の投与から約5日～3ヶ月以内、好ましくは、約5～30日以内にもたらされる場合に、該抗体は、インビボで成長阻害性である。

10

【0235】

細胞死を誘発する抗GPC3抗体を選択するため、例えば、ヨウ化プロピジウム (PI)、トリパンブルーまたは7AADの取り込みによって示される膜の完全性の損失が、対照に対して評価され得る。PIの取り込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の非存在下で行うことができる。GPC3ポリペプチド発現腫瘍細胞を、培地のみ、または適切な抗GPC3抗体 (例えば、約10 μ g/ml) を含む培地でインキュベートする。該細胞は、3日間インキュベートされる。各処理後に細胞を洗浄し、35mmのストレーナー付きの12x75チューブに分け (1本あたり1ml、処理群ごとに3本)、細胞集塊を除去した。次いで、チューブにPI (10 μ g/ml) を加える。サンプルは、FACS CAN (登録商標) フローサイトメーター及びFACS CONVERT (登録商標) Cell Questソフトウェア (Becton Dickinson) を使用して分析され得る。PIの取り込みにより特定される、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗GPC3抗体は、細胞死を誘発する抗GPC3抗体として選択され得る。

20

【0236】

目的の抗体が結合したGPC3ポリペプチドのエピトープに結合する抗体をスクリーニングするため、通常のカロス・ブロッキングアッセイ、例えば、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) に記載のものを行うことができる。このアッセイは、試験抗体が既知の抗GPC3抗体と同じ部位またはエピトープに結合するかどうかを特定するために使用され得る。代替的に、またはさらに、エピトープマッピングを当技術分野で知られる方法によって行うことができる。例えば、該抗体配列に、例えば、アラニンスキャニングによって突然変異を起こさせ、接触残基を特定することができる。該突然変異抗体は最初に、正しい折り畳みを確保するため、ポリクローナル抗体との結合に関して試験される。異なる方法では、GPC3ポリペプチドの異なる領域に対応するペプチドを、試験抗体または試験抗体及び特徴付けられたもしくは既知のエピトープを有する抗体との競合アッセイで使用するができる。

30

【0237】

簡潔には、1つの態様では、本開示は、本開示のIHC IVDアッセイ及び/または本明細書に開示する任意の他の方法に使用され得る薬剤のエピトープを特定するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、該薬剤は、204である。エピトープは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸を固有の空間的コンフォメーションで含むことができる。エピトープは、隣接アミノ酸、またはタンパク質の第3次折り畳みによって並列した非隣接アミノ酸の両方から形成され得る。隣接アミノ酸から形成されたエピトープは、通常、変性溶媒への曝露時に保持され得るが、第3次折り畳みによって形成されたエピトープは、通常、変性溶媒での処理時に失われ得る。

40

【0238】

エピトープマッピングは、線状または非線状の不連続アミノ酸配列 (複数可)、すなわ

50

ち、エピトープを特定するために行うことができ、これは、目的の活性化剤、例えば、該 204 抗体によって認識される。エピトープマッピングのための一般的なアプローチは、目的の抗体またはリガンドによって認識される完全長ポリペプチド配列、及び様々な断片、すなわち、該ポリペプチド配列の切断型の、一般に異種発現系における発現を必要とし得る。これらの様々な組み換えポリペプチド配列またはその断片（例えば、N 末端タンパク質（例えば、GFP）と融合させたもの）を次いで、目的の抗体またはリガンドが、該ポリペプチド配列の切断型の 1 つ以上に結合することが可能かどうかを判断するために使用することができる。重複するアミノ酸領域を有する組み換えポリペプチド配列の反復的な切断及び生成を使用して、目的の抗体によって認識されるポリペプチド配列の領域を特定することが可能である（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996) 参照）。該方法は、薬剤、例えば、目的の抗体が、エピトープライブラリ、例えば、膜支持体上の合成ペプチドアレイ、コンビナトリアルファージ提示ペプチドライブラリに由来するエピトープライブラリから再創出された配列に結合する能力に依存している。該エピトープライブラリはその結果、抗体に対してスクリーニングされる様々な可能性を提供する。さらに、エピトープの 1 つ以上の残基を標的とする部位特異的突然変異誘発、またはランダム A l a スキャンを行って、エピトープの同一性を確認することができる。

10

【0239】

GPC3 の様々な可能な組み換えを cDNA 構築物として合成的に設計し、それらを適切な系で発現させることによって、エピトープのライブラリを創出することができる。例えば、複数の GPC3 遺伝子セグメント（例えば、N 末端アルファ鎖に対応する様々な配列、C 末端ベータ鎖に対応する様々な配列等）を合成的に設計することができる。別の方法として、選択された配列を、合成遺伝子として順序付け、適切なベクターにクローニングすることもできる。他の場合には、ヒト正常及び悪性組織、好ましくは、GPC3 が正常組織よりも高いレベルで発現される悪性組織から抽出された全 RNA から、様々な GPC3 配列を増幅することができる。

20

【0240】

該宿主系は、任意の適切な発現系、例えば、293 細胞、昆虫細胞、または適切なインビトロ翻訳系でよい。宿主系にトランスフェクトされた合成的に設計された GPC3 遺伝子セグメントの複数の様々な可能な組み換えにより、例えば、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、または 90 を超える GPC3 の可能な対合の組み合わせが提供され得る。先に記載したライブラリのエピトープのうちの 1 つに対する薬剤の結合は、標識抗体、例えば、204 と、該ライブラリのエピトープと接触させること及び該標識からのシグナルを検出することによって検出され得る。

30

【0241】

エピトープマッピングの場合、計算アルゴリズムもまた開発されており、これらは、コンフォメーション不連続エピトープをマップすることが示されている。コンフォメーションエピトープは、アミノ酸の空間的コンフォメーションを、例えば、X 線結晶構造解析及び 2 次元核磁気共鳴を含めた方法で特定することによって同定され得る。いくつかのエピトープマッピング法、例えば、抗原抗体複合体の結晶の X 線分析は、エピトープの原子分解を与えることができる。他の場合には、エピトープマッピングのための計算コンビナトリアル法を用いて、該抗体、例えば、204 抗体の配列に基づいて潜在のエピトープをモデル化することができる。かかる場合、該抗体の抗原結合部分を配列決定し、計算モデルを使用して該抗体を再構築し、その潜在的な結合部位を予測する。

40

【0242】

場合によっては、本開示は、204、またはその抗原結合断片によって特異的に認識される GPC3 のエピトープを特定する方法を提供し、該方法は、(a) GPC3 からエピトープのライブラリを調製すること、(b) 該エピトープのライブラリを該 204 抗体、またはその抗原結合断片と接触させること、及び (b) 該エピトープのライブラリの中の

50

該抗体によって結合される少なくとも1つのエピトープのアミノ酸配列を特定することを含む。1つの例では、該抗体は、固体支持体に結合される。該エピトープのライブラリは、GPC3の連続及び不連続エピトープに対応する配列を含み得る。場合によっては、該エピトープのライブラリは、GPC3からの約10アミノ酸～約30アミノ酸長、約10アミノ酸～約20アミノ酸長、または約5アミノ酸～約12アミノ酸長に及ぶ断片を含む。場合によっては、該204抗体、またはその抗原結合断片は標識され、該標識は、放射性分子、発光分子、蛍光分子、酵素、またはビオチンである。

【0243】

GPC3のウェスタンブロッティング及びプロテアーゼ切断に依存するハイレベルエピトープマッピング試験が、以下の実施例2に記載されている。簡潔には、GPC3のプロテアーゼ切断（例えば、ディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ、またはADAM）の後、サンプルを、対応するGPC3エピトープが既知の抗体（例えば、GC33）、及び対応するGPC3エピトープが未知の抗体（例えば、204）を使用してウェスタンブロッティング分析に供する。異なる抗体によるプロテアーゼ切断GPC3断片の特異的認識は、該標的抗体の潜在的な結合部位に関する情報を提供することができ、上記のエピトープマッピング法における出発点として使用され得る。

【0244】

さらに、候補抗体は、以下のうちの1つ以上を使用して、機能についてもスクリーニングされ得る：転移の阻害についてのインビボスクリーニング、インビトロ法による走化性の阻害（例えば、Huntsman et al., U.S. 2010/0061978、参照により全体として本明細書に組み込まれる）、血管新生の阻害、腫瘍成長の阻害、及び腫瘍サイズの減少。

【0245】

2. 特定のリブラリスクリーニング法

本発明の抗GPC3抗体は、所望の活性（複数可）を備えた抗体をスクリーニングするためのコンビナトリアルライブラリを使用して作製され得る。例えば、ファージ提示ライブラリを生成し、かかるライブラリを、所望の結合特性を有する抗体についてスクリーニングするための様々な方法が当技術分野で知られている。かかる方法は、概して、Hoo genboom et al. (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ)、及びある特定の実施形態では、Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093に記載されている。

【0246】

原則として、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質に融合した抗体可変領域（Fv）の様々な断片を提示するファージを含むファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。かかるファージライブラリは、所望の抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによってパニングされる。所望の抗原に結合することが可能なFv断片を発現するクローンは、該抗原に吸着し、ひいては該ライブラリ内の非結合クローンから分離される。その後、該結合クローンは、抗原から溶出され、さらなる抗原吸着／溶出サイクルによってさらに濃縮され得る。本発明の抗GPC3抗体のいずれも、目的のファージクローンを選択するのに適した抗原スクリーニング手順を設計し、続いて、目的のファージクローンからFv配列、及びKabata et al., *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域（Fc）配列を使用した、完全長抗GPC3抗体クローンの構築によって得ることができる。

【0247】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合ドメインは、約110個のアミノ酸の2つの可変（V）領域から形成され、1つが各々軽（VL）鎖及び重（VH）鎖由来であり、両

方が3つの超可変ループ（HVR）または相補性決定領域（CDR）を提示する。可変ドメインは、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載されるように、VH及びVLが短い柔軟性ペプチドを介して共有結合される一本鎖Fv（scFv）断片として、またはそれらが各々定常ドメインに融合して非共有結合的に相互作用するFab断片としてのいずれかで、ファージ上に機能的に提示され得る。本明細書で使用される、scFvをコードするファージクローン及びFabをコードするファージクローンは、集合的に「Fvファージクローン」または「Fvクローン」と呼ばれる。

【0248】

VH遺伝子及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって別々にクローニングし、ファージライブラリ内でランダムに組み換えることができ、その後、これらを、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載の通りに抗原結合クローンについて検索することができる。免疫化供給源からのライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、免疫原に対して高親和性の抗体を提供する。別の方法として、Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)に記載の通り、ナイーブレパートリーをクローニングして、免疫化をすることなく、広範囲の非自己及び自己抗原にも対するヒト抗体の単一源を提供することができる。最後に、ナイーブライブラリはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)に記載の通り、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロで再配列を達成することによって、合成的に作製することができる。

【0249】

ある特定の実施形態では、マイナーコートタンパク質piliへの融合によって抗体断片を提示するために、糸状ファージが使用される。該抗体断片は、例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載の通り、VH及びVLドメインが柔軟性ポリペプチドスパーサーによって同じポリペプチド鎖で接続される一本鎖Fv断片として、または、例えば、Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)に記載の通り、一方の鎖がpiliに融合され、他方が細菌宿主細胞ペリプラズムに分泌され、このペリプラズムにおいて、Fabコートタンパク質構造のアセンブリが野生型コートタンパク質のうちのいくつかを提示することによってファージ表面に提示されるようになるFab断片として提示され得る。

【0250】

一般に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒトまたは動物から採取される免疫細胞から得られる。抗GPC3クローンにバイアスがかかったライブラリが所望される場合、対象をGPC3で免疫化して抗体反応を生成し、脾細胞及び／または循環B細胞、他の末梢血リンパ球（PBL）をライブラリの構築のために回収する。好ましい実施形態では、抗GPC3クローンにバイアスがかかったヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、GPC3免疫化によりGPC3に対するヒト抗体を産生するB細胞が生じるように、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する（及び機能的内因性抗体産生系を欠く）トランスジェニックマウスにおいて抗GPC3抗体反応を生成させることによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの生成は、以下に記載される。

【0251】

抗GPC3反応性細胞集団のさらなる濃縮は、GPC3特異的膜結合型抗体を発現するB細胞の単離に適したスクリーニング手順を使用することによって、例えば、GPC3アフィニティークロマトグラフィー、または細胞の蛍光色素標識GPC3への吸着とその後のフロー活性化細胞分類（FACS）を使用した細胞分離によって達成され得る。

【0252】

10

20

30

40

50

別の方法として、免疫化されていないドナー由来の脾細胞及び／またはB細胞または他のPBLの使用により、可能な抗体レパートリーの表示が向上し、GPC3が抗原性ではない任意の動物（ヒトまたは非ヒト）種を使用した抗体ライブラリの構築も可能になる。インビトロ抗体遺伝子構築を組み込むライブラリの場合、幹細胞を対象から採取し、再配列されていない抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。目的の免疫細胞は、様々な動物種、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、オオカミ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマ、及び鳥類等から取得され得る。

【0253】

抗体可変遺伝子セグメント（VH及びVLセグメントを含む）をコードする核酸は、目的の細胞から回収され、増幅される。再配列されたVH及びVL遺伝子ライブラリの場合、所望のDNAは、Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989)に記載の通り、ゲノムDNAまたはmRNAをリンパ球から単離した後、再配列されたVH及びVL遺伝子の5'及び3'末端に適合しているプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することにより得ることができる。該V遺伝子は、Orlandi et al. (1989)及びWard et al., Nature, 341:544-546 (1989)に記載の通り、成熟Vドメインをコードするエクソンの5'末端でバックプライマー、及びJ-セグメント内でフォワードプライマーを用いて、cDNA及びゲノムDNAから増幅され得る。しかしながら、cDNAからの増幅の場合、バックプライマーはまた、Jones et al., Biotechnol., 9:88-89 (1991)に記載の通り、リーダーエクソンに拠点を置くことができ、フォワードプライマーは、Sastri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989)に記載の通り、定常領域内に拠点を置くことができる。相補性を最大限に生かすために、Orlandi et al. (1989)またはSastri et al. (1989)に記載の通り、縮重がプライマーに組み込まれ得る。ある特定の実施形態では、例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)の方法に記載の通り、またはOrum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993)の方法に記載の通り、ライブラリの多様性は、各V遺伝子ファミリーを標的とするPCRプライマーを使用して、当該免疫細胞核酸サンプルに存在するすべての使用可能なVH及びVL配列を増幅することによって最大にされる。増幅されたDNAの発現ベクターへのクローニングの場合、希少制限部位が、Orlandi et al. (1989)に記載の通り、一端におけるタグとして、または、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)に記載の通り、タグ付けされたプライマーでのさらなるPCR増幅によってPCRプライマー内に導入され得る。

【0254】

合成的に再配列されたV遺伝子のレパートリーは、インビトロでV遺伝子セグメントから誘導され得る。ほとんどのヒトVH遺伝子セグメントがクローニング及び配列決定され（Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992)に報告されている）、マッピングされており（Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993)に報告されている）、これらクローニングされたセグメント（HI及びH2ループの主なコンフォメーションをすべて含む）は、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)に記載の通り、多様な配列及び長さのH3ループをコードするPCRプライマーで多様なVH遺伝子レパートリーを生成するために使用され得る。VHレパートリーは、Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992)に記載の通り、単一の長さの長いH3ループにすべての配列多様性を集中して作製され得る。ヒトVK及びvλセグメントは、クローニング及び配列決定されており（Williams and Win

10

20

30

40

50

ter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993) に報告されている)、それらを使用して、合成軽鎖レパートリーを作製することができる。合成 V 遺伝子レパートリーは、VH 及び VL フォールドの範囲ならびに L3 及び H3 の長さに基づいて、かなりの構造多様性の抗体をコードする。V 遺伝子をコードする DNA の増幅後、生殖系列 V 遺伝子セグメントが、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) の方法に従ってインビトロで再配列され得る。

【0255】

抗体断片のレパートリーは、いくつかの方法で VH 及び VL 遺伝子レパートリーを組み合わせることにによって構築され得る。各レパートリーは、異なるベクターに創出することができ、該ベクターは、インビトロで、例えば、Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993) に記載の通りに、またはインビボで、コンビナトリアル感染、例えば、Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993) に記載の loxP 系により組み換えることができる。該インビボでの組み換えアプローチは、Fab 断片の二本鎖特性を利用して、E. coli の形質転換効率によるライブラリサイズの制限を克服する。ナীবVH 及び VL レパートリーは、別々に、すなわち、一方がファージミドに、他方がファージベクターにクローニングされる。その後、これら 2 つのライブラリを、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせ、その結果、各細胞は異なる組み合わせを含み、ライブラリサイズは、存在する細胞の数 (約 10¹² クローン) のみにによって制限される。両ベクターは、インビボ組み換えシグナルを含み、該 VH 及び VL 遺伝子は、単一のレプリコンに組み換えられ、ファージビリオンに共パッケージングされる。これらの巨大なライブラリは、良好な親和性 (K_d^{-1} 約 10^{-8} M) の多数の多様な抗体を提供する。

【0256】

別の方法として、該レパートリーを、同じベクターに、例えば、Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991) に記載の通りに、連続的にクローニングしてもよいし、例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) PCR に記載の通り、PCR によるアセンブリ後にクローニングしてもよい。PCR アセンブリを使用して、VH 及び VL DNA を、柔軟性ペプチドスパーサーをコードする DNA と連結して、一本鎖 Fv (scFv) レパートリーを形成することもできる。さらに別の技術では、Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992) に記載の通り、「細胞内 PCR アセンブリ」を使用して、PCR によってリンパ球内の VH 及び VL 遺伝子を組み合わせた後、連結された遺伝子のレパートリーをクローニングする。

【0257】

ナীবライブラリ (天然または合成のいずれか) によって産生される抗体は、中程度の親和性 (K_d^{-1} 約 $10^6 \sim 10^7$ M⁻¹) を有するものであり得るが、親和性成熟は、Winter et al. (1994)、上掲に記載の通り、二次ライブラリを構築し、それから再選択することによってインビトロで再現され得る。例えば、変異は、Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) の方法または Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992) の方法において、エラープローンポリメラーゼを使用してインビトロでランダムに導入され得る (Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989) に報告されている)。さらに、親和性成熟は、選択された個別の Fv クローンにおいて、1 つ以上の CDR をランダムに変異させることによって、例えば、目的の CDR に及ぶランダム配列を有するプライマーでの PCR を使用し、より高い親和性のクローンについてスクリーニングすることによって行われ得る。WO 9607754 (1996 年 3 月 14 日公開) は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域における変異誘発を誘導して、軽鎖遺伝子のライブラリを創出するための方法

について記載している。別の有効なアプローチは、Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載の通り、免疫化されていないドナーから得た天然に存在するVドメインバリエーションのレパートリーでのファージ提示によって選択されたVHまたはVLドメインを組み換え、数回の鎖リシャッフリングでより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術により、約 10^{-9} M以下の親和性を有する抗体及び抗体断片の産生が可能になる。

【0258】

該ライブラリのスクリーニングは、当技術分野で知られる様々な技術によって達成され得る。例えば、GPC3を、吸着プレートのウェルをコーティングするために使用すること、または吸着プレートに固定された宿主細胞で発現させること、または細胞分類で使用する

10

【0259】

該ファージライブラリサンプルを、固定化GPC3と、該ファージ粒子の少なくとも一部分への該吸着体の結合に適した条件下で接触させる。通常、pH、イオン強度、温度等を含めた条件は、生理学的条件を再現するように選択される。該固相に結合したファージを洗浄し、次いで、酸で、例えば、Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)に記載の通りに、もしくはアルカリで、例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載の通りに、またはGPC3抗原競合により、例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)の抗原競合法と同様の手順で溶出する。ファージは、1回の選択で20~1,000倍に濃縮され得る。さらに、濃縮されたファージを、細菌培養中で成長させ、さらなる選択回に供することができる。

20

【0260】

選択の効率は、洗浄の過程での解離速度、及び単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原に結合し得るかどうかを含めた多くの要因に依存する。高い解離速度（及び弱い結合親和性）を有する抗体は、短時間の洗浄、多価ファージ提示及び固相での抗原の高コーティング密度の使用によって保持され得る。該高密度は、多価相互作用を介して該ファージを安定させるだけでなく、解離したファージの再結合にも有利に働く。低い解離速度（及び良好な結合親和性）を有する抗体の選択は、Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)及びWO 92/09690に記載の通り、長時間の洗浄及び一価ファージ提示、ならびにMarks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載の通り、抗原の低コーティング密度の使用によって促進され得る。

30

【0261】

GPC3に対して異なる親和性を有するファージ抗体間での選択は、わずかに異なる親和性しか有しない場合であっても可能である。しかしながら、選択された抗体のランダム変異（例えば、いくつかの親和性成熟技術で行われる）により、多くの変異体が生じる可能性があり、そのほとんどが抗原に結合し、いくつかが高親和性を有する。GPC3を制限することにより、希少な高親和性ファージを競合で選び出すことができる。すべての高親和性変異体を保持するため、ファージを過剰なビオチン化GPC3とともにインキュベートすることができるが、該ビオチン化GPC3は、GPC3に対する目的のモル親和定数より低いモル濃度を使用する。その後、該高親和性結合ファージは、ストレプトアビジンコート常磁性ビーズによって捕捉され得る。かかる「平衡捕捉」により、親和性が低い大過剰のファージから、親和性がわずか2倍の変異体クローンの単離を可能にする感度で、選択されるべき抗体の結合親和性によるそれらの選択が可能になる。固相に結合したファージの洗浄に使用される条件は、解離速度に基づいて区別するために操作される場合もある。

40

50

【0262】

抗GPC3クローンは、活性に基づいて選択される場合もある。ある特定の実施形態では、本発明は、天然にGPC3を発現する生細胞に結合する抗GPC3抗体を提供する。1つの実施形態では、本発明は、GPC3リガンドとGPC3の間の結合をブロックするが、GPC3リガンドと二次タンパク質の間の結合はブロックしない抗GPC3抗体を提供する。かかる抗GPC3抗体に対応するFvクローンは、(1)上記のファージライブラリから抗GPC3クローンを単離すること、及び任意に、単離したファージクローンの集団を、適切な細菌宿主内で成長させることによって、該集団を増幅すること、(2)それぞれ、ブロッキング及び非ブロッキング活性が所望されるGPC3及び二次タンパク質を選択すること、(3)該抗GPC3ファージクローンを、固定化GPC3に吸着させること、(4)過剰量の該二次タンパク質を使用して、該二次タンパク質の結合決定基と重複するまたはそれと共有されるGPC3結合決定基を認識する任意の不要なクローンを溶出すること、及び(5)ステップ(4)の後に吸着されたままのクローンを溶出することによって選択され得る。任意に、該所望のブロッキング／非ブロッキング特性はさらに、本明細書に記載の選択手順を1回以上繰り返すことによって濃縮され得る。

10

【0263】

本発明のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体またはファージ提示FvクローンをコードするDNAは、従来の手順を使用して容易に単離及び配列決定される(例えば、目的的重鎖及び軽鎖コード領域を、ハイブリドーマまたはファージDNA鑄型から特異的に増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用することによって)。単離後、該DNAを発現ベクターに配することができ、これをその後宿主細胞、例えば、他の場合には免疫グロブリンタンパク質を産生しないE. coli細胞、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞にトランスフェクトして、該組み換え宿主細胞における所望のモノクローナル抗体の合成が得られる。抗体をコードするDNAの細菌における組み換え発現に関する総説記事としては、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs., 130:151(1992)が挙げられる。

20

【0264】

本発明のFvクローンをコードするDNAは、重鎖及び／または軽鎖定常領域をコードする既知のDNA配列と組み合わせ(例えば、適切なDNA配列は、Kabata et al., 上掲から得ることができる)、完全長または部分長の重鎖及び／または軽鎖をコードするクローンを形成することができる。IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEの定常領域を含めた任意のアイソタイプの定常領域をこの目的のために使用することができること、及びかかる定常領域が任意のヒトまたは動物種から取得され得ることが理解されよう。ある動物(例えば、ヒト)種の可変ドメインDNAから誘導され、その後、別の動物種の定常領域DNAに融合されて、「ハイブリッド」完全長重鎖及び／または軽鎖のコード配列(複数可)を形成するFvクローンは、本明細書で使用される「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。ある特定の実施形態では、ヒト可変DNAから誘導されるFvクローンは、ヒト定常領域DNAに融合され、完全長または部分長ヒト重鎖及び／または軽鎖のコード配列(複数可)を形成する。

30

40

【0265】

ハイブリドーマに由来する抗GPC3抗体をコードするDNAは、例えば、ハイブリドーマクローンに由来する相同マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することによっても修飾され得る(例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)の方法の通り)。ハイブリドーマまたはFvクローン由来の抗体または断片をコードするDNAは、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列のすべてまたは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することによってさらに修飾され得る。この方法で、本発明のFvクローンまたはハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有する「キ

50

メラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

【0266】

3. CAR T細胞を用いた抗体の生成

本発明の抗GPC3抗体は、所望の活性（複数可）を備えた抗体をスクリーニングするためのCAR T細胞プラットフォームを使用して作製され得る。キメラ抗原受容体（CAR）は、膜貫通及び細胞質シグナル伝達ドメインに結合した細胞外抗原認識ドメイン（通常は一本鎖可変断片（scFv）抗体）から構成される。Alvarez-Vallina, L., Curr Gene Ther 1:385-397 (2001)。CARによる認識は、細胞表面で発現される腫瘍関連抗原（TAA）を、エフェクター機能の動員ポイントに変換し、エフェクター細胞の主要組織適合遺伝子複合体依存性の活性化の目的に対処する。第一世代のCARは、scFvベースのTAA結合ドメインと、通常は、T細胞受容体（TCR）／CD3複合体のζ鎖または一部のFc受容体に関連するγ鎖のいずれかに由来する細胞質シグナル伝達ドメインとの融合によって構築された。Gross, G. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:10024-10028 (1989)。TCR ζのシグナル伝達領域を、T細胞共刺激受容体であるCD28、4-1BB（CD137）またはOX40（CD134）由来のシグナル伝達ドメインを直列に含む第二世代のCAR（CARv2）も開発されている。Sanz, L. et al., Trends Immunol 25:85-91 (2004)。抗原に遭遇すると、遺伝的に伝達されたCARの相互作用によりエフェクター機能が誘発され、腫瘍細胞の細胞溶解が媒介され得る。該CARアプローチの有用性及び有効性は、様々な動物モデル、及びがん患者の治療のためのCARベースの遺伝子操作されたTリンパ球を使用した現在進行中の臨床試験において実証されている。Lipowska-Bhalla, G. et al., Cancer Immunol Immunother 61:953-962 (2012)。CARは、適切な抗体が存在する任意の天然細胞外抗原に対するエフェクター細胞の標的化を可能にする。操作された細胞は、タンパク質だけでなく、炭水化物及び糖脂質腫瘍抗原等の構造にも標的化され得る。Mezzanica, D. et al., Cancer Gene Ther 5:401-407 (1998)、Kershaw, MH. et al., Nat Rev Immunol 5:928-940 (2005)。

【0267】

組み換え抗体の生成のための現在の方法は、主に精製されたタンパク質の使用に基づいている。Hoogenboom, H. R. et al., Nat Biotechnol 23:1105-1116 (2005)。しかしながら、Tリンパ球の機能を活用する哺乳類細胞ベースの抗体提示プラットフォームが最近になって記載されている。Alonso-Camino et al, Molecular Therapy Nucleic Acids (2013) 2, e93。CAR介在性のシグナル伝達の一部としてのTリンパ球の表面での抗体の提示は、理想的には、活性化マーカーの表面発現に起因して、抗原-抗体相互作用を細胞表現型の明らかな変化に連結し得る。Alonso-Camino, V. et al., PLoS ONE 4:e7174 (2009)。TAAを認識するscFvベースのCARを使用することによって、CAR介在性の活性化をCD69+ T細胞の蛍光活性化細胞分類（FACS）と組み合わせることで、表面のTAAに対する結合剤を、2回の後で少なくとも 10^3 倍の濃縮係数で単離することが可能になり、TAA特異的CARを発現するT細胞の均質集団がもたらされることが実証された。Alonso-Camino, V, et al., PLoS ONE 4:e7174 (2009)。

【0268】

E. 抗GPC3抗体バリエント及び修飾

1. バリエント

本明細書に記載の抗GPC3抗体に加えて、抗GPC3抗体バリエントが調製され得ることが企図される。抗GPC3抗体バリエントは、コードDNAに適切なヌクレオチド変化を導入すること、及び／または所望の抗体またはポリペプチドの合成によって調製され

得る。当業者には、アミノ酸の変化により、グリコシル化部位の数または位置を変更すること、または膜アンカー特性を変更すること等、該抗GPC3抗体の翻訳後プロセスが変更され得ることが理解されよう。

【0269】

本明細書に記載の抗GPC3抗体の変動は、例えば、保存的及び非保存的変異に関する技術及びガイドラインのいずれか、例えば、米国特許第5,364,934号に記載のものを使用して作り出され得る。変動は、当該抗体またはポリペプチドをコードする1つ以上のコドンの置換、欠失または挿入でよく、それが、天然配列の抗体またはポリペプチドと比較したアミノ酸配列の変化をもたらす。任意に、該変動は、抗GPC3抗体のドメインの1つ以上において、少なくとも1つのアミノ酸を任意の他のアミノ酸で置換することによる。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を及ぼすことなく挿入、置換、または削除され得るかを判断するための指針は、該抗GPC3抗体の配列を、既知の相同タンパク質分子のものと比較し、相同性が高い領域になされるアミノ酸配列の変化の数を最小限に抑えることによって見出され得る。アミノ酸置換は、1つのアミノ酸を、類似の構造及び／または化学的特性を有する別のアミノ酸で置き換えた結果、例えば、セリンによるロイシンの置換、すなわち、保存的アミノ酸置換であり得る。挿入または欠失は、任意に、約1～5アミノ酸に及び得る。許容される変動は、アミノ酸の挿入、欠失または置換を当該配列中に系統的に行うこと、及び得られたバリエーションを、完全長または成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって決定され得る。

【0270】

抗GPC3抗体断片を本明細書で提供する。かかる断片は、N末端またはC末端で切断される場合もあれば、内部の残基を、例えば、完全長天然抗体またはタンパク質と比較して欠いている場合もある。ある特定の断片は、該抗GPC3抗体の所望の生物学的活性に不可欠ではないアミノ酸残基を欠いている。

【0271】

抗GPC3抗体断片は、多くの従来技術のいずれかによって調製され得る。所望のペプチド断片は、化学的に合成される場合もある。代替的なアプローチは、抗体またはポリペプチド断片を、酵素消化によって、例えば、当該タンパク質を、特定のアミノ酸残基によって規定される部位でタンパク質を切断することが既知の酵素で処理することによって、または当該DNAを、適切な制限酵素で消化することによって生成し、所望の断片を単離することを含む。さらに別の適切な技術は、所望の抗体またはポリペプチド断片をコードするDNA断片を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって単離及び増幅することを含む。該DNA断片の所望の末端を画定するオリゴヌクレオチドは、該PCRにおいて5'プライマー及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、抗GPC3抗体断片は、本明細書に開示する天然抗GPC3抗体と少なくとも1つの生物学的及び／または免疫学的活性を共有する。

【0272】

特定の実施形態では、目的の保存的置換は、表1において、好ましい置換の見出しの下に示されている。かかる置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表1に例示的な置換と表示されるか、またはアミノ酸クラスを参照して以下にさらに記載される、より実質的な変化が導入され、その産物がスクリーニングされる。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1	
元の 例示的 好ましい	
残基 置換 置換	
Ala (A) val;leu;ile val	
Arg (R) lys;gin;asn lys	
Asn (N) gin;his;lys;arg gin	
Asp (D) glu glu	10
Cys (C) ser ser	
Gin (Q) asn asn	
Glu (E) asp asp	
Gly (G) pro;ala ala	
His (H) asn;gin;lys;arg arg	
He (I) leu;val;met;ala;phe;	
ノルロイシン leu	
Leu (L) ノルロイシン;ile;val;	
met;ala;phe ile	20
Lys (K) arg;gin;asn arg	
Met (M) leu;phe;ile leu	
Phe (F) leu;val;ile;ala;tyr leu	
Pro (P) ala ala	
Ser (S) thr thr	
Thr (T) ser ser	
Trp (W) tyr;phe tyr	
Tyr (Y) trp;phe;thr;ser phe	
Val (V) ile;leu;met;phe;	
ala;ノルロイシン leu	30

【 0 2 7 3 】

該抗 G P C 3 抗体の機能または免疫学的同一性における実質的な修飾は、（ a ）置換の領域におけるポリペプチド骨格の、例えば、シートもしくはヘリカルコンフォメーションとしての構造、（ b ）標的部位での当該分子の電荷もしくは疎水性、または（ c ）当該側鎖のかさの維持に対するそれらの影響が著しく異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、一般的な側鎖特性に基づいて分類される：

（ 1 ）疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile、

（ 2 ）中性親水性：cys、ser、thr、

（ 3 ）酸性：asp、glu、

（ 4 ）塩基性：asn、gin、his、lys、arg、（ 5 ）鎖の配向に影響を与える残基：gly、pro、及び

（ 6 ）芳香族：trp、tyr、phe。

【 0 2 7 4 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの 1 つのメンバーを別のクラスと交換することを必然的に伴う。かかる置換された残基もまた、保存的置換部位、または、より好ましくは、残りの（非保存的）部位に導入され得る。

【 0 2 7 5 】

該変動は、当技術分野で知られる方法、例えば、オリゴヌクレオチド介在性（部位特異

的) 突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発を使用して作り出され得る。部位特異的突然変異誘発 [Carter et al., Nucl. Acid Res., 13: 4331 (1986)、Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット変異導入 [Wells et al., Gene, 34: 315 (1985)]、制限選択突然変異誘発 [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415 (1986)] または他の既知の技術をクローニングされたDNAで行い、該抗GPC3抗体バリエーションDNAが産生され得る。

【0276】

アミノ酸をスキャンする分析は、連続配列に沿って1つ以上のアミノ酸を同定するために使用することもできる。好ましいスキャンアミノ酸に含まれるのは、比較的小さい中性アミノ酸である。かかるアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインが挙げられる。アラニンは、ベータ炭素以降の側鎖を排除しており、当該バリエーションの主鎖のコンフォメーションを変更する可能性が低いため、通常、この群の中でも好ましいスキャンアミノ酸である [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。アラニンはまた、最も一般的なアミノ酸であるため、通常は好ましい。さらに、それは、埋もれた位置及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.), Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換で十分な量のバリエーションが得られない場合、イソテリック (isotERIC) アミノ酸が使用され得る。

【0277】

該抗GPC3抗体の適切なコンフォメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基もまた、当該分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を阻止するために、通常はセリンで置換される場合がある。逆に、該抗GPC3抗体の安定性を改善するため (特に、該抗体が、Fv断片等の抗体断片である場合)、システイン結合 (複数可) がそれに付加される場合もある。特に好ましい種類の置換型バリエーションは、親抗体 (例えば、ヒト化またはヒト抗体) の1つ以上の超可変領域残基の置換を伴う。一般に、さらなる開発のために選択された、得られたバリエーション (複数可) は、それらを生成する親抗体と比較して改善された生物学的特性を有する。かかる置換型バリエーションを生成するのに便利な方法は、ファージ提示を使用した親和性成熟を含む。簡潔には、いくつかの超可変領域部位 (例えば、6~7部位) を変異させ、各部位ですべての可能なアミノ置換を生成する。このようにして生成された抗体バリエーションは、糸状ファージ粒子から、各粒子内にパッケージされたM13のgene III産物に対する融合として一価の形式で提示される。該ファージ提示されたバリエーションは、本明細書に開示する通り、その後それらの生物学的活性 (例えば、結合親和性) に対してスクリーニングされる。修飾用の候補超可変領域部位を特定するため、アラニンスキャンニング突然変異誘発を行い、抗原結合に大きく寄与する超可変領域残基を特定することができる。代替的に、またはさらに、該抗原抗体複合体の結晶構造を解析し、該抗体とGPC3ポリペプチド間の接触点を特定することが有益な場合がある。かかる接触残基及び隣接残基は、本明細書で詳述される手法による置換の候補である。かかるバリエーションが生成されると、本明細書に記載の通り、バリエーションのパネルはスクリーニングに供され、1つ以上の関連するアッセイにおいて優れた特性を備えた抗体が、さらなる開発のために選択され得る。

【0278】

該抗GPC3抗体のアミノ酸配列バリエーションをコードする核酸分子は、当技術分野において既知の様々な方法によって調製される。これらの方法としては、天然源からの単離 (天然に存在するアミノ酸配列のバリエーションの場合)、または抗GPC3抗体の先に調製されたバリエーションもしくは非バリエーション型のオリゴヌクレオチド介在性 (または部位特異的) 突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット変異導入による調製が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0279】

2. 修飾

抗GPC3抗体の共有結合修飾は、本発明の範囲に含まれる。1つの種類の共有結合修飾としては、抗GPC3抗体の標的アミノ酸残基を、該抗GPC3抗体の選択された側鎖またはN末端もしくはC末端残基と反応することが可能な有機誘導体化剤と反応させることが挙げられる。二官能性薬剤を用いた誘導体化は、例えば、抗GPC3抗体を精製するための方法において使用するための水不溶性支持マトリックスまたは表面に抗GPC3抗体を、及び同様にその逆に架橋するため有用である。一般に使用される架橋剤としては、例えば、1, 1'-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含めたホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデート等の薬剤が挙げられる。

10

【0280】

他の修飾としては、グルタミニル及びアスパラギニル残基のそれぞれ対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化[T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、ならびに任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

20

【0281】

本発明の範囲内に含まれる抗GPC3抗体の別の種類の共有結合修飾は、該抗体またはポリペプチドの天然のグリコシル化パターンを変更することを含む。「天然のグリコシル化パターンを変更すること」とは、本明細書における目的のため、天然配列の抗GPC3抗体に見出される1つ以上の炭水化物部分を削除すること(基礎となるグリコシル化部位を除去することによるか、または化学的及び/または酵素的手段によってグリコシル化を削除することによるかのいずれか)、及び/または天然配列の抗GPC3抗体に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することを意図する。さらに、該表現は、該天然タンパク質のグリコシル化における質的な変化を含み、存在する様々な炭水化物部分の特性及び割合の変化を含む。

30

【0282】

抗体及び他のポリペプチドのグリコシル化は、通常、N結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への該炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である)は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチド内でのこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が創出される。O-結合型グリコシル化とは、糖類であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも使用され得る。

40

【0283】

グリコシル化部位の該抗GPC3抗体への付加は、アミノ酸配列が上記のトリペプチド配列のうちの1つ以上を含むように該アミノ酸配列を変更することにより便宜的に達成される(N-結合型グリコシル化部位用)。該変更はまた、元の抗GPC3抗体の配列に対して1つ以上のセリンまたはスレオニン残基を付加することまたはこれらで置換することによって行ってもよい(O-結合型グリコシル化部位用)。該抗GPC3抗体のアミノ酸配列は、任意に、DNAレベルでの変化を通じて、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコ

50

ドンが生成されるように、予め選択された塩基において該抗GPC3抗体をコードするDNAを変異させることによって変更され得る。

【0284】

該抗GPC3抗体の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、該ポリペプチドへのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによるものである。かかる方法は、当技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330、及び *Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981) に記載されている。該抗GPC3抗体に存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に、またはグリコシル化の標的としての機能を果たすアミノ酸残基をコードするコドンの変異置換によって達成され得る。化学的脱グリコシル化技術は当技術分野で知られており、例えば、*Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)、及び *Edge et al., Anal. Biochem.*, 118:131 (1981) によって記載されている。ポリペプチドの炭水化物部分の酵素的切断は、*Thotakura et al., Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987) によって記載されるように、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

10

【0285】

F. 抗GPC3抗体の調製

以下の説明は、主に、抗GPC3抗体をコードする核酸を含むベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を培養することによる抗GPC3抗体の産生に関する。当然ながら、当技術分野で周知の代替的な方法が、抗GPC3抗体の調製に使用され得ることが企図される。例えば、適切なアミノ酸配列、またはその部分は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生成され得る [例えば、*Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)、*Merrifield, J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963) 参照]。インビトロタンパク質合成は、手動法を使用して行われる場合もあれば、自動で行われる場合もある。自動合成は、例えば、*Applied Biosystems Peptide Synthesizer* (Foster City, CA) を使用し、製造業者の使用説明書を使用して達成され得る。該抗GPC3抗体の様々な部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的方法を用いて組み合わせ、所望の抗GPC3抗体を産生してもよい。

20

30

【0286】

1. 抗GPC3抗体をコードするDNAの単離

抗GPC3抗体をコードするDNAは、該抗GPC3抗体のmRNAを有する、及びそれを検出可能なレベルで発現すると考えられている組織から調製されるcDNAライブラリから得てもよい。したがって、ヒト抗GPC3抗体のDNAは、ヒト組織から調製されたcDNAライブラリから便宜的に得ることができる。該抗GPC3抗体をコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリから、または既知の合成手順 (例えば、自動核酸合成) によっても得られ得る。

40

【0287】

ライブラリは、目的の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質を特定するように設計されたプローブ (少なくとも約20~80塩基のオリゴヌクレオチド等) でスクリーニングされ得る。選択されたプローブを用いた該cDNAまたはゲノムライブラリのスクリーニングは、標準的な手順を使用して、例えば、*Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載の通りに行われ得る。抗GPC3抗体をコードする遺伝子を単離するための代替的な手段は、PCR法を使用することである [Sambrook et al., 上掲、*Dieffenbach et al., PCR Primer: A L*

50

aboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

【0288】

cDNAライブラリをスクリーニングするための技術は、当技術分野で周知である。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さのものであるべきであり、偽陽性が最小限に抑えられるように十分に明白であるべきである。該オリゴヌクレオチドは、好ましくは、スクリーニングされるライブラリ中のDNAへのハイブリダイゼーション時に検出され得るように標識される。

【0289】

標識方法は当技術分野で周知であり、³²P標識ATPのような放射標識、ビオチン化または酵素標識の使用を含む。中等度ストリンジェンシー及び高ストリンジェンシーを含めたハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al.、上掲に提供されている。かかるライブラリスクリーニング法で特定された配列は、公開データベース、例えば、GenBankまたは他の私的配列データベースに寄託された利用可能な他の既知の配列と比較及び整列され得る。該分子の規定の領域内または完全長配列にわたる配列同一性（アミノ酸またはヌクレオチドレベルのいずれかで）は、当技術分野で知られる本明細書に記載の方法を使用して特定され得る。

【0290】

タンパク質コード配列を有する核酸は、選択されたcDNAまたはゲノムライブラリを、初めて本明細書で開示される推定アミノ酸配列を使用して、及び必要に応じて、Sambrook et al.、上掲に記載の従来のプライマー伸長手順を使用してスクリーニングし、cDNAに逆転写されなかった可能性があるmRNAの前駆体及びプロセシング中間体を検出することによって得てもよい。

【0291】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞は、抗GPC3抗体産生のための本明細書に記載の発現またはクローニングベクターでトランスフェクトまたは形質転換され、必要に応じて、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために改変された従来の栄養培地で培養される。培養条件、例えば、培地、温度、pH等は、過度の実験を行うことなく、当業者によって選択され得る。一般に、細胞培養の生産性を最大化するための原理、プロトコル、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) 及びSambrook et al.、上掲に見出すことができる。

【0292】

真核細胞のトランスフェクション及び原核細胞の形質転換（これは、宿主へのDNAの導入を意味し、該DNAは、染色体外または染色体組み込み体のいずれとしてでも複製可能である）の方法は、当業者に既知であり、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム介在性、ポリエチレングリコール/DMSO、及びエレクトロポレーションである。使用される宿主細胞に応じて、形質転換は、かかる細胞に適切な標準的な技術を使用して行われる。Sambrook et al.、上掲に記載の通り塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションは、一般に、原核生物に使用される。Agrobacterium tumefaciensによる感染は、Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) 及び1989年6月29日に公開されたWO 89/05859によって記載される通り、ある特定の植物細胞の形質転換に使用される。かかる細胞壁のない哺乳類細胞の場合、Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈殿法が使用され得る。哺乳類細胞宿主系トランスフェクションの一般的側面は、米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母への形質転換は、通常、Van Solingen et al., J. Bac, 130:946 (1977) 及びHsiao et a

10

20

30

40

50

l., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)の方法に従って行われる。しかしながら、DNAを細胞に導入するための他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクトな細胞との細菌の原形質融合、またはポリカチオン、例えば、ポリブレン、ポリオルニチンも使用され得る。哺乳類細胞を形質転換するための様々な技術については、Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及びMansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)を参照されたい。

【0293】

本明細書におけるベクターに含まれるDNAのクローニングまたは発現に適した宿主細胞としては、原核生物、酵母、または高等真核生物の細胞が挙げられる。

【0294】

a. 原核生物宿主細胞

適切な原核生物としては、古細菌及び真正細菌、例えば、グラム陰性またはグラム陽性菌、例えば、Enterobacteriaceae、例えば、E. coliが挙げられるがこれらに限定されない。様々なE. coli株、例えば、E. coli K12株M294 (ATCC 31,446)、E. coli XI 776 (ATCC 31,537)、E. coli株W3110 (ATCC 27,325)及びK5 772 (ATCC 53,635)が公的に入手可能である。他の適切な原核生物宿主細胞としては、Enterobacteriaceae、例えば、Escherichia、例えば、E. coli、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella、例えば、Salmonella typhimurium、Serratia、例えば、Serratia marcescans、及びShigella、ならびにBacillus、例えば、B. subtilis及びB. licheniformis (例えば、1989年4月12日に公開されたDD 266,710に開示されているB. licheniformis 41P)、Pseudomonas、例えば、P. aeruginosa、Rhizobia、Vitreoscilla、Paracoccus及びStreptomycesが挙げられる。これらの例は、例示であって、限定ではない。W3110株は、組み換えDNA産物の発酵用の一般的な宿主株であるため、これが特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは、該宿主細胞は、最小限の量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、W3110株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219、ATCC Deposit No. 27,325)を、該宿主にとって内因性であるタンパク質をコードする遺伝子に遺伝子変異をもたらすように改変してもよく、かかる宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを含むE. coli W3110株1 A2、完全な遺伝子型tonA ptr3を有するE. coli W3110株9E4、完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kanrを有するE. coli W3110株27C7 (ATCC 55,244)、完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kanrを有するE. coli W3110株37D6、非カナマイシン耐性degP欠失変異を有する株37D6であるE. coli W3110株40B4、遺伝子型W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac I q lacL8 AompTA (nmpc-fepE) degP41 kanRを有するE. coli W3110株33D3 (米国特許第5,639,635号)、及び変異ペリプラズムプロテアーゼを有する、1990年8月7日に発行された米国特許第4,946,783号に開示されるE. coli株が挙げられる。他の株及びそれらの派生物、例えば、E. coli 294 (ATCC 31,446)、E. coli B、E. u011λ 1776 (ATCC 31,537)及びE. coli RV308 (ATCC

10

20

30

40

50

31, 608) も適している。これらの例は、例示であって、限定ではない。規定の遺伝子型を有する上述の細菌のうちのいずれかの派生物の構築方法は、当技術分野で既知であり、例えば、Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990) に記載されている。一般に、細菌の細胞におけるレプリコンの複製可能性を考慮して適切な細菌を選択することが必要である。例えば、*E. coli*、*Serratia*、または *Salmonella* 種は、周知のプラスミド、例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、または pKN410 を使用してレプリコンを提供する場合に宿主として適切に使用され得る。典型的には、宿主細胞は、最小限の量のタンパク質分解酵素を分泌するべきであり、追加のプロテアーゼ阻害剤を、望ましくは、当該細胞培養に組み込んでもよい。別の方法としては、クローニングのインビトロ法、例えば、PCR または他の核酸ポリメラーゼ反応が適する。

10

【0295】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合、細菌において産生され得る。完全長抗体は、血中での半減期が長い。*E. coli* での産生がより迅速であり、より費用効率が高い。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、U.S. 5,648,237 (Carter et al.)、U.S. 5,789,199 (Joly et al.)、ならびに発現及び分泌を最適化するための翻訳開始領域 (TIR) 及びシグナル配列を記載している U.S. 5,840,523 (Simmons et al.) を参照されたい。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。発現後、該抗体は、可溶性画分の *E. coli* 細胞ペーストから単離され、例えば、アイソタイプに応じてプロテインA または G カラムを通して精製され得る。最終精製は、例えば、CHO 細胞で発現された抗体を精製するためのプロセスと同様に行われ得る。

20

【0296】

b. 真核生物宿主細胞

原核生物に加えて、糸状真菌または酵母等の真核微生物は、抗GPC3抗体をコードするベクターに適したクローニングまたは発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* は、一般に使用される下等真核生物宿主微生物である。その他としては、*Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290:140 [1981]、1985年5月2日公開のEP 139,383)、*Kluyveromyces* 宿主 (米国特許第4,943,529号、Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991))、例えば、*K. lactis* (MW98-8C、CBS683、CBS4574、Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983])、*K. fragilis* (ATCC 12,424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16,045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、*K. drosophilae* (ATCC 36,906、Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990))、*K. thermotolerans*、及び *K. marxianus*、*Yarrowia* (EP 402,226)、*Pichia pastoris* (EP 183,070、Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988])、*Candida*、*Trichoderma reesei* (EP 244,234)、*Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979])、*Schwanniomyces*、例えば、*Schwanniomyces occidentalis* (1990年10月31日に公開されたEP 394,538)、及び糸状真菌、例えば、*Neurospora*、*Penicillium*、*Tolypocladium* (1991年1月10日に公開されたWO 91/00357)、ならびに *Aspergillus* 宿主、例えば、*A. nidulans* (Ballance et al., *Bi*

30

40

50

ochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]、Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]、Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) 及び *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]) が挙げられる。メチロトロフ酵母は、本明細書において適切であり、限定されないが、*Hansenula*、*Candida*、*Kloeckera*、*Pichia*、*Saccharomyces*、*Torulopsis*、及び *Rhodotorula* からなる属から選択される、メタノールで成長することが可能な酵母を含む。このクラスの酵母の例である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982) に見出すことができる。

10

【0297】

グリコシル化抗GPC3抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から得られる。無脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞、例えば、*Drosophila* S2 及び *Spodoptera* Sf9、ならびに植物細胞、例えば、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコの細胞培養物が挙げられる。多数のバキュロウイルス株及びバリエーション、ならびに *Spodoptera frugiperda* (毛虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ミバエ)、及び *Bombyx mori* 等の宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞が特定されている。トランスフェクション用の様々なウイルス株、例えば、*Autographa californica* NPV の L-1 バリエーション、及び *Bombyx mori* NPV の Bm-5 株が公的に入手可能であり、かかるウイルスは、本発明の本明細書におけるウイルスとして、特に、*Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクション用に使用され得る。

20

【0298】

しかしながら、脊椎動物細胞が最も注目されており、培養下での脊椎動物細胞の増殖 (組織培養) が日常的な手段となっている。有用な哺乳類宿主細胞株の例は、SV40 (COS-7、ATCC CRL 1651) によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株、ヒト胎児腎臓株 (293 細胞、または浮遊培養で成長のためにサブクローニングした 293 細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977))、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))、マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))、サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)、ヒト子宮頸部癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2)、イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34)、buffalo 系ラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442)、ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75)、ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065)、マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51)、TRI 細胞 (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))、MRC 5 細胞、FS4 細胞、及びヒト肝癌細胞株 (Hep G2) である。

30

40

【0299】

宿主細胞は、抗GPC3抗体産生のための上記の発現またはクローニングベクターで形質転換され、必要に応じて、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために改変された従来の栄養培地で培養される。

【0300】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

本発明の抗体の組み換え産生のため、それをコードする核酸 (例えば、cDNA または

50

ゲノムDNA)を単離し、さらなるクローニング(該DNAの増幅)または発現のために複製可能なベクターに挿入する。該抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、該抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離され及び配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核生物または真核生物(一般に哺乳類)起源のいずれかのものである。

【0301】

該ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列が、様々な手順によって該ベクターに挿入され得る。一般に、DNAは、当技術分野で既知の技術を使用して、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位(複数可)に挿入される。ベクター成分としては、一般に、1つ以上のシグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列が挙げられるがこれらに限定されない。これらの成分の1つ以上を含む適切なベクターの構築は、当業者に既知の標準的なライゲーション技術を用いる。該GPC3は、組み換え的に、直接産生され得るだけでなく、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても産生される場合があり、該異種ポリペプチドは、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端における、特異的な切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドであり得る。一般に、該シグナル配列は、該ベクターの成分の場合もあれば、該抗GPC3抗体をコードするDNAの一部であって、これが該ベクターに挿入される場合もある。該シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物のシグナル配列でもよい。酵母分泌の場合、該シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(Saccharomyces及びKluyveromyces α-因子リーダーを含み、後者は、米国特許第5,010,182号に記載されている)、または酸性ホスファターゼリーダー、C.albicansグルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日に公開されたEP 362,179)、または1990年11月15日に公開されたWO 90/13646に記載のシグナルであり得る。哺乳類細胞の発現では、哺乳類のシグナル配列、例えば、同じまたは関連する種の分泌されたポリペプチドからのシグナル配列、及びウイルスの分泌リーダーは、タンパク質の分泌を指示するために使用される。

【0302】

a. 原核生物宿主細胞

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準的な組み換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞等の抗体産生細胞から単離され、配列決定され得る。別の方法として、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドシンセサイザーまたはPCR技術を使用して合成され得る。得られた後、該ポリペプチドをコードする配列は、原核生物宿主で異種ポリヌクレオチドを複製及び発現することが可能な組み換えベクターに挿入される。多くの利用可能な当技術分野で既知のベクターが本発明の目的のために使用され得る。適切なベクターの選択は、主に、ベクターに挿入される核酸のサイズ及び該ベクターで形質転換される特定の宿主細胞に依存する。各ベクターは、その機能(異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはその両方)及びそれが存在する特定の宿主細胞とのその適合性に依拠して様々な成分を含む。

【0303】

一般に、宿主細胞と適合性のある種由来のレプリコン及び制御配列を含むプラスミドベクターが、これらの宿主に関連して使用される。発現及びクローニングベクターの両方が、1つ以上の選択された宿主細胞において該ベクターの複製を可能にする核酸配列、及び形質転換された細胞において表現型選択を可能にするマーキング配列を含む。かかる配列は、様々な細菌、酵母、及びウイルスについて周知である。プラスミドpBR322から

の複製起点は、アンピシリン（Amp）及びテトラサイクリン（Tet）耐性をコードする遺伝子を含み、ひいては形質転換された細胞を同定するための容易な手段を提供し、ほとんどのグラム陰性細菌に適し、2 μ プラスミド起点は酵母に適し、種々のウイルス起点（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV）は、哺乳類細胞におけるベクターのクローニングに有用である。pBR322、その派生物、または他の微生物プラスミドまたはバクテリオファージもまた、内因性タンパク質の発現のために微生物によって使用され得るプロモーターを含むか、または含むように改変され得る。特定の抗体の発現のために使用されるpBR322派生物の例は、Carter et al.、米国特許第5,648,237号に詳細に記載されている。

【0304】

さらに、宿主微生物と適合性のあるレプリコン及び制御配列を含むファージベクターは、これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用され得る。例えば、 λ O E M（商標）-11等のバクテリオファージが、E. coli LE392等の感受性宿主細胞を形質転換するために使用され得る組み換えベクターを作製する際に利用され得る。

【0305】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド成分の各々をコードする2つ以上のプロモーター-シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調節するシストロンの上流（5'）に位置する非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、通常、2つのクラス、すなわち、誘導性プロモーター及び構成的プロモーターに分けられる。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養素の存在もしくは不在、または温度の変化にตอบสนองしてその制御下でレベルが上昇したシストロンの転写を開始するプロモーターである。

【0306】

様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。選択されたプロモーターは、制限酵素消化によりその起源のDNAから該プロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列を本発明のベクターに挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロンDNAに作動可能に連結され得る。天然のプロモーター配列及び多くの異種プロモーターの両方が、標的遺伝子の増幅及び／または発現を指示するために使用され得る。いくつかの実施形態では、異種プロモーターが使用されるが、これは、それらが一般に天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、発現される標的遺伝子の転写を増加させ、収量を高めるからである。

【0307】

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターが周知である。原核生物宿主での使用に適したプロモーターとしては、PhoAプロモーター、 β -ガラクターマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Chang et al., Nature, 275: 615 (1978)、Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980)、EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えば、tac [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)] または trc プロモーターが挙げられる。細菌系で使用されるプロモーターは、抗GPC3抗体をコードするDNAに作動可能に連結されるシャイン・ダルガノ (S.D.) 配列も含む。しかしながら、細菌において機能的な他のプロモーター（他の既知の細菌またはファージプロモーター等）も同様に適している。それらのヌクレオチド配列は公開されているため、当業者は、それらを、標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンに、リンカーまたはアダプターを使用して作動可能にライゲートし、任意の必要な制限酵素部位を供給することが可能である (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269)。

【0308】

本発明の1つの態様では、該組み換えベクター内の各シストロンは、分泌シグナル配列成分を含み、これが、発現されたポリペプチドの膜輸送を指示する。一般に、該シグナル

10

20

30

40

50

配列は、該ベクターの成分の場合もあれば、該標的ポリペプチドDNAの一部であって、これが該ベクターに挿入される場合もある。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞によって認識及びプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。該異種ポリペプチド原産のシグナル配列を認識もプロセッシングもしない原核生物宿主細胞の場合、該シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、または熱安定性エンテロトキシンII（STII）リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA、及びMBPからなる群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。本発明の1つの実施形態では、該発現系の両方のシストロンに使用されるシグナル配列は、STIIシグナル配列またはそのバリエーションである。

10

【0309】

別の態様では、本発明による免疫グロブリンの産生は、宿主細胞の細胞質で行うことができ、それ故、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在を必要としない。その点で、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は、細胞質内で機能的免疫グロブリンを生じるように発現され、折り畳まれ、アセンブリする。ある特定の宿主株（例えば、E. coli trxB-株）は、ジスルフィド結合形成に好ましい細胞質条件を提供し、それにより、発現したタンパク質サブユニットの適切な折り畳み及びアセンブリを可能にする。Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)。

【0310】

本発明は、発現したポリペプチド成分の量比が、分泌され適切にアセンブリした本発明の抗体の収量を最大化するように調節され得る発現系を提供する。かかる調節は、該ポリペプチド成分の翻訳強度を同時に調節することによって少なくとも部分的に達成される。翻訳強度を調節するための1つの技術は、Simmons et al.、米国特許第5,840,523号に開示されている。それは、シストロン内の翻訳開始領域（TIR）のバリエーションを使用している。所与のTIRについて、一連のアミノ酸または核酸配列バリエーションを様々な翻訳強度で創出することができ、ひいては、この因子を、特定の鎖の所望の発現レベルに調整するための便利な手段が提供される。TIRバリエーションは、アミノ酸配列を変更することができるコドン変化をもたらす従来の変異誘発技術によって生成され得るが、該ヌクレオチド配列におけるサイレント変化が好ましい。該TIRの変更としては、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数または間隔の変更を、該シグナル配列の変更と合わせて含み得る。変異シグナル配列を生成するための1つの方法は、該シグナル配列のアミノ酸配列を変化させない（すなわち、変化がサイレントである）コード配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの第三位のヌクレオチドを変化させることによって達成することができ、さらに、いくつかのアミノ酸、例えば、ロイシン、セリン、及びアルギニンは、該バンクの作製に複雑性を加えることができる複数の第一及び第二位を占める。この突然変異誘発法は、Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol 4 151-158に詳細に記載されている。

20

30

【0311】

好ましくは、ベクターのセットは、それに含まれる各シストロンについての様々なTIR強度で生成される。この限定されたセットは、様々なTIR強度の組み合わせの下での各鎖の発現レベルの比較及び所望の抗体産物の収量を提供する。TIR強度は、Simmons et al.、米国特許第5,840,523号に詳細に記載されるように、レポーター遺伝子の発現レベルを定量することによって決定され得る。翻訳強度の比較に基づいて、所望の個々のTIRが、本発明の発現ベクター構築物において組み合わせられるように選択される。

40

【0312】

b. 真核生物宿主細胞

該ベクター成分としては、一般に、以下のうちの1つ以上が挙げられるがこれらに限定されない：シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プ

50

ロモーター、及び転写終結配列。

【0313】

(1) シグナル配列成分

真核生物宿主細胞で使用するためのベクターもまた、目的の成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に、特異的な切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドを含み得る。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識及びプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳類細胞の発現では、哺乳類のシグナル配列及びウイルスの分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルが利用可能である。かかる前駆体領域のDNAは、リーディングフレーム内で該抗体をコードするDNAにライゲートされる。

10

【0314】

(2) 複製起点

一般に、複製起点成分は、哺乳類の発現ベクターには必要とされない。例えば、SV40起点は、それが初期プロモーターを含むため、通常は唯一使用され得る。

【0315】

(3) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、通常、選択遺伝子、別名、選択可能なマーカーを含む。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンに対する耐性を与えるか、(b) 栄養要求性欠損を補完するか、または(c) 複合培地から利用できない必須の栄養素、例えば、BacilliのためのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子を供給するタンパク質をコードする。

20

【0316】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止する薬物を利用する。異種遺伝子を用いた形質転換に成功した細胞は、薬物耐性を与え、ひいては選択レジメンを生き残るタンパク質を産生する。かかる優性選択の例は、ネオマイシン、ミコフェノール酸、及びハイグロマイシンという薬物を使用する。

【0317】

哺乳類細胞に適した選択可能なマーカーの例は、該抗GPC3抗体をコードする核酸、例えば、DHFRまたはチミジンキナーゼ、メタロチオネイン-I及び-II、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等を取り込む能力を有する細胞の同定を可能にするものである。野生型DHFRが使用される場合の適切な宿主細胞は、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980) によって記載される通りに調製し、増殖させた、DHFR活性が欠損したCHO細胞株（例えば、ATCC CRL-9096）である。例えば、該DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、最初に、DHFRの競合アンタゴニストであるメトトレキサート(Mtx)を含む培地中ですべての形質転換体を培養することによって特定される。別の方法として、抗体、野生型DHFRタンパク質、及び別の選択可能なマーカー、例えば、アミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)をコードするDNA配列で形質転換または共形質転換された宿主細胞（特に、内因性DHFRを含む野生型宿主）は、該選択可能なマーカー用の選択物質、例えば、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418を含む培地での細胞成長によって選択され得る。米国特許第4,965,199号を参照されたい。

30

40

【0318】

酵母での使用に適した選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrpL遺伝子である[Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979)、Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979)、Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)]。trpL遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠く酵母の変異株に対する選択マーカー、例えば、

50

A T C C 番号 4 4 0 7 6 または P E P 4 - 1 を提供する [J o n e s , G e n e t i c s , 8 5 : 1 2 (1 9 7 7)] 。

【 0 3 1 9 】

(4) プロモーター成分の発現

クローニングベクターは、通常、抗 G P C 3 抗体をコードする核酸配列に作動可能に連結された、m R N A 合成を指示するためのプロモーターを含む。様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターが周知である。

【 0 3 2 0 】

実質的にすべての真核生物の遺伝子が、転写が始まる部位からおよそ 2 5 ~ 3 0 塩基上流に位置する A T リッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始から 7 0 ~ 8 0 塩基上流に見られる別の配列は、C N C A A T 領域であり、ここでは、N は任意のヌクレオチドでよい。大半の真核生物の遺伝子の 3 ' 末端は、A A T A A A 配列であり、これは、当該コード配列の 3 ' 末端へのポリ A テールの付加のためのシグナルであり得る。これらの配列のすべてが真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

【 0 3 2 1 】

酵母宿主とともに使用するために適したプロモーター配列の例としては、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ [H i t z e m a n e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 5 5 : 2 0 7 3 (1 9 8 0)] または他の糖分解酵素 [H e s s e t a l . , J . A d v . E n z y m e R e g . , 7 : 1 4 9 (1 9 6 8) , H o l l a n d , B i o c h e m i s t r y , 1 7 : 4 9 0 0 (1 9 7 8)] 、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6 - リン酸イソメラーゼ、3 - ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。

【 0 3 2 2 】

成長条件によって制御された転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソシトロクロム C、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素のプロモーター領域である。酵母発現での使用に適したベクター及びプロモーターは、E P 7 3 , 6 5 7 にさらに記載されている。

【 0 3 2 3 】

哺乳類宿主細胞におけるベクターからの抗 G P C 3 抗体の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス (1 9 8 9 年 7 月 5 日に公開された U K 2 , 2 1 1 , 5 0 4) 、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、及びシミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) 等のウイルスのゲノムから、異種哺乳類プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、ならびに熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって制御されるが、但し、かかるプロモーターが宿主細胞系と適合することを条件とする。

【 0 3 2 4 】

該 S V 4 0 ウイルスの初期及び後期プロモーターは、便宜上、該 S V 4 0 ウイルスの複製起点も含む S V 4 0 制限断片として得られる。ヒトサイトメガロウイルスの前初期プロモーターは、便宜上、H i n d I I I E 制限断片として得られる。ウシ乳頭腫ウイルスをベクターとして使用し、哺乳類宿主において D N A を発現させるための系は、米国特許第 4 , 4 1 9 , 4 4 6 号に開示されている。この系の改良が、米国特許第 4 , 6 0 1 , 9 7 8 号に記載されてる。単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト β - インターフェロン c D N A の発現については、R e y e s e t a l . , N a t u r e 2 9 7 : 5 9 8 - 6 0 1 (1 9 8 2) も参照されたい。別の方法として、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復を該プロモーターとして使用

することができる。

【0325】

(5) エンハンサー要素成分

該抗GPC3抗体をコードするDNAの高等真核生物による転写は、当該ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増加し得る。エンハンサーは、DNAのシス作用要素であり、通常は約10～300bpであり、プロモーターに作用してその転写を増加させる。哺乳類遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン、及びインスリン）由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている。しかしながら、通常は、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用される。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー（bp100～270）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンシング要素に関しては、Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)も参照されたい。該エンハンサーは、該抗GPC3抗体コード配列の5'位または3'位でベクターにスプライスされ得るが、好ましくは、プロモーターから5'部位に配置される。

10

【0326】

(6) 転写終結成分

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物由来の有核細胞）内で使用される発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。かかる配列は、一般に、真核生物もしくはウイルスDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域から、及び時折、3'非翻訳領域から得られる。これらの領域は、該抗GPC3抗体をコードするmRNAの非翻訳部分内のポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結構成成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026及びそこに開示されている発現ベクターを参照されたい。組み換え脊椎動物細胞培養における抗GPC3抗体の合成への適応に適したさらに他の方法、ベクター、及び宿主細胞は、Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)、Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)、EP 117,060、及びEP 117,058に記載されている。

20

【0327】

4. 宿主細胞の培養

本発明の抗GPC3抗体を産生するために使用される宿主細胞は、様々な培地で培養され得る。

30

【0328】

a. 原核生物宿主細胞

本発明のポリペプチドを産生するために使用される原核生物細胞は、当技術分野で既知の、選択された宿主細胞の培養に適切な培地で成長させる。適切な培地の例としては、必要な栄養補助剤を含むルリアブロス（LB）が挙げられる。いくつかの実施形態では、該培地は、該発現ベクターを含む原核生物細胞の成長を選択的に可能にするため、該発現ベクターの構築に基づいて選択される選択物質も含む。例えば、アンピシリンは、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞を成長させるための培地に添加される。

40

【0329】

炭素、窒素、及び無機リン酸塩源に加えて、任意の必要な補助剤も、単独で、または複合窒素源等の別の補助剤もしくは培地との混合物として導入される適切な濃度で含まれ得る。任意に、該培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリトール、及びジチオスレイトールからなる群から選択される1つ以上の還元剤を含み得る。

【0330】

該原核生物宿主細胞は、適切な温度で培養される。E. coliの成長の場合、例えば、好ましい温度は、約20℃～約39℃の範囲、より好ましくは、約25℃～約37℃、

50

さらにより好ましくは、約 30℃である。該培地の pH は、主に宿主生物に応じて約 5 ～ 約 9 の範囲の任意の pH であり得る。E. coli の場合、該 pH は、好ましくは、約 6 . 8 ～ 約 7 . 4、より好ましくは、約 7 . 0 である。

【0331】

誘導性プロモーターが本発明の発現ベクターに使用される場合、タンパク質発現は、該プロモーターの活性化に適した条件下で誘導される。本発明の 1 つの態様では、PhoA プロモーターが、該ポリペプチドの転写を制御するために使用される。したがって、形質転換された宿主細胞は、誘導のため、リン酸制限培地で培養される。好ましくは、該リン酸制限培地は、C. R. A. P 培地である（例えば、Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147 参照）。様々な他の誘導因子が、当技術分野で知られるように、使用されるベクター構築物に応じて使用され得る。1 つの実施形態では、本発明の発現ポリペプチドは、該宿主細胞のペリプラズムに分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、通常は、一般に浸透圧ショック、超音波処理、または溶解等の手段による微生物の破壊を伴う。細胞が破壊された後、細胞残屑または全細胞は、遠心分離または濾過によって除去され得る。タンパク質は、例えば、アフィニティー樹脂クロマトグラフィーによってさらに精製され得る。別の方法として、タンパク質は、培地に輸送され、その中で単離され得る。細胞を培養物から除去してもよく、その培養上清は、産生されたタンパク質のさらなる精製のため、ろ過及び濃縮される。発現したポリペプチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 及びウェスタンブロットアッセイ等の一般に知られる方法を使用してさらに単離及び同定され得る。

10

20

【0332】

本発明の 1 つの態様では、抗体産生は、発酵プロセスによって大量に行われる。様々な大規模流加発酵手順が、組み換えタンパク質の産生に利用可能である。大規模発酵は、少なくとも 1000 リットルの容量、好ましくは、約 1,000 ～ 100,000 リットルの容量を有する。これらの発酵槽は、酸素及び栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を分布させるために攪拌インペラを使用する。小規模発酵とは、一般に、容積がおよそ 100 リットル以下であり、約 1 リットル～約 100 リットルの範囲であり得る発酵槽での発酵を指す。

【0333】

発酵プロセスにおいて、タンパク質発現の誘導は、通常、細胞を所望の密度、例えば、約 180 ～ 220 の OD₅₅₀ になるまで適切な条件下で成長させた後に開始され、その段階で、該細胞は、初期静止期にある。様々な誘導因子が、当技術分野で知られるように及び上記のように、使用されるベクター構築物に応じて使用され得る。細胞を、誘導前に短期間成長させてもよい。細胞は、通常、約 12 ～ 50 時間誘導されるが、より長いまたはより短い誘導時間も使用され得る。

30

【0334】

本発明のポリペプチドの産生歩留まり及び品質を改善するために、様々な発酵条件が修正され得る。例えば、分泌された抗体ポリペプチドの適切なアセンブリ及び折り畳みを改善するために、シャペロンタンパク質、例えば、Dsb タンパク質 (DsbA、DsbB、DsbC、DsbD、及びまたは DsbG) または FkpA (シャペロン活性を有するペプチジルプロリルシス、トランスイソメラーゼ) を過剰発現するさらなるベクターを使用して、該宿主原核生物細胞を共形質転換することができる。該シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞において産生される異種タンパク質の適切な折り畳み及び溶解を促進することが実証されている。Chen et al. (1999) J. Bio. Chem. 274:19601-19605、Georgiou et al.、米国特許第 6,083,715 号、Georgiou et al.、米国特許第 6,027,888 号、Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105、Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113、Arie et al. (2

40

50

001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

【0335】

発現した異種タンパク質（特にタンパク質分解感受性のもの）のタンパク質分解を最小限に抑えるために、タンパク質分解酵素が欠損したある特定の宿主株を本発明のために使用することができる。例えば、宿主細胞株は、既知の細菌プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI、及びそれらの組み合わせをコードする遺伝子において遺伝子変異（複数可）をもたらすように修飾され得る。いくつかのE. coliプロテアーゼ欠損株が利用可能であり、例えば、Joly et al. (1998)、上掲、Georgiou et al.、米国特許第5,264,365号、Georgiou et al.、米国特許第5,508,192号、Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)に記載されている。1つの実施形態では、タンパク質分解酵素が欠損し、かつ1つ以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換されたE. coli株が、本発明の発現系における宿主細胞として使用される。

10

【0336】

b. 真核生物宿主細胞

市販の培地、例えば、ハムF10 (Sigma)、基礎培地 ((MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコ変法イーグル培地 ((DMEM)、Sigma) が、該宿主細胞の培養に適している。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号、もしくは第5,122,469号、WO 90/03430、WO 87/00195、または再発行米国特許第30,985号に記載の培地のいずれかを、該宿主細胞の培地として使用してもよい。これらの培地のいずれにも、必要に応じて、ホルモン及び／または他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びホスフェート）、緩衝剤（例えば、HEPES）、ヌクレオチド（例えば、アデノシン及びチミジン）、抗生物質（例えば、GENTAMYCIN（商標）薬）、微量元素（マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物と定義される）、及びグルコースまたは同等のエネルギー源が補われ得る。任意の他の必要な補助剤もまた、当業者に知られる適切な濃度で含まれ得る。培養条件、例えば、温度、pH等は、発現のために選択された宿主細胞で先に使用されているものであり、当業者には明らかであろう。

20

30

【0337】

5. 遺伝子の増幅／発現の検出

遺伝子の増幅及び／または発現は、サンプルにおいて直接、例えば、従来のサザンブロットティング、mRNAの転写を定量するためのノーザンブロットティング [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットブロットティング (DNA分析)、またはインサイチュハイブリダイゼーションにより、適切に標識されたプローブを使用して、本明細書に提供する配列に基づいて測定され得る。別の方法として、DNA二重鎖、RNA二重鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含めた特定の二重鎖を認識することができる抗体を使用してもよい。該抗体は、次に標識され得るとともに、アッセイが行われ得る。該アッセイでは、該二重鎖が表面に結合され、該表面での二重鎖の形成後、該二重鎖に結合した抗体の存在が検出され得る。遺伝子発現は、代替的に、遺伝子産物の発現を直接定量するための免疫学的方法、例えば、細胞または組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養または体液のアッセイによって測定され得る。サンプル液の免疫組織化学的染色及び／またはアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳類において調製され得る。便宜上、該抗体は、天然配列のGPC3ポリペプチド

40

50

に対して、または本明細書に提供するDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、またはGPC3のDNAに融合されかつ特定の抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【0338】

6. 抗GPC3抗体の精製

抗GPC3抗体の形態は、培地または宿主細胞溶解物から回収され得る。膜結合型の場合、それは、適切な界面活性剤溶液（例えば、Triton-X 100）を使用して、または酵素切断によって膜から放出され得る。抗GPC3抗体の発現に使用された細胞は、様々な物理的または化学的手段、例えば、凍結解凍サイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤によって破壊され得る。

10

【0339】

抗GPC3抗体を、組み換え細胞のタンパク質またはポリペプチドから精製することが望ましい場合がある。以下の手順は、適切な精製手順の例である：イオン交換カラムでの分別によるもの、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカまたはカチオン交換樹脂、例えば、DEAEでのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、例えば、Sephadex G-75を使用したゲルろ過、夾雑物質、例えば、IgGを除去するためのプロテインA Sepharoseカラム、及び該抗GPC3抗体のエピトープタグ形態を結合するための金属キレートカラム。

【0340】

様々なタンパク質精製法を使用してもよく、かかる方法は、当技術分野で既知であり、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載されている。選択される精製ステップ（複数可）は、例えば、使用される産生プロセスの性質及び産生される具体的な抗GPC3抗体に依存する。

20

【0341】

組み換え技術を使用する場合、該抗体は、細胞内で産生される場合もあれば、細胞周辺腔で産生される場合も、培地に直接分泌される場合もある。該抗体が細胞内で産生される場合、第一のステップとして、宿主細胞または溶解断片のいずれかの微粒子残屑が、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)は、E. coliの細胞周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。簡潔には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）の存在下、約30分かけて解凍する。細胞残屑は、遠心分離によって除去され得る。抗体が培地に分泌される場合、かかる発現系の上清が一般に、第一に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮される。タンパク質分解を阻害するため、PMSF等のプロテアーゼ阻害剤を前述のステップのいずれかに含めてもよく、偶発的な夾雑物質の成長を予防するため、抗生物質を含めてもよい。

30

【0342】

該細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、または $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る（Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)）。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に対して推奨されている（Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)）。該親和性リガンドが結合するマトリックスは、多くの場合アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。機械的に

40

50

安定なマトリックス、例えば、コントロールド・ポア・ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンは、アガロースで達成可能なものよりも速い流速、及び短い処理時間を可能にする。該抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX（商標）樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, NJ）が精製に有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラムでの分別、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE（商標）でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿もまた、回収される抗体に応じて利用可能である。

【0343】

任意の予備精製ステップ（複数可）に続いて、目的の抗体及び夾雑物質を含む混合物を、pH約2.5～4.5の溶出緩衝液を用い、好ましくは、低塩濃度（例えば、約0～0.25Mの塩）で行われる低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供してもよい。

【0344】

G. 医薬製剤

本発明の抗体は、治療される状態に適した任意の経路で投与され得る。該抗体は、通常、非経口的に、すなわち、注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、髄腔内、及び硬膜外投与される。

【0345】

これらのがんを治療するため、1つの実施形態では、該抗体は、静脈内注入で投与される。注入により投与される用量は、1回当たり約 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $10,000\mu\text{g}/\text{m}^2$ に及び、一般に、週1回で合計1、2、3または4回である。代替的に、該用量範囲は、約 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $1000\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $800\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $600\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $400\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $500\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $300\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $200\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、及び約 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $200\mu\text{g}/\text{m}^2$ である。該用量は、該疾患の症状を緩和または軽減するために、1日1回、1週間に1回、1週間に複数回であるが1日1回未満、1ヶ月に複数回であるが1日1回未満、1ヶ月に複数回であるが1週間に1回未満、1ヶ月に1回、または断続的に投与され得る。投与は、当該腫瘍または治療されるがんの症状の寛解まで、開示した間隔のいずれかで継続してもよい。投与を、症状の寛解または緩和が達成された後に継続してもよく、その場合、かかる寛解または緩和は、かかる投与の継続によって延長される。

【0346】

本発明は、乳癌の治療方法も提供し、該方法は、乳癌に罹患した患者に対して、前述の実施形態のいずれか1つに記載のヒト化GPC3抗体の治療有効量を投与することを含む。該抗体は、通常、約 $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ ～約 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ の用量範囲で投与される。

【0347】

1つの態様では、本発明はさらに、少なくとも1つの本発明の抗GPC3抗体を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、（1）本発明の抗体、及び（2）医薬的に許容される担体を含む。

【0348】

本発明に従って使用される抗GPC3抗体を含む治療薬は、保存のため、所望の純度を有する該抗体を、任意成分の医薬的に許容される担体、賦形剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される用量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、緩衝剤、例えば、酢酸、Tris、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸、アスコルビン酸及びメチオニンを含めた酸化防止剤、防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、フェノール、ブチルア

10

20

30

40

50

ルコールもしくはベンジルアルコール、アルキルパラベン、例えば、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール)、低分子量(約10残基未満)ポリペプチド、タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン、親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含めた単糖、二糖、及び他の炭水化物、キレート剤、例えば、EDTA、等張化剤(tonicifier)、例えば、トレハロース及び塩化ナトリウム、糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール、界面活性剤、例えば、ポリソルベート、塩形成性対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)、及び/または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)もしくはポリエチレングリコール(PEG)を含む。インビボ投与に使用される医薬製剤は、一般に無菌である。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

10

20

30

40

50

【0349】

該活性成分は、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、コロイド状薬物送達システムにおいて、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)に封入される場合もあれば、マクロエマルジョンに封入される場合もある。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0350】

持続放出製剤も調製され得る。持続放出製剤の適切な例としては、該抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、該マトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル、例えば、ポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル)またはポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア)、及びポリ-D-(−)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーが100日間超にわたる分子の放出を可能にする一方で、ある特定のヒドロゲルは、より短い期間タンパク質を放出する。封入された免疫グロブリンが、長期間にわたって体内に残存する場合、それらは、37℃で水分への曝露の結果として変性または凝集し、生物学的活性の損失、及び免疫原性の変化の可能性をもたらし得る。関与するメカニズムに応じて、安定化のための合理的な方策が講じられ得る。例えば、該凝集のメカニズムがチオージスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見出された場合、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥すること、水分含量を制御すること、適切な添加剤を使用すること、及び特定のポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成され得る。

【0351】

抗体は、標的細胞/組織への送達に適した任意の形態で製剤化され得る。例えば、抗体は、免疫リポソームとして処方され得る。リポソームは、哺乳類に薬物を送達するのに有用な、様々な種類の脂質、リン脂質、及び/または界面活性剤から構成される小胞である。該リポソームの成分は、一般に、生体膜の脂質配置と同様の二重層構造で配置されている。該抗体を含むリポソームは、例えば、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)、Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)

、米国特許第 4, 485, 045 号及び第 4, 544, 545 号、ならびに 1997 年 10 月 23 日に公開された W097/38731 に記載の当技術分野で既知の方法によって調製される。循環時間が延長したリボソームは、米国特許第 5, 013, 556 号に開示されている。

【0352】

特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及び PEG 誘導体ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法により生成され得る。リボソームは、所望の直径を有するリボソームを得るために所定の細孔サイズのフィルターを通して押し出される。本発明の抗体の Fab' 断片は、Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) に記載のリボソームに、ジスルフィド交換反応を介してコンジュゲートされ得る。化学療法剤は任意に、リボソーム内に含まれる。Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19):1484 (1989) 参照。

10

【0353】

インビボ投与に使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0354】

H. 抗 GPC3 抗体による治療

がんにおける GPC3 の発現を特定するため、様々な検出アッセイが利用可能である。1つの実施形態では、GPC3 ポリペプチドの過剰発現は、免疫組織化学 (IHC) によって分析され得る。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織断片は、IHC アッセイに供され、GPC3 タンパク質染色強度基準を与えられる。好ましい実施形態では、がんが本明細書に開示する方法による治療に適しているかどうかの判断は、対象または対象のサンプルにおける GPC3 腫瘍エピトープの存在を検出することを含む。

20

【0355】

別の方法として、またはさらに、FISH アッセイ、例えば、INFORM (登録商標) (Ventana, Arizona が販売) または PATHVISION (登録商標) (Vysis, Illinois) をホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織にて行い、該腫瘍における GPC3 の過剰発現 (もしあれば) の程度を特定してもよい。

【0356】

GPC3 の過剰発現または増幅は、インビボ検出アッセイを使用して、例えば、検出する分子に結合し、検出可能な標識 (例えば、放射性同位体または蛍光標識) でタグ付けされた分子 (例えば、抗体) を投与すること、及び当該患者を該標識の局在について外部からスキャンすることによって評価され得る。上記のように、本発明の抗 GPC3 抗体は、様々な非治療用途を有する。本発明の抗 GPC3 抗体は、GPC3 エピトープを発現するがんの病期分類に有用であり得る (例えば、放射性イメージングにおいて)。該抗体はまた、細胞からの GPC3 エピトープの精製または免疫沈降のため、インビトロでの GPC3 エピトープの検出及び定量のため、例えば、ELISA またはウェスタンブロットで、混合細胞の集団から他の細胞の精製におけるステップとして GPC3 発現細胞を殺傷し、排除するためにも有用である。

30

40

【0357】

現在、がんの病期に応じて、がん治療は、以下の療法の 1 つまたは組み合わせを含む：がん性組織を除去するための手術、放射線療法、及び化学療法。抗 GPC3 抗体療法は、化学療法の毒性及び副作用を十分に許容しない高齢患者、ならびに放射線療法の有用性が限られる転移性疾患において特に望ましい場合がある。本発明の腫瘍を標的とする抗 GPC3 抗体は、疾患の最初の診断後または再発の過程で GPC3 を発現するがんを軽減するのに有用である。

【0358】

該抗 GPC3 抗体は、ヒト患者に対して、既知の方法に従って、例えば、静脈内投与、例えば、ボラスとして、もしくはある期間にわたる持続注入によって、筋肉内、腹腔内

50

、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、または吸入経路によって投与される。該抗体の静脈内または皮下投与が好ましい。

【0359】

本発明の抗体組成物は、適正な医療行為に相応した方法で、製剤化、服薬、及び投与される。これに関連して考慮する要因としては、治療される特定の障害、治療を受ける特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、及び医療従事者に既知の他の要因が挙げられる。

【0360】

疾患の予防または治療の場合、該用量及び投与方法は、既知の基準に従って、医師によって選択される。抗体の適切な用量は、上記で定義される治療される疾患の種類、該疾患の重症度及び経過、該抗体が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、治療歴、当該患者の病歴及び該抗体に対する反応、ならびに主治医の裁量に依存する。該抗体は、1回で、または一連の治療にわたって該患者に適切に投与される。好ましくは、該抗体は、静脈内注入または皮下注射によって投与される。該疾患の種類及び重症度に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim \text{約 } 50 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重（例えば、約 $0.1 \sim 15 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与）の抗体が、例えば、1回以上の別々の投与によるものか、持続注入によるものかにかかわらず、当該患者への投与のための初回の候補用量であり得る。投与レジメンは、該抗GPC3抗体の初回負荷用量約 $4 \text{ mg} / \text{kg}$ に続いて、毎週の維持量約 $2 \text{ mg} / \text{kg}$ を投与することを含み得る。しかしながら、他の投与レジメンが有用な場合もある。通常の1日用量は、上述の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ またはそれ以上に及び得る。数日間以上にわたる反復投与の場合、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が生じるまで治療が継続される。この治療の進行は、従来の方法及びアッセイによって、ならびに医師または当業者に既知の基準に基づいて、容易に監視され得る。

【0361】

本発明の抗GPC3抗体は、本明細書における「抗体」の定義によって包含される異なる形態であり得る。したがって、該抗体は、完全長またはインタクトな抗体、抗体断片、天然配列抗体またはアミノ酸バリエーション、ヒト化、キメラまたは融合抗体、及びそれらの機能的断片を含む。融合抗体では、抗体配列は、異種ポリペプチド配列に融合される。該抗体は、所望のエフェクター機能を提供するようにFc領域で修飾され得る。本明細書のセクションでより詳細に論じられるように、適切なFc領域を有する場合、細胞表面に結合した裸の抗体は、例えば、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を介して、もしくは補体依存性細胞傷害性における補体の動員によって、または他の何らかのメカニズムによって、細胞傷害性を誘導することができる。別の方法として、副作用または治療上の合併症を最小限に抑えるためにエフェクター機能を排除または低減することが望ましい場合、ある特定の他のFc領域が使用され得る。

【0362】

1つの実施形態では、該抗体は、本発明の抗体と、(i) 同一エピトープへの結合をめぐって競合する、及び／または(ii) 同一エピトープに実質的に結合する。特に、インビボでの腫瘍標的化及び任意の細胞増殖阻害または細胞傷害性を含めた本発明の抗GPC3抗体の生物学的特徴を有する抗体もまた企図される。

【0363】

本抗GPC3抗体は、哺乳類におけるGPC3を発現するがんの治療または該がんの1つ以上の症状の軽減に有用である。該がんは、本明細書に記載のがんのいずれかの転移性がんを包含する。該抗体は、該哺乳類において、GPC3エピトープを発現するがん細胞の少なくとも一部に結合することが可能である。好ましい実施形態では、該抗体は、インビトロまたはインビボで、GPC3を発現する腫瘍細胞のGPC3エピトープに結合した後、効果的に該細胞を破壊もしくは殺傷するか、またはかかる腫瘍細胞の成長を阻害する。他の好ましい実施形態では、該抗体は、効果的に、(i) それらが結合する細胞の成長もしくは増殖を阻害するか、(ii) それらが結合する細胞の死を誘発するか、(iii) それらが結合する細胞の離層を阻害するか、(iv) それらが結合する細胞の転移を阻

害するか、または（v）それらが結合する細胞を含む腫瘍の血管新生を阻害する。

【0364】

本発明は、本発明の抗GPC3抗体、及び担体を含む組成物を提供する。本発明はまた、本発明の抗GPC3抗体、及び担体を含む製剤を提供する。1つの実施形態では、該製剤は、医薬的に許容される担体を含む治療薬である。

【0365】

本発明の別の態様は、該抗GPC3抗体をコードする単離された核酸である。H鎖及びL鎖の両方、特に超可変領域の残基をコードする核酸、天然配列抗体をコードする鎖、ならびに該抗体のバリエーション、修飾、及びヒト化型が包含される。

【0366】

本発明は、哺乳類におけるGPC3ポリペプチドを発現するがんの治療または該がんの1つ以上の症状の軽減に有用な方法も提供し、該方法は、該哺乳類に対して、治療有効量の抗GPC3抗体を投与することを含む。該抗体の治療的組成物は、医師の指示に従って、短期（急性）もしくは慢性、または断続的に投与され得る。同様に提供するのは、GPC3ポリペプチドを発現する細胞の成長の阻害方法、及び該細胞の殺傷方法である。

【0367】

本発明はまた、少なくとも1つの抗GPC3抗体を含むキット及び製品も提供する。抗GPC3抗体を含むキットは、例えば、GPC3細胞の殺傷アッセイ、細胞からのGPC3ポリペプチドの精製または免疫沈降に使用される。例えば、GPC3の単離及び精製の場合、該キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）に結合した抗GPC3抗体を含むことができる。インビトロでの、例えば、ELISAもしくはウェスタンブロットまたはIHCアッセイ（本明細書でより詳細に記載される）におけるGPC3の検出及び定量のための抗体を含むキットが提供され得る。検出に有用なかかる抗体は、標識、例えば、蛍光または放射性標識が設けられていてもよい。

【0368】

エフェクター機能操作

本発明の抗体を、エフェクター機能に関して、例えば、該抗体の抗体依存性細胞介在性細胞傷害性（ADCC）及び／または補体依存性細胞傷害性（CDC）を増強するように修飾することが望ましい場合がある。これは、1つ以上のアミノ酸置換を該抗体のFc領域に導入することによって達成され得る。

【0369】

代替的に、またはさらに、システイン残基（複数可）を該Fc領域に導入し、それによって、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させてもよい。このように生成されたホモ二量体抗体は、内在化能力の改善、及び／または補体介在性細胞殺傷及び抗体依存性細胞傷害性（ADCC）の増加を有し得る。Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) 及び Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照されたい。抗腫瘍活性が向上したホモ二量体抗体はまた、Wolf et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993) に記載のヘテロ二官能性架橋剤を使用しても調製され得る。代替的に、二重Fc領域を有する抗体を操作することができ、該抗体は、それによって向上した補体溶解及びADCC能力を有し得る。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989) を参照されたい。該抗体の血清半減期を延長するために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載のように、サルベージ受容体結合エピトープを該抗体（特に、抗体断片）に組み込んでもよい。本明細書で使用される、「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、IgG分子のインビボ血清半減期の延長に関与するIgG分子（例えば、IgGi、IgG2、IgG3、またはIgG4）のFc領域のエピトープを指す。

【0370】

CAR修飾免疫細胞による治療

ある特定の実施形態では、本発明は、血液悪性腫瘍及び固形腫瘍が挙げられるがこれら

10

20

30

40

50

に限定されないがんを治療するための組成物及び方法に関する。ある特定の実施形態では、CAR修飾免疫細胞が使用される。CAR-T細胞は、非血液腫瘍、例えば、乳房、CNS、及び皮膚悪性腫瘍から生じる固形腫瘍に罹患した患者に治療的に使用され得る。ある特定の実施形態では、CAR-NK細胞が、いくつかの悪性腫瘍のいずれか1つに罹患した患者に治療的に使用され得る。ある特定の実施形態では、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように形質導入されたT細胞またはNK細胞の養子細胞移入の戦略に関する。CARは、所望の抗原(例えば、腫瘍抗原)に対する抗体ベースの特異性を、例えば、T細胞受容体活性化細胞内ドメインと組み合わせて、特異的な抗腫瘍細胞免疫活性を示すキメラタンパク質を生成する分子である。

【0371】

1つの態様では、本発明は、所望のCARを安定して発現するように遺伝子改変されたNK細胞の使用に関する。CARを発現するNK細胞は、本明細書では、CAR-NK細胞またはCAR修飾NK細胞と呼ばれる。好ましくは、該細胞は、新規な抗原特異性を与えるように、その表面に抗体結合ドメインを安定して発現するように遺伝子改変され得る。CAR-NK細胞を生成するための方法は、当技術分野で既知である。例えば、Glenn et al., Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells, Front Pharmacol. 2015; 6:21を参照されたい。CAR-NK細胞を生成するためのサービスが商業的に利用可能である。例えば、Creative Biolabs Inc., 45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USAを参照されたい。

【0372】

1つの態様では、本発明は、所望のCARを安定して発現するように遺伝子改変されたT細胞の使用に関する。CARを発現するT細胞は、本明細書では、CAR-T細胞またはCAR修飾T細胞と呼ばれる。好ましくは、該細胞は、MHC非依存性の新規な抗原特異性を与えるように、その表面に抗体結合ドメインを安定して発現するように遺伝子改変され得る。場合によっては、該T細胞は、特定の抗体の抗原認識ドメインをCD3-ゼータ鎖またはFcγRIIタンパク質の細胞内ドメインと組み合わせて単一のキメラタンパク質にするCARを安定して発現するように遺伝子改変される。

【0373】

1つの実施形態では、本発明のCARは、抗原認識ドメインを有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含む。1つの実施形態では、該CARのドメインの1つと天然に結合している膜貫通ドメインが使用される。別の実施形態では、該膜貫通ドメインは、該受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、かかるドメインが、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合することを回避するためのアミノ酸置換によって選択または修飾され得る。1つの実施形態では、該膜貫通ドメインは、CD8aのヒンジドメインである。

【0374】

細胞質ドメインに関しては、本発明のCARは、それ自体でCD28及び/または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように、または本発明のCARとの関連で有用な任意の他の所望の細胞質ドメイン(複数可)と組み合わせられるように設計され得る。1つの実施形態では、該CARの細胞質ドメインは、さらにCD3-ゼータのシグナル伝達ドメインを含むように設計され得る。例えば、該CARの細胞質ドメインは、CD3-ゼータ、4-1BB及びCD28のシグナル伝達モジュールならびにそれらの組み合わせを含むことができるが、これらに限定されない。したがって、本発明は、CAR-T細胞及び養子療法のためのそれらの使用方法を提供する。

【0375】

1つの態様では、本発明のCAR-T細胞は、所望のCAR、例えば、抗GPC3、CD8aのヒンジ及び膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-1BB及びCD3ゼータのシグナル伝達ドメインを含むCARを含むレンチウイルスベクターを、該細胞に導入することに

よって生成され得る。本発明のCAR T細胞は、インビボで複製して長期間持続することが可能であり、それにより、持続的な腫瘍制御がもたらされ得る。

【0376】

1つの実施形態では、該抗GPC3ドメインは、以下を含む重鎖可変領域を含む：

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAMHWVKQSHGKSLIEWIGGINPNNGVTTYNQRFK GKATLTVDKSSSTAYME LRS L T S E D S A V Y Y C A R G L L W Y A Y W G Q G T L V T V S A（配列番号2）

【0377】

1つの実施形態では、該抗GPC3ドメインは、以下を含む軽鎖可変領域を含む：

DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDINSYLSWFFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFS GSGSGQDYSLTIS SLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK（配列番号4）

【0378】

1つの実施形態では、該抗GPC3ドメインは、配列番号2及び配列番号4を含む。

【0379】

1つの実施形態では、該抗GPC3ドメインは、EYAMH（配列番号6）、GINPNNGVTTYNQRFKG（配列番号8）、及びGLLWYAY（配列番号10）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0380】

1つの実施形態では、該抗GPC3ドメインは、KASQDINSYLS（配列番号13）、RANRLVD（配列番号15）、及びLQYDEFPLT（配列番号17）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0381】

1つの実施形態では、該抗GPC3ドメインは、配列番号6、8、10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、さらに、配列番号13、15、17からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0382】

1つの実施形態では、本発明は、CARを発現するように遺伝子改変されたT細胞を、がんを有するまたはがんを有するリスクのある患者の治療のため、リンパ球注入を使用して投与することに関する。好ましくは、自己リンパ球注入が該治療に使用される。自己P BMCを、治療を必要とする患者から収集し、T細胞を、本明細書に記載の当技術分野で既知の方法を用いて活性化及び増殖させ、次いで、該患者に注入で戻す。

【0383】

本発明はまた、悪性腫瘍、または患者における化学療法及び／または免疫療法が、該患者に著しい免疫抑制をもたらすために、該患者が悪性腫瘍（例えば、CLL）を発症するリスクを高める自己免疫疾患を治療することを含む。本発明は、CD3-ゼータ及び該4-IBBまたはCD28のいずれかの共刺激ドメインの両方を含むCARに由来する抗GPC3抗体を発現するT細胞（CARTGPC3 T細胞とも呼ばれる）の使用を含む。本発明のCARTGPC3 T細胞は、ロバストなインビボでのT細胞増殖を果たすことができ、GPC3腫瘍エピトープを提示する細胞に特異的な記憶細胞を樹立することができる。この記憶細胞は、血中及び骨髄で長時間、ハイレベルで持続する。本発明は、細胞外ドメイン及び細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体を提供する。該細胞外ドメインは、他の場合には抗原結合部分と呼ばれる標的特異的結合要素を含む。該細胞内ドメインまたは該細胞質ドメインは、共刺激シグナル伝達領域及びゼータ鎖部分を含む。該共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの部分を目指す。共刺激分子は、細胞表面分子であり、抗原受容体または抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要なそれらのリガンドを除く。

【0384】

該CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメイン間、または該CARの細胞質ドメインと膜

10

20

30

40

50

貫通ドメイン間に、スペーサドメインが組み込まれてもよい。本明細書で使用される、「スペーサドメイン」という用語は、一般に、当該ポリペプチド鎖の膜貫通ドメインを、細胞外ドメインまたは細胞質ドメインのいずれかに連結するように機能する任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。スペーサドメインは、最大300個のアミノ酸、好ましくは、10～100個のアミノ酸、及び最も好ましくは、25～50個のアミノ酸を含み得る。

【0385】

抗原結合部分

1つの実施形態では、本発明のCARは、さもなければ抗原結合部分、または標的化アームと呼ばれる標的特異的結合要素を含む。本発明において使用される抗原結合部分は、がん細胞の表面で発現されるGPC3ポリペプチドに結合することが可能である。したがって、該抗原結合部分は、特定の病態と関連する標的細胞の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択される。

【0386】

本発明のCARは、GPC3のエピトープに特異的に結合する適切な抗原結合部分を操作することにより、細胞のGPC3を標的とするように操作される。

【0387】

好ましくは、本発明のCARにおける抗原結合部分の一部は、scFVであるか、またはscFabであり、該scFVの核酸配列は、抗GPC3抗体に関して本明細書に開示する1つ以上の軽鎖CDR及び1つ以上の重鎖CDRの核酸配列（複数可）を含み、該scFabの核酸配列は、抗GPC3抗体に関して本明細書に開示する1つ以上の軽鎖CDR及び1つ以上の重鎖CDRの核酸配列（複数可）を含む。

【0388】

好ましくは、本発明のCARにおける抗原結合部分の一部は、EYAMH（配列番号6）、GINPNNGVTTYNQRFKG（配列番号8）、及びGLLWYAY（配列番号10）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むscFvまたはscFabである。好ましくは、本発明のCARにおける抗原結合部分の一部は、KASQDINSYLS（配列番号13）、RANRLVD（配列番号15）、及びLQYDEFPLT（配列番号17）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むscFvまたはscFabである。

【0389】

好ましくは、本発明のCARにおける抗原結合部分の一部は、配列番号6、8、10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むscFvまたはscFabであり、さらに、配列番号13、15、17からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、さらに、配列番号2及び4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0390】

1つの実施形態では、本発明のCARにおける抗原結合部分の一部は、上記の配列番号に対して約80%、85%、90%、または95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvまたはscFabである。

【0391】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関しては、該CARは、該CARの細胞外ドメインに融合される膜貫通ドメインを含むように設計され得る。1つの実施形態では、該CARのドメインの1つと天然に結合している膜貫通ドメインが使用される。場合によっては、該膜貫通ドメインは、該受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、かかるドメインが、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合することを回避するためのアミノ酸置換によって選択または修飾され得る。

【0392】

該膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。該起源が天然である場合、該ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。

本発明において特に使用される膜貫通領域は、T細胞受容体のアルファ、ベータ、またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来し得る（すなわち、少なくともその膜貫通領域（複数可）を含む）。代替的に、該膜貫通ドメインは、合成であってもよく、その場合、ロイシン及びバリン等の主に疎水性残基を含む。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。

【0393】

任意に、短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリinker、好ましくは、2～10個の長さのアミノ酸が、該CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適切なリンカーを提供する。好ましくは、本発明のCARにおける膜貫通ドメインは、CD8の膜貫通ドメインである。1つの実施形態では、該CD8の膜貫通ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号16の核酸配列を含む。1つの実施形態では、該CD8の膜貫通ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号22のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の実施形態では、該CD8の膜貫通ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号22のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、WO 2017/054089の表2に開示される配列が使用される。

【0394】

場合によっては、本発明のCARの膜貫通ドメインは、CD8aのヒンジドメインを含む。1つの実施形態では、該CD8のヒンジドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号15の核酸配列を含む。1つの実施形態では、該CD8のヒンジドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号21のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の実施形態では、該CD8のヒンジドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号21のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、WO 2017/054089の表2に開示される配列が使用される。

【0395】

細胞質ドメイン

本発明のCARの細胞質ドメイン、または細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが配置された免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に参与する。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性であり得る。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、該エフェクター機能のシグナルを伝達し、該細胞に特殊機能を行うように指示するタンパク質の部分に指す。通常、全細胞内シグナル伝達ドメインが使用され得るが、多くの場合、全鎖を使用する必要はない。該細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分が用いられる限りでは、かかる切断部分は、それが該エフェクター機能のシグナルを伝達する限り、インタクトな鎖の代わりに用いることができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、したがって、該エフェクター機能のシグナルを伝達するのに十分な該細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分を含めることを意図されている。

【0396】

本発明のCARに用いる細胞内シグナル伝達ドメインの好ましい例としては、同時に作用して、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するT細胞受容体（TCR）及び共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体またはバリエーション及び同じ機能を有する任意の合成配列が挙げられる。

【0397】

TCRのみを介して生成されるシグナルは、該T細胞の完全な活性化には不十分であること、及び二次または共刺激シグナルも必要であることが知られている。したがって、T細胞の活性化は、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列、すなわち、TCRを介して抗原依存性の一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）、及び抗原

非依存的様式で作用し、二次または共刺激シグナルを与えるもの（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介されると言える。一次細胞質シグナル伝達配列は、促進的方法または抑制的方法のいずれかで、TCR複合体の一次活性化を調節する。促進的な方法で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。

【0398】

本発明において特に有用な一次細胞質シグナル伝達配列を含むITAMの例としては、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dに由来するものが挙げられる。本発明のCARにおける細胞質シグナル伝達分子が、CD3ゼータに由来する細胞質シグナル伝達配列を含むことが特に好ましい。

10

【0399】

好ましい実施形態では、該CARの細胞質ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメインをそれ自体で含むように、または本発明のCARとの関連で有用な任意の他の所望の細胞質シグナル伝達ドメイン（複数可）と組み合わせて含むように設計され得る。例えば、該CARの細胞質ドメインは、CD3ゼータ鎖の部分及び共刺激シグナル伝達領域を含むことができる。該共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの部分を目指す。共刺激分子は、細胞表面分子であり、抗原受容体または抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要なそれらのリガンドを除く。かかる分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、及びCD83と特異的に結合するリガンド等が挙げられる。

20

【0400】

本発明のCARの細胞質シグナル伝達部分内の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムにまたは規定の順序で互いに連結され得る。任意に、短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリンカー、好ましくは、2〜10個の長さのアミノ酸が、連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適切なリンカーを提供する。

【0401】

1つの態様では、該細胞質ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメイン及びCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。別の実施形態では、該細胞質ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメイン及び4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。さらに別の態様では、該細胞質ドメインは、CD3ゼータのシグナル伝達ドメインならびにCD28及び4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。

30

【0402】

1つの実施形態では、本発明のCARにおける細胞質ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメイン及びCD3ゼータのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、該4-1BBのシグナル伝達ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号17に記載の核酸配列を含み、該CD3ゼータのシグナル伝達ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号18に記載の核酸配列を含む。別の実施形態では、WO 2017/054089の表2に開示される配列が使用される。1つの実施形態では、本発明のCARにおける細胞質ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメイン及びCD3ゼータのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、該4-1BBのシグナル伝達ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号23のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み、該CD3ゼータのシグナル伝達ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号24のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の実施形態では、WO 2017/054089の表2に開示される配列が使用される。

40

【0403】

1つの実施形態では、本発明のCARにおける細胞質ドメインは、4-1BBのシグナ

50

ル伝達ドメイン及びCD3-ゼータのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、該4-I BBのシグナル伝達ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号23に記載のアミノ酸配列を含み、該CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインは、米国特許第9,102,760号の配列番号24に記載のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、WO 2017/054089の表2に開示される配列が使用される。

【0404】

ベクター

本発明は、CARの配列を含むDNA構築物を包含し、該配列は、細胞内ドメインの核酸配列に作動可能に連結された抗原結合部分の核酸配列を含む。本発明のCARにおいて使用され得る例示的な細胞内ドメインとしては、CD3-ゼータ、CD28、4-1BB等の細胞内ドメインが挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、該CARは、CD3-ゼータ、CD28、4-1BB等の任意の組み合わせを含み得る。

【0405】

1つの実施形態では、本発明のCARは、抗GPC3抗体由来のscFv、ヒトCD8のヒンジ及び膜貫通ドメイン、ならびにヒト4-I BB及びCD3-ゼータのシグナル伝達ドメインを含む。

【0406】

該所望の分子をコードする核酸配列は、当技術分野で既知の組み換え法を使用して、例えば、該遺伝子を発現する細胞からライブラリをスクリーニングすることによって、該遺伝子を含むことが既知のベクターから該遺伝子を得ることによって、または標準的な技術を用いて、それを含む細胞及び組織から直接単離することによって得られる。別の方法として、目的の遺伝子は、クローニングされるのではなく、合成的に産生され得る。

【0407】

本発明はまた、本発明のDNAが挿入されるベクターも提供する。レンチウイルス等のレトロウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期の安定した組み込み及び娘細胞におけるその繁殖を可能にすることから、長期遺伝子導入を達成するのに適したツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞等の非増殖細胞に形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルス等の腫瘍レトロウイルスに由来するベクターよりも優れた利点を有する。それらはまた、免疫原性が低いという追加された利点も有する。

【0408】

簡潔に要約すれば、CARをコードする天然または合成核酸の発現は、通常、該CARのポリペプチドまたはその部分をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結し、該構築物を発現ベクターに組み込むことによって達成される。該ベクターは、真核生物での複製及び組み込みに適する可能性がある。典型的なクローニングベクターは、転写及び翻訳停止剤、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の調節に有用なプロモーターを含む。

【0409】

上記の方法に加えて、以下の方法が使用され得る。本発明の発現構築物はまた、標準的な遺伝子導入プロトコルを用いた核酸免疫化及び遺伝子治療にも使用され得る。遺伝子導入のための方法は当技術分野では既知である。例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号を参照されたい。別の実施形態では、本発明は、遺伝子治療ベクターを提供する。

【0410】

該核酸は、複数の種類のベクターにクローニングされ得る。例えば、該核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ派生物、動物ウイルス、及びコスミドが挙げられるがこれらに限定されないベクターにクローニングされ得る。特に重要なベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プロンプ生成ベクター、及び配列決定ベクターが挙げられる。さらに、該発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクター技術は当技術分野では周知であり、例えば、Sambrook et al. (2

10

20

30

40

50

001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、ならびに他のウイルス学及び分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。一般に、適切なベクターは、少なくとも1種の生物で機能する複製起点、プロモーター配列、都合の良い制限エンドヌクレアーゼ部位、及び1つ以上の選択マーカーを含む(例えば、WO 01/96584、WO 01/29058、及び米国特許第6,326,193号)。

【0411】

複数のウイルスに基づく系が、哺乳類細胞への遺伝子導入用に開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子導入系にとって都合の良いプラットフォームを提供する。当技術分野で既知の技術を用いて選択された遺伝子をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子内にパッケージすることができる。この組み換えウイルスをその後単離し、対象の細胞にインビボまたはエキソビボのいずれかで導入することができる。いくつかのレトロウイルス系が当技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターが使用される。いくつかのアデノウイルスベクターが当技術分野で既知である。1つの実施形態では、レンチウイルスベクターが使用される。

【0412】

さらなるプロモーター要素、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。通常、これらは、開始部位の上流30~110bpの領域に位置するが、いくつかのプロモーターは、最近、開始部位の下流にも同様に機能要素を含むことが示されている。プロモーター要素間の間隔は多くの場合柔軟であるため、要素が互いに反転または移動した場合にプロモーター機能は維持される。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターでは、プロモーター要素間の間隔は、活性が低下し始める前に50bpまで離れて増加し得る。

【0413】

プロモーターに応じて、個々の要素は、協調的にまたは独立して機能し、転写を活性化することができるように思われる。

【0414】

適切なプロモーターの一例は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに作動可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列をハイレベルで発現させることができる強力な構成的プロモーター配列である。適切なプロモーターの別の例は、伸長成長因子-1a(EF-1a)である。しかしながら、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳がんウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の長い末端反復(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびに、ヒト遺伝子のプロモーター、例えば、これらに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない他の構成的プロモーター配列もまた使用され得る。さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されないものとする。誘導性プロモーターもまた本発明の一部として企図される。誘導性プロモーターの使用は、作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現を、かかる発現が望まれる場合にオンにすること、または発現が望まれない場合には該発現をオフにすることが可能な分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例としては、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

【0415】

CARのポリペプチドまたはその一部の発現を評価するため、細胞に導入される発現ベクターはまた、選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子のいずれかまたはその両方を含んで、ウイルスベクターを介してトランスフェクトまたは感染させようとする細胞の

集団からの発現細胞の特定及び選択を容易にすることができる。他の態様では、該選択マーカーは、別々のDNA片上に担持され、同時トランスフェクション法に用いられる場合がある。選択マーカーとレポーター遺伝子の両方が、当該宿主細胞内での発現を可能にするために適切な調節配列に隣接されてもよい。有用な選択マーカーとしては、例えば、抗生物質抵抗性遺伝子、例えば、neo等が挙げられる。

【0416】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされた可能性のある細胞を特定するため、及び調節配列の機能を評価するために用いられる。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエントの有機体もしくは組織内に含まれない、またはこれによって発現されない遺伝子であり、該遺伝子は、ポリペプチドをコードし、その発現は、いくつかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって明らかにされる。レポーター遺伝子の発現は、当該DNAが当該レシピエント細胞に導入された後の適切な時点でアッセイされる。適切なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、ベータガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子を挙げることができる（例えば、U i - T e i e t a l . , 2000 F E B S L e t t e r s 479:79-82）。適切な発現系は周知であり、既知の技術を用いて調製しても、商業的に入手してもよい。一般に、最も高いレポーター遺伝子の発現レベルを示す最小の5'隣接領域を備えた構築物は、プロモーターとして識別される。かかるプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され、プロモーターに動作される転写を調節する能力について作用物質を評価するために使用され得る。

【0417】

細胞内に遺伝子を導入及び発現させる方法は、当技術分野で既知である。発現ベクターとの関連では、該ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳類、細菌、酵母、または昆虫の細胞に、当技術分野の任意の方法によって容易に導入することができる。例えば、該発現ベクターは、物理的、化学的、または生物学的手段によって宿主細胞に導入することができる。宿主細胞内へポリヌクレオチドを導入するための物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等が挙げられる。ベクター及び／または外因性核酸を含む細胞の産生方法は、当技術分野で周知である。例えば、S a m b r o o k e t a l . (2001, M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , N e w Y o r k) を参照されたい。宿主細胞内へのポリヌクレオチドの導入のための好ましい方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0418】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための生物学的方法としては、DNA及びRNAベクターの使用が挙げられる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳類、例えば、ヒト細胞に遺伝子を挿入するために最も広く用いられる方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI型、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス等から誘導され得る。例えば、米国特許第5,350,674号及び第5,585,362号を参照されたい。

【0419】

宿主細胞内へポリヌクレオチドを導入するための化学的手段としては、コロイド分散系、例えば、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含めた脂質に基づく系が挙げられる。インビトロ及びインビボでの送達媒体として使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。非ウイルス送達系が利用される場合、例示的な送達媒体はリポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞内への核酸の導入（インビトロ、エキソビボ、またはインビボ）を企図する。別の態様では、該核酸は、脂質と結びついている場合がある。脂質に結びついた核酸は、リポソームの水性内部に封入されても、リポソームの脂質二重層内に散在しても、リポソーム及びオリゴヌクレオチドの両方に

結びついた連結分子を介してリポソームに取り付けられても、リポソーム内に封入されても、リポソームと複合化されても、脂質含有溶液に分散されても、脂質と混合されても、脂質と統合されても、脂質中に懸濁液として含まれても、ミセルとともに含有もしくは複合化されても、または他の場合には脂質と結びついてよい。脂質、脂質／DNA、または脂質／発現ベクターが結びついた組成物は、溶液中ではいかなる特定の構造にも限定されない。例えば、それらは二層構造で、ミセルとして、または「崩壊した」構造で存在してもよい。それらはまた、単に溶液に散在してもよく、サイズも形も均一でない凝集体を形成すると思われる。脂質は、脂肪性の物質であり、天然に存在する脂質でも合成脂質でもよい。例えば、脂質には、細胞質に天然に存在する脂肪小滴、ならびに長鎖脂肪族炭化水素及びそれらの誘導体、例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドを含む化合物のクラスが含まれる。

10

【0420】

使用に適した脂質は、商業的供給源から入手することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, Mo. から入手可能であり、リン酸ジセチル（「DCP」）は、K & K Laboratories (Plainview, N. Y.) から入手可能であり、コレステロール（「Choi」）は、Calbiochem-Behringから入手可能であり、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）及び他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) から入手され得る。脂質のクロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中での原液は、約 -20°C で保存され得る。クロロホルムは、メタノールより容易に蒸発するため、唯一の溶媒として用いられる。

20

「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の生成によって形成される様々な単層または多重膜の脂質媒体を包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重膜及び内側の水性媒体を備えた小胞構造を有することの特徴とし得る。多重膜リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁された場合に自然に生じる。該脂質成分は、自己再編成を経て、閉鎖構造を形成し、当該脂質二重層間に水及び溶解した溶質を封入する (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10)。しかしながら、通常の小胞構造とは溶液中での構造が異なる組成物も包含される。例えば、該脂質は、ミセル構造をとってもよいし、単に脂質分子の不均一な凝集体として存在してもよい。リポフェクタミン・核酸複合体もまた企図される。

30

【0421】

宿主細胞内へ外因性核酸を導入するのに用いられる方法、または他の場合には本開示の阻害剤に細胞を曝露するのに用いられる方法にかかわらず、宿主細胞内での組み換えDNA配列の存在を確認するために様々なアッセイが行われ得る。かかるアッセイとしては、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザン及びノーザンブロット法、RT-PCR、及びPCR、「生化学的」アッセイ、例えば、特定のペプチドの有無を例えば、免疫学的手段（ELISA及びウェスタンブロット法）によって、または本明細書に記載のアッセイによって検出し、本発明の範囲に含まれる作用物質を特定することが挙げられる。

40

【0422】

T細胞源

本発明のT細胞の増殖及び遺伝子改変に先立って、T細胞源を対象から採取する。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含めた複数の起源から採取することができる。本発明のある特定の実施形態では、当技術分野で入手可能な様々なT細胞株が用いられる場合がある。本発明のある特定の実施形態では、T細胞は、当業者に知られる様々な技術、例えば、Ficol (商標) 分離を用いて対象から採取された血液の単位から得ることができる。1つの好ましい実施形態では、個体の循環血液由来の細胞は、アフエレーシスによって採取される。該アフエレーシス産物は、通常、T細胞を含めたリンパ球、単球、顆粒

50

球、B細胞、他の有核白血球細胞、赤血球、及び血小板を含む。1つの実施形態では、アフエーシスによって採取された細胞は、血漿画分を除去し、該細胞をその後の処理段階に適切な緩衝液または媒体に配するために洗浄され得る。本発明の1つの実施形態では、該細胞はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。代替的な実施形態では、該洗浄液は、カルシウムを欠いており、かつ、マグネシウムを欠く場合も2価カチオンのすべてではないがその多くを欠く場合もある。この場合もやはり、驚くべきことに、カルシウムの非存在下での最初の活性化段階は、活性化の拡大につながる。当業者には容易に理解されるように、洗浄段階は当業者に知られる方法によって、例えば、半自動の「フロースルー」遠心分離（例えば、Cobe 2991セルプロセッサー、Baxter Cytomate、またはHaemonetics Cell Saver 5）を用いて、製造業者の指示に従って達成され得る。洗浄後、細胞を様々な生体適合性緩衝液、例えば、Ca²⁺フリーでMg²⁺フリーのPBS、PlasmaLyte A、または、緩衝液を含むもしくは含まない他の生理食塩水に再懸濁され得る。別の方法として、該アフエーシスサンプルの望ましくない成分を除去し、細胞を直接培地に再懸濁してもよい。

10

【0423】

別の実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、単球を、例えば、PERCOLL（商標）勾配を介した遠心分離によって、または向流遠心水簸によって、枯渇させることにより、末梢血リンパ球から単離される。T細胞の特定の亜集団、例えば、CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、及びCD45RO⁺T細胞をさらに、正のまたは負の選択技術によって単離することができる。例えば、1つの実施形態では、T細胞は、抗CD3／抗CD28（すなわち、3×28）結合ビーズ、例えば、DYNABEADS（商標）M-450 CD3／CD28 Tとともに、所望のT細胞の正の選択に十分な期間インキュベートすることによって単離される。1つの実施形態では、該期間は、約30分である。さらなる実施形態では、該期間は、30分～36時間またはそれ以上及びその間のすべての整数値に及ぶ。さらなる実施形態では、該期間は、少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の好ましい実施形態では、該期間は、10～24時間である。1つの好ましい実施形態では、該インキュベーション期間は、24時間である。白血病を有する患者からのT細胞の単離の場合、24時間等のより長いインキュベーション時間の使用により、細胞収率が高まり得る。腫瘍組織または免疫不全の個体から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離するような、他の細胞型と比較してT細胞が少ない任意の状況でT細胞を単離するために、より長いインキュベーション時間を用いてもよい。さらに、より長いインキュベーション時間を用いることで、CD8⁺T細胞の捕捉の効率を高めることができる。したがって、T細胞を該CD3／CD28ビーズに結合させる時間を単に短縮または延長することによって、及び／またはT細胞に対する該ビーズの割合を増加または減少させる（本明細書にさらに記載される）ことによって、T細胞の亜集団が優先的に培養開始時または当該工程の他の時点で選択または反選択され得る。さらに、該ビーズもしくは他の表面上で抗CD3及び／または抗CD28抗体の比を増加もしくは減少させることによって、T細胞の亜集団は、優先的に培養開始時または他の所望の時点で選択または反選択され得る。当業者であれば、本発明の中で複数の選択回もまた使用することができることが認められよう。ある特定の実施形態では、該選択手順を行い、「選択されていない」細胞を活性化及び増殖工程で用いることが望ましい場合がある。「選択されていない」細胞は、さらなる選択回に供することもできる。

20

30

40

【0424】

負の選択によるT細胞集団の濃縮は、負に選択された細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて達成することができる。1つの方法は、負に選択された細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを用いる負磁気免疫接着またはフローサイトメトリーを介した細胞選別及び／または選択である。例えば、負の選択によってCD4⁺細胞を濃縮するためには、モノクローナル抗体カクテルは通常、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD8に対する抗体を含む。ある特定の実施形態では、通常CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR

50

$+$ 、及び $F o x P 3^{+}$ を発現する制御性 T 細胞を濃縮または正に選択することが望ましい場合がある。別の方法として、ある特定の実施形態では、制御性 T 細胞は、抗 C 2 5 結合ビーズまたは他の同様の選択方法によって枯渇される。

【0425】

正または負の選択による所望の細胞の集団の単離のため、細胞濃度及び表面（例えば、ビーズ等の粒子）は変更され得る。ある特定の実施形態では、ビーズと細胞を混合する体積を大幅に減少させ（すなわち、細胞濃度を増加させ）、細胞とビーズを最大に接触させることが望ましい場合がある。例えば、1つの実施形態では、20億個の細胞／m l の濃度が用いられる。1つの実施形態では、10億個の細胞／m l の濃度が用いられる。さらなる実施形態では、1億個超の細胞／m l が用いられる。さらなる実施形態では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、または5000万個の細胞／m l の細胞濃度が用いられる。さらに別の実施形態では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、または1億個の細胞／m l からの細胞濃度が用いられる。さらなる実施形態では、1億2500万または1億5000万個の細胞／m l の濃度を用いることができる。高濃度の使用は、細胞収率、細胞活性化、及び細胞増殖の増加をもたらすことができる。さらに、高細胞濃度の使用は、目的の標的抗原の発現が弱い可能性がある細胞、例えば、C D 2 8 陰性 T 細胞、または多くの腫瘍細胞が存在するサンプル（すなわち、白血病血液、腫瘍組織等）からの細胞のより効率的な捕捉を可能にする。かかる細胞の集団は、治療的価値を有する場合があり、得ることが望ましい。例えば、高細胞濃度の使用は、通常 C D 2 8 の発現が弱い C D 8 $^{+}$ T 細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0426】

関連する実施形態では、より低濃度の細胞を使用することが望ましい場合がある。T 細胞と表面（例えば、ビーズ等の粒子）の混合物を大幅に希釈することによって、該粒子と細胞間の相互作用が最小化される。これは、該粒子に結合される所望の抗原を豊富に発現する細胞を選択する。例えば、C D 4 $^{+}$ T 細胞はハイレベルの C D 2 8 を発現し、希釈濃度において、C D 8 $^{+}$ T 細胞より効率的に捕捉される。1つの実施形態では、使用される細胞濃度は 5×10^6 / m l である。他の実施形態では、使用される濃度は約 1×10^5 / m l ~ 1×10^6 / m l 、及びその間の任意の整数値であり得る。

【0427】

他の実施形態では、該細胞は、回転装置上で様々な長さの時間、様々な速度で、2 ~ 10 °C または室温のいずれかでインキュベートされ得る。

【0428】

刺激用の T 細胞は、洗浄段階の後、凍結させることもできる。理論に拘束されることを望むものではないが、凍結及びそれに続く解凍段階は、当該細胞集団の顆粒球及びある程度の単球を除去することによってより均一な産物を提供する。血漿及び血小板を除去する洗浄段階の後、該細胞は、凍結溶液に懸濁され得る。多くの凍結溶液及びパラメータが当技術分野で知られており、これに関して有用であるが、1つの方法は、20 % D M S O 及び 8 % ヒト血清アルブミンを含む P B S 、または、10 % デキストラン 40 及び 5 % デキストロース、20 % ヒト血清アルブミン及び 7 . 5 % D M S O 、もしくは 31 . 25 % P l a s m a l y t e - A 、31 . 25 % デキストロース 5 % 、0 . 45 % N a C l 、10 % デキストラン 40 及び 5 % デキストロース、20 % ヒト血清アルブミン、ならびに 7 . 5 % D M S O を含む培地、または例えば、H e s p a n 及び P l a s m a l y t e A を含む他の適切な細胞凍結媒体の使用を含み、該細胞をその後 - 80 °C に毎分ある速度で凍結し、液体窒素貯蔵タンクの気相で保存する。他の制御凍結法は、- 20 °C でのまたは液体窒素中での制御されていない即時凍結と同様に使用され得る。

【0429】

ある特定の実施形態では、凍結保存細胞は、本明細書に記載の通り解凍及び洗浄され、室温で1時間静置され、その後本発明の方法を用いて活性化される。

【0430】

本発明の中で同様に企図されるのは、本明細書に記載の増殖細胞が必要とされる前の期間における対象からの血液サンプルまたはアフエーシス産物の採取である。したがって、増殖させる細胞源は、任意の必要な時点で採取され、所望の細胞、例えば、T細胞は、T細胞療法で恩恵を受ける様々な疾患または状態、例えば、本明細書に記載のそれらのためのT細胞療法における後の使用のために単離及び凍結される。1つの実施形態では、血液サンプルまたはアフエーシスは、概して健康な対象から採取される。ある特定の実施形態では、血液サンプルまたはアフエーシスは、疾患の発症のリスクがあるがまだ発病していない概して健康な対象から採取し、目的の細胞を後の使用のために単離及び凍結する。ある特定の実施形態では、該T細胞を増殖させ、凍結し、その後になって使用してもよい。ある特定の実施形態では、サンプルは、本明細書に記載の特定の疾患の診断の直後、いずれかの治療の前の患者から採取される。さらなる実施形態では、該細胞は、薬剤、例えば、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノラート、及びFK506、抗体、または他の免疫消失薬、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、ならびに放射線照射での治療が挙げられるがこれに限定されない様々な関連する治療法に先立って、対象からの血液サンプルまたはアフエーシスから単離される。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニユーリンを阻害する（シクロスポリン及びFK506）か、または成長因子によって誘導されるシグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Liu et al., Cell 66:807-815, 1991, Henderson et al., Immun 73:316-321, 1991, Bierer et al., Curr. Opin. Immun 5:763-773, 1993）。さらなる実施形態では、該細胞は、患者のために単離され、凍結され、後に骨髓もしくは幹細胞移植、いずれかの化学療法薬、例えば、フルダラビンを使用したT細胞除去療法、外照射療法（XRT）、シクロホスファミド、または抗体、例えば、OKT3もしくはCAMPATHと組み合わせ（例えば、その前、それと同時、またはその後）に使用される。別の実施形態では、該細胞は、B細胞除去療法、例えば、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサン後の治療のための後の使用に先立って単離され、そのために凍結され得る。

10

20

30

40

50

【0431】

本発明のさらなる実施形態では、T細胞は、治療の後に、患者から直接採取される。その点について、ある特定のがん治療の後、免疫系に損傷を与える薬物での特定の治療において、治療の直後、患者が当該治療から通常回復する期間に、得られたT細胞の品質は、エキソピボでのそれらの増殖能が最適であるか、または改善されている可能性がある。同様に、本明細書に記載の方法を用いたエキソピボ操作の後、これらの細胞は、生着及びインピボ増殖の向上に好ましい状態にあり得る。したがって、本発明の中に、T細胞を含めた血液細胞、樹状細胞、または造血系の他の細胞をこの回復期に採取することが企図される。さらに、ある特定の実施形態では、動員（例えば、GM-CSFでの動員）及び前処置レジメンを用いて、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生、及び／または増殖が促進される対象における、特に治療後の所定の時間窓での条件を創出することができる。例示的な細胞型としては、T細胞、B細胞、樹状細胞、及び免疫系の他の細胞が挙げられる。

【0432】

T細胞の活性化及び増殖

所望のCARを発現させるための該T細胞の遺伝子改変の前後にかかわらず、該T細胞は、例えば、米国特許第6,352,694号、第6,534,055号、第6,905,680号、第6,692,964号、第5,858,358号、第6,887,466号、第6,905,681号、第7,144,575号、第7,067,318号、第7,172,869号、第7,232,566号、第7,175,843号、第5,883,223号、第6,905,874号、第6,797,514号、第6,867,041号、及び第7,572,631号に記載の方法を用いて通常活性化及び増殖され得る。い

くつかの実施形態では、T細胞（例えば、 $\gamma\delta$ T細胞）のエキソビボ増殖のための方法及び組成物としては、各々の内容が参照により全体として本明細書に組み込まれるWO 2016/081518、WO 2017/197347、WO 2019/099744、及びWO 2020/117862に記載のものが挙げられるがこれらに限定されない。

【0433】

一般に、本発明のT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する作用物質を付着された表面及び該T細胞の表面の共刺激分子を刺激するリガンドとの接触によって増殖する。特に、T細胞集団は、本明細書に記載の通り、例えば、抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片、もしくは表面に固定化された抗CD2抗体との接触によって、またはカルシウムイオノフォアと組み合わせてプロテインキナーゼC活性化剤（例えば、ブリオスタチン）との接触によって刺激され得る。T細胞表面のアクセサリー分子の共刺激に対しては、該アクセサリー分子に結合するリガンドが用いられる。例えば、T細胞集団は、該T細胞の増殖を刺激するために適切な条件下、抗CD3抗体及び抗CD28抗体と接触され得る。CD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞のいずれかの増殖を刺激するためには、抗CD3抗体及び抗CD28抗体。抗CD28抗体の例としては、9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone, Besancon, France）が挙げられ、当技術分野で一般に知られる他の方法を用いてもよい（Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998、Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999、Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999）。

10

20

【0434】

本発明のT細胞が $\gamma\delta$ T細胞を含むある特定の実施形態では、該 $\gamma\delta$ T細胞は、WO 2017/197347に記載の方法及び組成物に従って選択的に増殖され得る。

【0435】

ある特定の実施形態では、該T細胞に対する一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、異なるプロトコルによって提供され得る。例えば、各シグナルを提供する作用物質は、溶液中に存在する場合もあれば、表面に結合される場合もある。表面に結合される場合、該作用物質は、同じ表面に（すなわち、「シス」構成で）結合されることも、別々の表面に（すなわち、「トランス」構成で）結合されることもある。別の方法として、一方の作用物質を表面に結合し、他方の作用物質を溶液に含めてもよい。1つの実施形態では、該共刺激シグナルを提供する作用物質を、細胞表面に結合させ、該一次活性化シグナルを提供する作用物質を溶液に含めるか、または表面に結合させる。ある特定の実施形態では、両方の作用物質を溶液に含めることができる。別の実施形態では、該作用物質は、可用性の形態であり、その後表面、例えば、Fc受容体もしくは抗体を発現する細胞または該作用物質に結合する他の結合物質に架橋されてもよい。この点について、例えば、本発明におけるT細胞の活性化及び増殖での使用に企図される人工抗原提示細胞（aAPC）に関しては、米国特許出願公開第20040101519号及び第20060034810号を参照されたい。

30

40

【0436】

1つの実施形態では、該2つの作用物質は、ビーズに、すなわち、同じビーズに、すなわち、「シス」で、または別々のビーズに、すなわち、「トランス」で固定化される。例として、該一次活性化シグナルを提供する作用物質は、抗CD3抗体またはその抗原結合断片であり、該共刺激シグナルを提供する作用物質は、抗CD28抗体またはその抗原結合断片であり、両方の作用物質は、同じビーズに等しい分子の量で共に固定化される。1つの実施形態では、CD4⁺T細胞の増殖及びT細胞の成長のためのビーズに結合した各抗体の1:1比が使用される。本発明のある特定の態様では、該ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比は、T細胞の増殖の増加が、1:1の比を使用して観察された増殖と比較して観察されるように使用される。1つの特定の実施形態では、1:1の比を使用

50

して観察された増殖と比較して約1～約3倍の増加が観察される。1つの実施形態では、該ビーズに結合したCD3：CD28抗体の比は、100：1～1：100及びその間のすべての整数値に及ぶ。本発明の1つの態様では、抗CD3抗体よりも多い抗CD28抗体が該粒子に結合し、すなわち、CD3：CD28の比は1未満である。本発明のある特定の実施形態では、該ビーズに結合した抗CD28抗体と抗CD3抗体の比は、2：1より高い。1つの特定の実施形態では、ビーズに結合した抗体の1：100のCD3：CD28比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の1：75のCD3：CD28比が使用される。さらなる実施形態では、ビーズに結合した抗体の1：50のCD3：CD28比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の1：30のCD3：CD28比が使用される。1つの好ましい実施形態では、ビーズに結合した抗体の1：10のCD3：CD28比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の1：3のCD3：CD28比が使用される。さらに別の実施形態では、ビーズに結合した抗体の3：1のCD3：CD28比が使用される。

10

20

30

40

【0437】

粒子対細胞の1：500～500：1の比及びその間の任意の整数値が、T細胞または他の標的細胞を刺激するのに使用され得る。当業者には容易に理解され得るように、該粒子対細胞の比は、該標的細胞に対する粒子のサイズに依存し得る。例えば、小さいサイズのビーズは、少数の細胞を結合するのみであるが、より大きなビーズは、多くを結合することができる。ある特定の実施形態では、該細胞対粒子の比は、1：100～100：1及びその間の任意の整数値に及び、さらなる実施形態では、該比は、1：9～9：1及びその間の任意の整数値を含み、それを使用してT細胞を刺激することもできる。T細胞刺激をもたらす抗CD3及び抗CD28結合粒子のT細胞に対する比は、上記のように変化し得るが、ある特定の好ましい値としては、1：100、1：50、1：40、1：30、1：20、1：10、1：9、1：8、1：7、1：6、1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、及び15：1を含み、1つの好ましい比は、少なくとも1：1粒子／T細胞である。1つの実施形態では、粒子対細胞の1：1以下の比が使用される。1つの特定の実施形態では、好ましい粒子：細胞比は、1：5である。さらなる実施形態では、該粒子対細胞の比は、刺激が行われる日によって異なり得る。例えば、1つの実施形態では、該粒子対細胞の比は、1日目は1：1～10：1であり、その後さらなる粒子が該細胞に毎日または1日おきに最大10日目まで最終的な比が1：1～1：10で（追加が行われる日の細胞数に基づいて）追加される。1つの特定の実施形態では、該粒子対細胞の比は、刺激の1日目は1：1であり、刺激の3日目及び5日目で1：5に調整される。別の実施形態では、粒子は、最終的な比が刺激の1日目で1：1、ならびに3日目及び5日目で1：5になるように、毎日または1日おきに追加される。別の実施形態では、該粒子対細胞の比は、刺激の1日目は2：1であり、刺激の3日目及び5日目で1：10に調整される。別の実施形態では、粒子は、最終的な比が刺激の1日目で1：1、ならびに3日目及び5日目で1：10になるように、毎日または1日おきに追加される。当業者には、様々な他の比が、本発明における使用に適している可能性があることが理解されよう。特に、比は、粒子のサイズならびに細胞のサイズ及び型に応じて変化する。

【0438】

本発明のさらなる実施形態では、該細胞、例えば、T細胞は、作用物質でコーティングしたビーズと混合され、該ビーズ及び該細胞は続いて分離され、その後該細胞は培養される。代替的な実施形態では、培養の前に、該作用物質でコーティングされたビーズ及び細胞は、分離されないが、ともに培養される。さらなる実施形態では、該ビーズ及び細胞は、磁力等の力を加えることによって最初に濃縮され、細胞表面マーカーのライゲーシヨンの増加がもたらされ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0439】

例として、細胞表面タンパク質は、抗CD3及び抗CD28が結合する常磁性ビーズ（3×28個のビーズ）をT細胞と接触させることによってライゲートされ得る。1つの実

50

施形態では、該細胞（例えば、 $10^4 \sim 10^9$ 個の T 細胞）及びビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T 常磁性ビーズ、1:1 の比）が、緩衝液、好ましくは、PBS（カルシウム及びマグネシウム等の二価陽イオンなし）中で混合される。この場合もやはり、当業者には、任意の細胞濃度が使用され得ることが容易に理解され得る。例えば、該標的細胞は、該サンプル中では非常にまれでありかつ該サンプルの 0.01% しか含まれない場合もあれば、全サンプル（すなわち、100%）が目的の標的細胞から構成される場合もある。したがって、任意の細胞数が本発明の一環である。ある特定の実施形態では、粒子と細胞を混合する体積を大幅に減少させ（すなわち、細胞濃度を増加させ）、細胞と粒子を最大に接触させることが望ましい場合がある。例えば、1つの実施形態では、約 20 億個の細胞/ml の濃度が用いられる。別の実施形態では、1 億個超の細胞/ml が用いられる。さらなる実施形態では、1000 万、1500 万、2000 万、2500 万、3000 万、3500 万、4000 万、4500 万、または 5000 万個の細胞/ml の細胞濃度が用いられる。さらに別の実施形態では、7500 万、8000 万、8500 万、9000 万、9500 万、または 1 億個の細胞/ml からの細胞濃度が用いられる。さらなる実施形態では、1 億 2500 万または 1 億 5000 万個の細胞/ml の濃度を用いることができる。高濃度の使用は、細胞収率、細胞活性化、及び細胞増殖の増加をもたらすことができる。さらに、高細胞濃度の使用は、目的の標的抗原の発現が弱い可能性がある細胞、例えば、CD28 陰性 T 細胞のより効率的な捕捉を可能にする。ある特定の実施形態では、かかる細胞の集団は、治療的価値を有する場合があります、得ることが望ましい。例えば、高細胞濃度の使用は、通常 CD28 の発現が弱い CD8+ T 細胞のより効率的な選択を可能にする。

10

20

【0440】

本発明の 1つの実施形態では、該混合物は、数時間（約 3 時間）～約 14 日間またはその間の任意の時間単位の整数値にわたって培養され得る。別の実施形態では、該混合物は、21 日間培養され得る。本発明の 1つの実施形態では、該ビーズ及び該 T 細胞は、約 8 日間一緒に培養される。別の実施形態では、該ビーズ及び T 細胞は、2～3 日間一緒に培養される。T 細胞の培養時間が 60 日以上になり得るように、いくつかの刺激サイクルも所望され得る。T 細胞の培養に適切な条件には、血清（例えば、ウシ胎児またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF、及び TNF- α 、または、当業者に既知の細胞の成長用の任意の他の添加剤を含めた増殖及び生存能力のために必要な因子を含んでいてもよい適切な培地（例えば、基礎培地もしくは RPMI 培地 1640 または、X-vivo 5, (Lonza)）が含まれる。細胞成長のための他の添加剤としては、界面活性剤、プラスマネート、及び還元剤、例えば、N-アセチルシステイン及び 2-メルカプトエタノールが挙げられるがこれらに限定されない。培地としては、アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム、及びビタミンが添加され、無血清であるか、または適量の血清（もしくは血漿）もしくは一定のホルモニー式、及び／または T 細胞の成長及び増殖に十分な量のサイトカイン（複数可）が補充された RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、及び X-Vivo 20、Optimizer を挙げることができる。抗生物質、例えば、ペニシリン及びストレプトマイシンは、実験用の培養にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養には含まれない。標的細胞は、成長を支援するのに必要な条件下、例えば、適温（例えば、37℃）及び大気（例えば、空気プラス）で維持される。

30

40

【0441】

様々な刺激時間に曝露された T 細胞は、異なる特徴を呈し得る。例えば、通常の血液またはアフエレーションにより得られた末梢血単核細胞産物は、ヘルパー T 細胞集団（TH、CD4⁺）を有し、これは、細胞傷害性またはサブレッサー T 細胞集団（Tc、CD8⁺）より大きい。CD3 及び CD28 受容体の刺激による T 細胞のエキソピボ増殖により、約 8～9 日目より前に主に TH 細胞からなる T 細胞集団が産生される一方で、約 8～9 日目後、該 T 細胞集団は、次第に多くの Tc 細胞集団を含む。したがって、治療目的に応じ

50

て、対象に T H 細胞から主に構成される T 細胞集団を注入することが有利な場合がある。同様に、抗原特異的 T c 細胞サブセットが単離された場合、このサブセットをより大きな程度に増殖することが有益な場合がある。

【0442】

さらに、C D 4 及び C D 8 マーカーに加えて他の表現型マーカーが細胞増殖プロセスの経過中に著しく変化するが、大部分、再現可能に変化する。したがって、かかる再現性により、特定の目的のために活性化 T 細胞産物を調整する能力が有効になる。

【0443】

治療への応用

本発明は、レンチウイルスベクター（L V）で形質導入された細胞（例えば、T 細胞）を包含する。例えば、該 L V は、特定の抗体（例えば、G P C 3）の抗原認識ドメインを C D 3 -ゼータ、C D 2 8、4 -1 B B、またはこれらの任意の組み合わせの細胞内ドメインと組み合わせた C A R をコードする。したがって、場合によっては、形質導入された T 細胞は、C A R 介在性 T 細胞応答を誘発することができる。

【0444】

本発明は、一次 T 細胞の特異性を腫瘍抗原に向けなおすための C A R の使用を提供する。したがって、本発明はまた、哺乳類における標的細胞集団または組織に対する T 細胞媒介免疫応答を刺激する方法も提供し、該方法は、該哺乳類に対して、C A R を発現する T 細胞を投与するステップを含み、該 C A R は、所定の標的（例えば、G P C 3）と特異的に相互作用する結合部分、例えば、ヒト C D 3 ゼータの細胞内ドメインを含むゼータ鎖部分、及び共刺激シグナル領域を含む。

【0445】

1 つの実施形態では、本発明は、T 細胞が、C A R を発現するように遺伝子改変され、該 C A R T 細胞が、それを必要とするレシピエントに注入される細胞治療の型を含む。注入された細胞は、該レシピエントの腫瘍細胞を殺傷することができる。抗体療法とは異なり、C A R T 細胞は、インビボで複製して長期間持続することが可能であり、それにより、持続的な腫瘍制御がもたらされ得る。

【0446】

1 つの実施形態では、本発明の C A R T 細胞は、ロバストなインビボでの T 細胞増殖を果たすことができ、長時間持続することができる。別の実施形態では、本発明の C A R T 細胞は、任意のさらなる腫瘍形成または成長を阻害するように再活性化され得る特定の記憶 T 細胞に発展する。

【0447】

いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、該 C A R 修飾 T 細胞によって誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動的免疫応答でも受動的免疫応答でもよい。さらに、該 C A R が媒介する免疫応答は、C A R 修飾 T 細胞が、該 C A R における抗原結合部分に特異的な免疫応答を誘導する養子免疫療法アプローチの一部であり得る。

【0448】

治療され得るがんとしては、血管新生されていない腫瘍、またはまだ実質的に血管新生されていない、及び血管新生された腫瘍が挙げられる。該がんは、非固形腫瘍（例えば、血液系腫瘍、例えば、白血病及びリンパ腫）を含む場合もあれば、固形腫瘍を含む場合もある。本発明の C A R で治療されるがんの型としては、癌腫、芽細胞腫、及び肉腫、ならびにある特定の白血病またはリンパ腫悪性腫瘍、良性及び悪性の腫瘍、ならびに悪性腫瘍、例えば、肉腫、癌腫、及び黒色腫が挙げられるがこれらに限定されない。成人の腫瘍／がん及び小児の腫瘍／がんもまた含まれる。ある特定の実施形態では、C A R -T 細胞は、非血液腫瘍、例えば、乳房、C N S、及び皮膚悪性腫瘍から生じる固形腫瘍に罹患した患者に治療的に使用され得る。血液癌は、血液または骨髄のがんである。血液（または血行性）がんの例としては、急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性（myelocytic）白血病、急性骨髄性（myelogenous）白血病、ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、及び赤白血病）、慢性白血病（例えば、

慢性骨髓球性（顆粒球性）白血病、慢性骨髓性白血病、及び慢性リンパ球性白血病）を含めた白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（無痛性及び高悪性度型）、多発性骨髓腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髓異形成症候群、有毛細胞白血病、ならびに骨髓異形成が挙げられる。

【0449】

固形腫瘍は、嚢胞や液体領域を通常は含まない異常な組織の塊である。固形腫瘍は、良性の場合も悪性の場合もある。異なる型の固形腫瘍は、それらを形成する細胞の型にちなんで命名される（例えば、肉腫、癌腫、及びリンパ腫）。固形腫瘍、例えば、肉腫及び癌腫の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、及び他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性疾患、膵臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、セミノーマ、膀胱癌、黒色腫、ならびにCNS腫瘍（例えば、神経膠腫（例えば、脳幹神経膠腫及び混合性神経膠腫）、膠芽細胞腫（多形性膠芽腫としても知られる）、星状細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽腫、神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、及び脳転移）が挙げられる。

10

【0450】

1つの態様では、CAR T細胞は、エキソビボでの免疫化に使用され得る。エキソビボでの免疫化に関しては、哺乳類への細胞の投与の前に、インビトロで以下のうちの少なくとも1つが行われる：i) 該細胞の増殖、ii) CARをコードする核酸を該細胞に導入すること、及び／またはiii) 該細胞の凍結保存。

20

【0451】

エキソビボ手順は、当技術分野で周知であり、より詳細に以下に論じる。簡潔には、細胞を哺乳類（好ましくは、ヒト）から単離し、本明細書に開示するCARを発現するベクターで遺伝子改変する（すなわち、インビトロで形質導入またはトランスフェクトする）。該CAR修飾細胞を哺乳類レシピエントに投与し、治療効果を得ることができる。該哺乳類レシピエントは、ヒトでよく、該CAR修飾細胞は、該レシピエントに関して自己移植の場合がある。別の方法として、該細胞は、該レシピエントに関して同種異系、同系、または異種の場合がある。

30

【0452】

造血幹及び前駆細胞のエキソビボでの増殖手順は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,199,942号に記載されており、本発明の細胞に適用することができる。他の適切な方法は当技術分野で知られており、したがって、本発明は、該細胞のいかなる特定のエキソビボでの増殖方法にも限定されない。簡潔には、T細胞のエキソビボでの培養及び増殖は：（1）末梢血採取または骨髓外植片から、哺乳類由来のCD34+造血幹及び前駆細胞を採取し、（2）かかる細胞をエキソビボで増殖させることを含む。米国特許第5,199,942号に記載の細胞増殖因子に加えて、FLT3-L、IL-1、IL-3、及びc-kitリガンド等の他の因子を該細胞の培養及び増殖のために用いることができる。γδ T細胞の特定の亜集団のエキソビボでの増殖も本開示の範囲内であり、その方法及び組成は、参照により本明細書に組み込まれるWO 2017/197347に記載されている。

40

【0453】

エキソビボでの免疫化において、細胞ベースのワクチンの使用に加えて本発明は、患者の抗原に対する免疫応答を誘発するインビボでの免疫化のための組成物及び方法もまた提供する。

【0454】

本発明のCAR修飾T細胞は、単独で投与しても、希釈剤及び／または他の成分、例えば、IL-2もしくは他のサイトカイン、または細胞集団と組み合わせて医薬組成物とし

50

て投与してもよい。簡潔には、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載の標的細胞集団を、1つ以上の医薬的にもしくは生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含み得る。かかる組成物は、緩衝液、例えば、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水等、炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、スクロースもしくはデキストラン、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドもしくはアミノ酸、例えば、グリシン、酸化防止剤、キレート剤、例えば、EDTAもしくはグルタチオン、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、及び保存料を含んでよい。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与用に製剤化される。

【0455】

本発明の医薬組成物は、治療される（または予防される）疾患に適切な方法で投与され得る。投与の量及び頻度は、当該患者の状態ならびに該患者の疾患のタイプ及び重症度等の要因によって決定されるが、適切な用量は臨床試験で決定される場合がある。

【0456】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、当該患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染もしくは転移の程度、及び状態の個体差を考慮して医師によって決定され得る。本明細書に記載のT細胞を含む医薬組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、好ましくは、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重で、これらの範囲内のすべての整数値を含めた用量で投与され得るということが一般に言える。また、T細胞組成物は、これらの用量において複数回投与され得る。該細胞は、免疫療法で広く知られている注入技術を用いて投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988参照）。特定の患者に最適な用量及び治療レジメンは、該患者を疾患の兆候について観察し、それに応じて治療を調整することによって、医学分野の当業者によって容易に決定され得る。

【0457】

ある特定の実施形態では、活性化T細胞を対象に投与し、その後続いて再採血し（またはアフエーシスが行われている）、本発明に従ってそこからT細胞を活性化し、これらの活性化及び増殖されたT細胞を該患者に再注入することが望ましい場合がある。このプロセスは数週間ごとに複数回行われ得る。ある特定の実施形態では、T細胞は、10cc～400ccの採血から活性化することができる。ある特定の実施形態では、T細胞は、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、または100ccの採血から活性化される。理論に拘束されるものではないが、この複数回の採血／複数回の再注入のプロトコルは、ある特定のT細胞の集団の選出に役立ち得る。目的の組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、経口摂取、輸液、注入、または移植を含めた任意の都合の良い方法で行ってよい。本明細書に記載の組成物は、患者に対して、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内（i.v.）注射により、または腹腔内に投与され得る。1つの実施形態では、本発明のT細胞組成物は、患者に対して、皮内または皮下注射によって投与される。別の実施形態では、本発明のT細胞組成物は、好ましくは、i.v.注射によって投与される。該T細胞組成物は、腫瘍、リンパ節、または感染部位に直接注入してもよい。

【0458】

本発明のある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法、またはT細胞が治療レベルまで拡大される当技術分野で既知の他の方法を使用して活性化及び拡大された細胞は、抗ウイルス療法、すなわち、シドフォビル及びインターロイキン-2等の薬剤での治療、MS患者のためのシタラビン（ARA-Cとしても知られる）もしくはナタリズマブ治療、または乾癬患者のためのエファリズマブ治療、またはPML患者のための他の治療が挙げられるがこれらに限定されない様々な関連する治療法と組み合わせて（例えば、その前に、それと同時に、またはその後）患者に投与される。。さらなる実施形態では、本発明のT細胞は、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノラート、及びFK506、抗体、または他の免疫消失薬

、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体もしくは他の抗体療法、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、ならびに放射線照射と組み合わせて使用され得る。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害する（シクロスポリン及びFK506）か、または成長因子によって誘導されるシグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Liu et al., Cell 66: 807-815, 1991, Henderson et al., Immun 73: 316-321, 1991, Bierer et al., Curr. Opin. Immun 5: 763-773, 1993）。さらなる実施形態では、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、いずれかの化学療法薬、例えば、フルダラビンを使用したT細胞除去療法、外照射療法（XRT）、シクロホスファミド、または抗体、例えば、OKT3もしくはCAMPATHと組み合わせて（例えば、その前、それと同時、またはその後）患者に投与される。別の実施形態では、本発明の細胞組成物は、B細胞除去療法、例えば、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサン後に投与される。例えば、1つの実施形態では、対象は、標準的な大量化学療法での治療に続いて末梢血幹細胞移植を受けてもよい。ある特定の実施形態では、該移植の後、対象は、本発明の拡大させた免疫細胞の注入を受ける。さらなる実施形態では、拡大させた細胞は、手術の前または後に投与される。

10

【0459】

患者に施される上記治療の用量は、治療される状態の正確な性質及び治療のレシピエントによって変わる。ヒトへの投与に対する用量のスケールリングは、当該分野で認められた慣行に従って行うことができる。例えば、CAMPATHの用量は通常、成人患者に対して、1～約100mgの範囲であり、通常、1～30日間、毎日投与される。ある特定の実施形態では、1日当たり1～10mgが使用される。他の実施形態では、より大量の1日当たり最大40mgが用いられてもよい（例えば、米国特許第6,120,766号に記載されている）。

20

【0460】

免疫複合体

本発明はまた、細胞毒性薬、例えば、化学療法剤、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはその断片）にコンジュゲートされた抗体、あるいは、放射性同位体にコンジュゲートされた抗体（すなわち、放射性複合体）を含む免疫複合体（同義で「抗体薬物複合体」または「ADC」とも呼ばれる）にも関する。

30

【0461】

ある特定の実施形態では、免疫複合体は、抗体及び化学療法剤または他の毒素を含む。かかる免疫複合体の生成において有用な化学療法剤は、上記で説明されている。使用され得る酵素的に活性な毒素及びそれらの断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginosa*由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、*Jianqintan*タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、*momordica charantia*の阻害物質、クルシン、クロチン、*sapaonarria officinalis*の阻害物質、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコセンが挙げられる。様々な放射性核種が放射性コンジュゲート抗体の産生に利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re が挙げられる。該抗体と細胞毒性薬の複合体は、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、アジプイミド酸ジメチルHCL）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビ

40

50

スージアゾニウム誘導体（例えば、ビスー（*p*-スージアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリレン2, 6-ジイソシアネート）、及びビスー活性フッ素化合物（例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン）を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素を、V i t e t t a e t a l . , S c i e n c e 238:1098 (1987)に記載の通りに調製することができる。炭素-14標識 *l*-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（M X-D T P A）は、抗体への放射性ヌクレオチドの複合のための例となるキレート剤である。W O 94/11026を参照されたい。

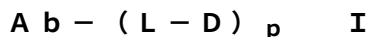
【0462】

抗体と1つ以上の低分子毒素、例えば、カリケアマイシン、オーリスタチンペプチド、例えば、モノメチルオーリスタチン（M M A E）（ドラスタチンの合成アナログ）、マイタンシノイド、例えば、D M 1、トリコテン（*t r i c h o t h e n e*）、及びC C 1065、ならびに毒素活性を有するこれら毒素の誘導体との複合体もまた、本明細書で企図される。毒素のさらなる非限定的な例としては、W O 2014144871に記載されるものが挙げられ、その開示は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0463】

例示的な免疫複合体-抗体薬物複合体

本発明の免疫複合体（または「抗体薬物複合体」（「A D C」））は、下記式 I であり得る。式中、抗体は、任意成分のリンカー（L）を介して1つ以上の薬物部分（D）にコンジュゲート（すなわち、共有結合）している。A D C は、*t h i o* M A b 薬物複合体（T D C）を含み得る。



【0464】

したがって、該抗体は、直接またはリンカーを介して薬物にコンジュゲートされ得る。式 I において、*p* は、抗体当たりの薬物部分の平均数であり、これは、例えば、抗体当たり約1~約20個の薬物部分、及び特定の実施形態では、抗体当たり1~約8個の薬物部分に及び得る。本発明は、式 I の抗体薬物化合物の混合物を含む組成物を含み、ここで、抗体当たりの平均薬物担持は、約2~約5、または約3~約4である。

【0465】

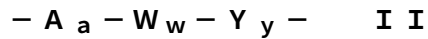
a. 例示的なリンカー

リンカーは、1つ以上のリンカー成分を含み得る。例示的なリンカー成分としては、6-マレイミドカプロイル（「M C」）、マレイミドプロパノイル（「M P」）、バリナーシトルリン（「*v a l - c i t*」または「*v c*」）、アラニン-フェニルアラニン（「*a l a - p h e*」）、*p*-アミノベンジルオキシカルボニル（「P A B」）、及びリンカー試薬とのコンジュゲーションから得られるもの、すなわち、リンカー部分4-メルカプトペンタン酸を形成するN-スクシンイミジル4-（2-ピリジルチオ）ペンタノエート（「S P P」）、リンカー部分4-（（2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル）メチル）シクロヘキサンカルボン酸を形成するN-スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1カルボキシレート（「S M C C」、本明細書では「M C C」とも呼ばれる）、リンカー部分4-メルカプトブタン酸を形成する2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル4-（ピリジン-2-イルジスルファニル）ブタノエート（「S P D B」）、N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（「S I A B」）、1つ以上の繰り返し単位としてのエチレンオキシ-CH₂CH₂O-（「E O」または「P E O」）が挙げられる。さらなるリンカー成分が当技術分野で知られており、いくつかは本明細書に記載されている。様々なリンカー成分が当技術分野で知られており、このうちのいくつかを以下に記載する。

【0466】

リンカーは、細胞での薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー（例えば、ヒドラゾン）、プロテアーゼ感受性（例えば、ペプチダーゼ感受性）リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド

含有リンカー (Char i et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)、米国特許第5,208,020号) が使用され得る。ある特定の実施形態では、リンカーは、以下の式 I I に示されるものである：

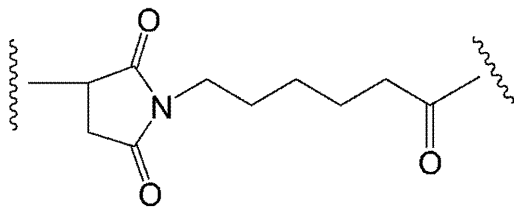


式中、A は、ストレッチャー単位であり、a は、0～1 の整数であり、W は、アミノ酸単位であり、w は、0～12 の整数であり、Y はスペーサー単位であり、y は、0、1、または2であり、Ab、D、及びp は、上記式 I で定義されるものである。かかるリンカーの例示的な実施形態は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる US 2005-0238649 A I に記載されている。

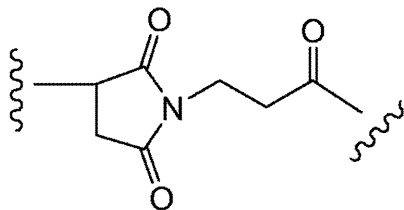
【0467】

いくつかの実施形態では、リンカー成分は、抗体を別のリンカー成分または薬物部分に連結する「ストレッチャー単位」を含み得る。例示的なストレッチャー単位を、以下に示す（波線は、抗体への共有結合の部位を示す）：

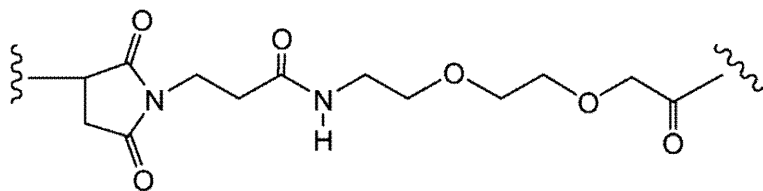
【化1】



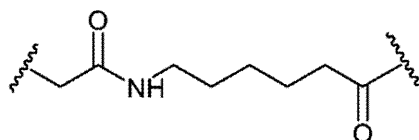
MC



MP



MPEG



【0468】

いくつかの実施形態では、リンカー成分は、アミノ酸単位を含み得る。1つのかかる実施形態では、該アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの切断を可能にし、それによって、リソソーム酵素等の細胞内プロテアーゼへの曝露時に免疫複合体から薬物が容易に放出される。例えば、Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 を参照されたい。例となるアミノ酸単位としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、及びペンタペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。例示的なジペプチドとしては、バリン-シトルリン (vc もしくは val-cit)、アラニン-フェニルアラニン (af もしくは ala-phen)、フェニル

アラニンーリジン (f kもしくはp h e - l y s)、またはNーメチルーバリンーシトルリン (M e - v a l - c i t) が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、グリシンーバリンーシトルリン (g l y - v a l - c i t) 及びグリシンーグリシンーグリシン (g l y - g l y - g l y) が挙げられる。アミノ酸単位は、天然に存在するアミノ酸残基、ならびに微量アミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸アナログ、例えば、シトルリンを含み得る。アミノ酸単位は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C、及びD、またはプラスミンプロテアーゼによる、酵素的切断のために設計し、それらの選択性を最適化することができる。

【0469】

いくつかの実施形態では、リンカー成分は、該抗体を薬物部分に、直接、またはストレッチャー単位及び／またはアミノ酸単位によってのいずれかで連結する「スペーサー」単位を含み得る。スペーサー単位は、「自壊性」でも「非自壊性」でもよい。「非自壊性」スペーサー単位は、ADCの酵素的（例えば、タンパク質分解）切断後に該スペーサー単位の一部またはすべてが該薬物部分に結合したままであるものである。非自壊性スペーサー単位の例としては、グリシンスペーサー単位及びグリシンーグリシンスペーサー単位が挙げられるがこれらに限定されない。配列特異的な酵素的切断に感受性のペプチドスペーサーの他の組み合わせもまた企図される。例えば、グリシンーグリシンスペーサー単位を含むADCの腫瘍細胞関連プロテアーゼによる酵素的切断は、グリシンーグリシンー薬物部分を当該ADCの残りの部分から放出させる。1つのかかる実施形態では、該グリシンーグリシンー薬物部分は、その後腫瘍細胞で別の加水分解段階に供され、ひいては該薬物部分から該グリシンーグリシンスペーサー単位が切断される。

【0470】

「自壊性」スペーサー単位は、別の加水分解段階なしで該薬物部分を放出させる。ある特定の実施形態では、リンカーのスペーサー単位は、pーアミノベンジル単位を含む。1つのかかる実施形態では、pーアミノベンジルアルコールは、アミノ酸単位にアミド結合を介して結合し、カルバメート、メチルカルバメート、またはカーボネートがベンジルアルコールと細胞毒性薬の間に形成される。例えば、Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103を参照されたい。1つの実施形態では、該スペーサー単位は、pーアミノベンジルオキシカルボニル (PAB) である。ある特定の実施形態では、pーアミノベンジル単位のフェニレン部分は、Qmで置換され、ここで、Qは、-C i -C sアルキル、-O- (C i -C sアルキル)、-ハロゲン、-ニトロまたは-シアノであり、mは、0~4に及ぶ整数である。自壊性スペーサー単位の例としては、さらに、pーアミノベンジルアルコールに電子的に類似する芳香族化合物（例えば、US 2005/0256030 A1参照）、例えば、2ーアミノイミダゾールー5ーメタノール誘導体 (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 及びオルトーまたはパラーアミノベンジルアセタールが挙げられるがこれらに限定されない。アミド結合の加水分解後に環化を受けるスペーサー、例えば、置換及び非置換4-アミノ酪酸アミド (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223)、適切に置換されたビシクロ [2.2.1] 及びビシクロ [2.2.2] 環系 (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815)、ならびに2ーアミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867) が使用され得る。

グリシンのα位で置換されたアミン含有薬物の脱離 (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) もまた、ADCで有用な自壊性スペーサーの例である。

1つの実施形態では、スペーサー単位は、以下に示すような分岐ビス (ヒドロキシメチル) スチレン (BHMS) 単位であり、これは、複数の薬物を組み込み、放出するために使用され得る。

10

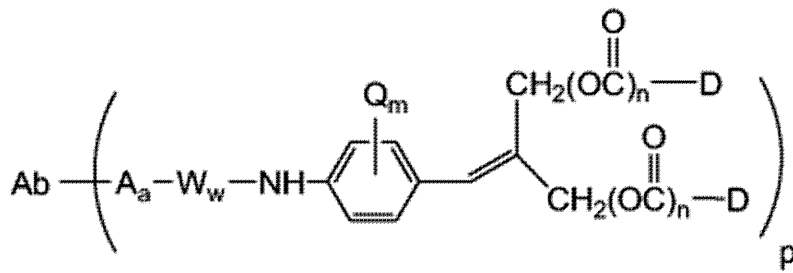
20

30

40

50

【化 2】



酵素的切断

2 個の薬物

ここで、Q は、 $-\text{Ci}-\text{Cs}$ アルキル、 $-\text{O}-$ ($\text{Ci}-\text{Cs}$ アルキル)、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ または $-\text{シアノ}$ であり、 m は、 $0 \sim 4$ に及ぶ整数であり、 n は、 0 または 1 であり、 p は、 $1 \sim \text{約 } 20$ に及ぶ。

【0471】

別の実施形態では、リンカー L は、複数の薬物部分を分岐した多官能性リンカー部分を介して抗体に共有結合させるための樹状型リンカーであり得る (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215、Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹状リンカーは、ADC の効力に関連する、薬物対抗体のモル比、すなわち、担持を増加させることができる。したがって、システイン操作抗体が 1 つの反応性システインチオール基のみを有する場合、多数の薬物部分は、樹状リンカーを介して結合され得る。例示的なリンカー成分及びそれらの組み合わせを、式 I I の ADC との関連で以下に示す：

10

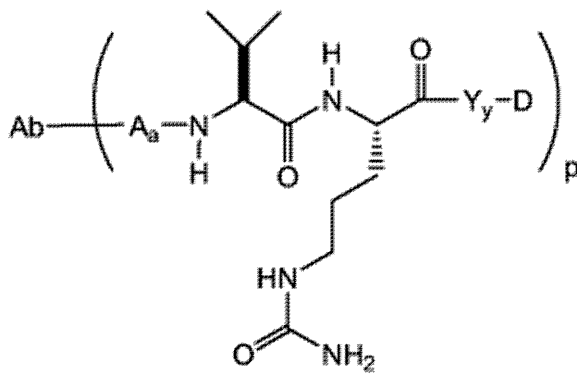
20

30

40

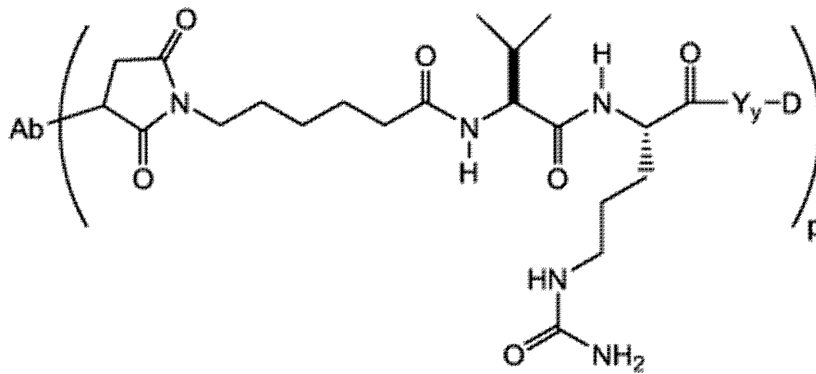
50

【化 3】



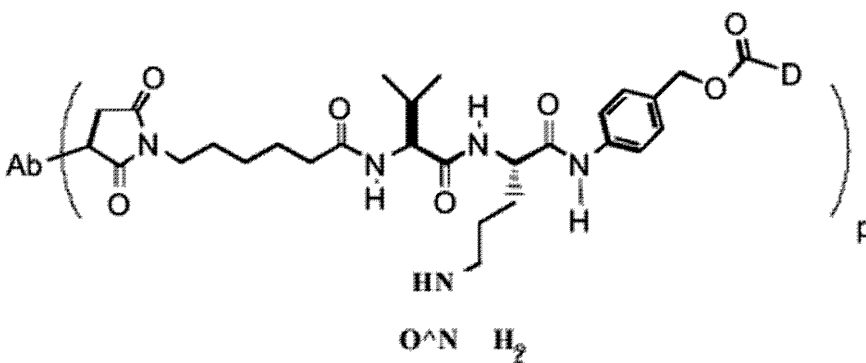
Val-Cit または VC

10



MC-val-cit

20



MC-val-cit-PAB

30

【0472】

ストレッチャー、スペーサー、及びアミノ酸単位を含めたリンカー成分は、当技術分野で既知の方法、例えば、US 2005-0238649 A1に記載のものによって合成され得る。リンカーのさらなる非限定的な例としては、その開示が参照により全体として本明細書に組み込まれるWO 2015095953に記載のものが挙げられる。

40

【0473】

b. 例示的な薬物部分

(1) マイタイシン及びマイタンシノイド

いくつかの実施形態では、免疫複合体は、1つ以上のマイタンシノイド分子にコンジュゲートされた抗体を含む。マイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、東アフリカの低木である *Maytenus serrata* から最初に単離された（米国特許第3896111号）。その後、ある特定の微生物もまた、マイタンシノイド、例えば、マイタンシノール及びC-3マ

50

イタンシノールエステルを産生することが発見された（米国特許第4, 151, 042号）。合成マイタンシノールならびにその誘導体及びアナログが、例えば、米国特許第4, 137, 230号、第4, 248, 870号、第4, 256, 746号、第4, 260, 608号、第4, 265, 814号、第4, 294, 757号、第4, 307, 016号、第4, 308, 268号、第4, 308, 269号、第4, 309, 428号、第4, 313, 946号、第4, 315, 929号、第4, 317, 821号、第4, 322, 348号、第4, 331, 598号、第4, 361, 650号、第4, 364, 866号、第4, 424, 219号、第4, 450, 254号、第4, 362, 663号、及び第4, 371, 533号に開示される。

【0474】

マイタンシノイド薬物部分は、(i) 発酵または化学修飾または発酵生成物の誘導体化による調製に比較的利用しやすく、(ii) ジスルフィド及び非ジスルフィドリンカーによる抗体へのコンジュゲートに適した官能基での誘導体化に適しており、(iii) 血漿中で安定しており、かつ(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬物複合体の魅力的な薬物部分である。

【0475】

マイタンシノイド薬物部分としての使用に適したマイタンシン化合物は、当技術分野で周知であり、既知の方法に従って天然源から単離される場合もあれば、遺伝子操作及び発酵技術（US 6790952、US 2005/0170475、Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973）を使用して産生される場合もある。マイタンシノール及びマイタンシノールアナログもまた、既知の方法に従って合成的に調製され得る。

【0476】

例示的なマイタンシノイド薬物部分としては、修飾された芳香環を有するもの、例えば、C-19-デクロロ（米国特許第4256746号）（アンサマイトシンP2の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製される）、C-20-ヒドロキシ（またはC-20-デメチル）+/-C-19-デクロロ（米国特許第4361650号及び第4307016号）（StreptomycesもしくはActinomycesを使用した脱メチル化またはLAHを使用した脱塩素によって調製）、及びC-20-デメトキシ、C-20-アシロキシ（-OCOR）、+/-デクロロ（米国特許第4, 294, 757号）（塩化アシルを使用したアシル化によって調製）ならびに他の部位での修飾を有するものが挙げられる。例示的なマイタンシノイド薬物部分としてはまた、修飾、例えば：C-9-SH（米国特許第4424219号）（マイタンシノールとH₂SまたはP2S5との反応によって調製）、C-14-アルコキシメチル（デメトキシ/CH₂OR）（US 4331598）、C-14-ヒドロキシメチルまたはアシロキシメチル（CH₂OHまたはCH₂OAc）（米国特許第4450254号）（Nocardiaから調製）、C-15-ヒドロキシ/アシロキシ（US 4364866）（マイタンシノールのStreptomycesによる変換によって調製）、C-15-メトキシ（米国特許第4313946号及び第4315929号）（Trewia nudifloraから単離）、C-18-N-デメチル（米国特許第4362663号及び第4322348号）（マイタンシノールのStreptomycesによる脱メチル化によって調製）、及び4, 5-デオキシ（US 4371533）（マイタンシノールの三塩化チタン/LAH還元によって調製）を有するものが挙げられる。

【0477】

マイタンシン化合物の多くの位置が、結合の種類に応じて、結合位置として有用であることが知られている。例えば、エステル結合の形成の場合、ヒドロキシ基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシ基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシ基を有するC-20位がすべて適している（US 5208020、US RE39151、US 6913748、US 7368565、US 2006/0167245、US 2007/0037972）。

10

20

30

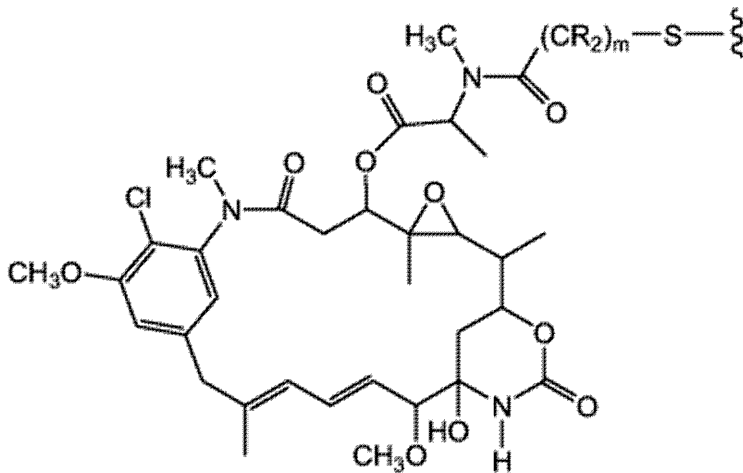
40

50

【 0 4 7 8 】

マイタンシノイド薬物部分としては、以下の構造を有するものが挙げられる：

【化 4】



10

ここで、波線は、該マイタンシノイド薬物部分の硫黄原子のADCのリンカーへの共有結合を示す。Rは独立して、HまたはC1-C6アルキルであり得る。該アミド基を該硫黄原子に結合するアルキレン鎖は、メタニル、エタニル、またはプロピルでよく、すなわち、mは、1、2、または3である（US 633410、US 5208020、US 7276497、Chari et al (1992) Cancer Res. 52:127-131、Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623）。

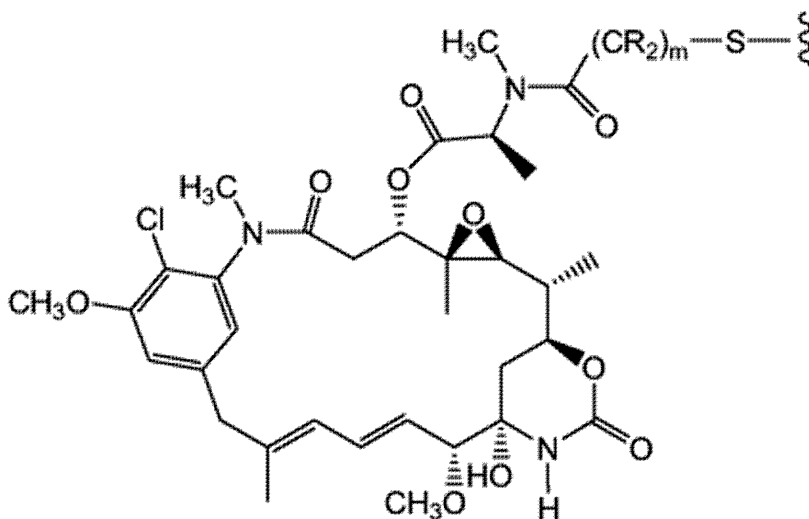
20

【 0 4 7 9 】

マイタンシノイド薬物部分のすべての立体異性体、すなわち、Dのキラル炭素におけるR及びS配置の任意の組み合わせが、本発明の化合物に対して企図される。1つの実施形態では、該マイタンシノイド薬物部分は、以下の立体化学を有する：

30

【化 5】

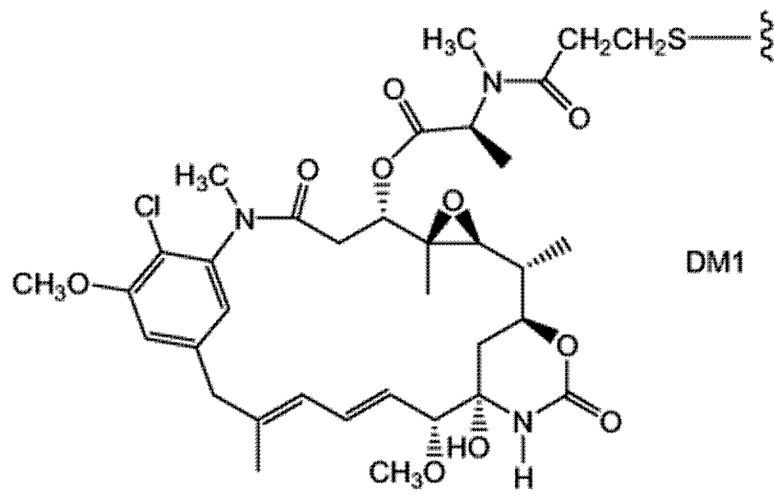


40

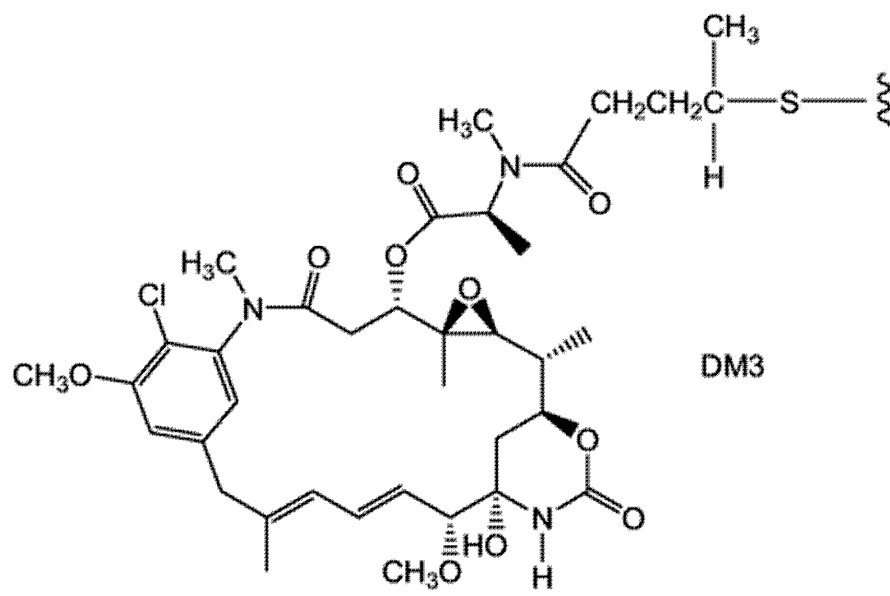
マイタンシノイド薬物部分の例示的な実施形態としては、以下の構造を有する：DM1、

50

DM 3、及び DM 4 が挙げられる：
【化 6 - 1】



10



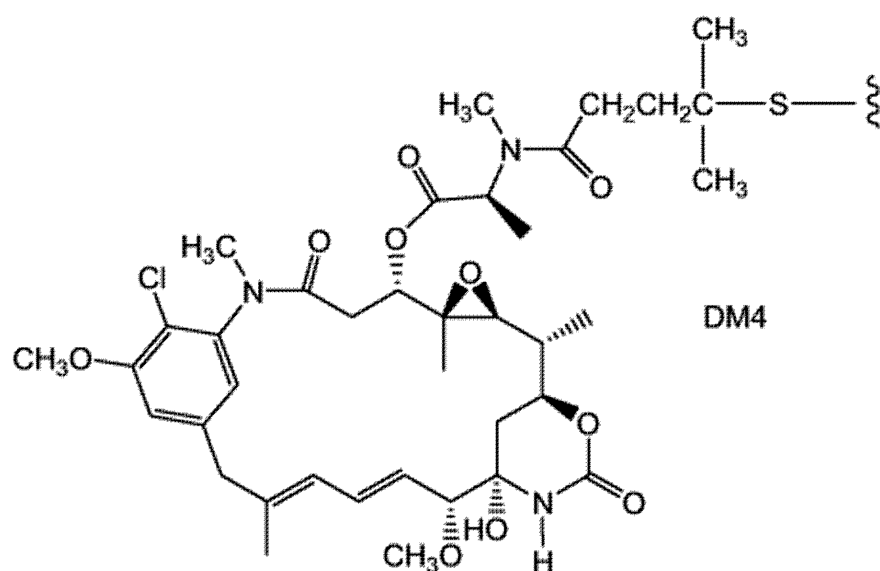
20

30

40

50

【化 6 - 2】



10

ここで、波線は、該薬物の硫黄原子の抗体薬物複合体のリンカー（L）への共有結合を示す。（WO 2005/037992、US 2005/0276812 A1）。他の例示的なマイタンシノイド抗体薬物複合体は、以下の構造及び省略を有する（式中、A b は抗体であり、p は1～約8である）：

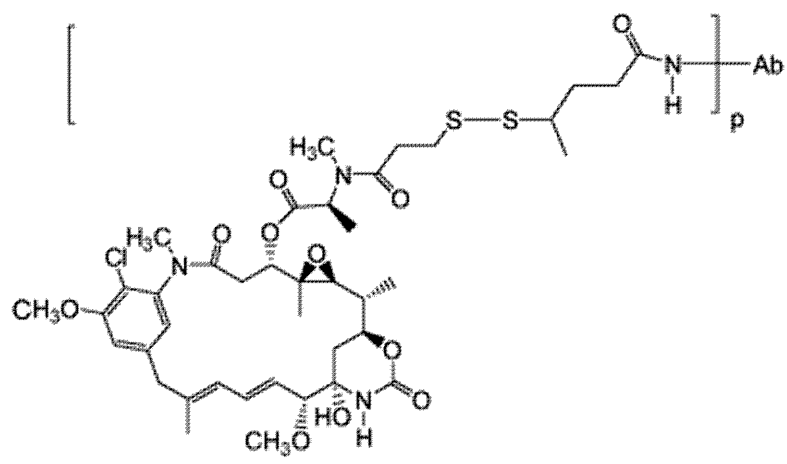
20

30

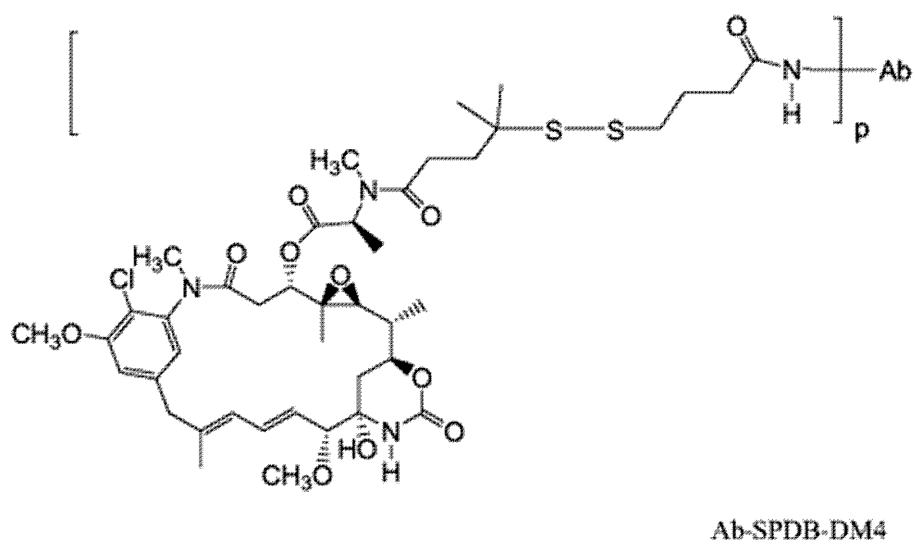
40

50

【化 7 - 1】



10



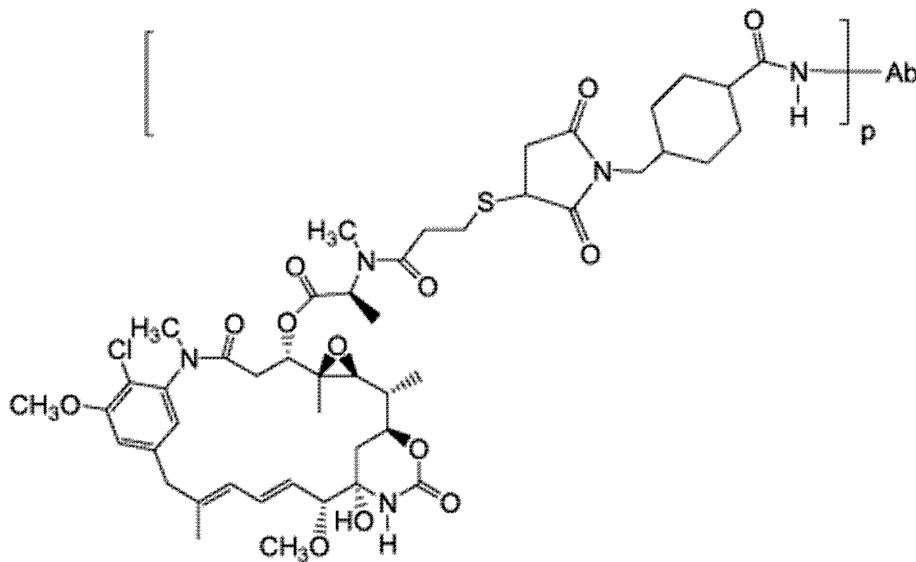
20

30

40

50

【化 7 - 2】



Ab-SMCC-DM1

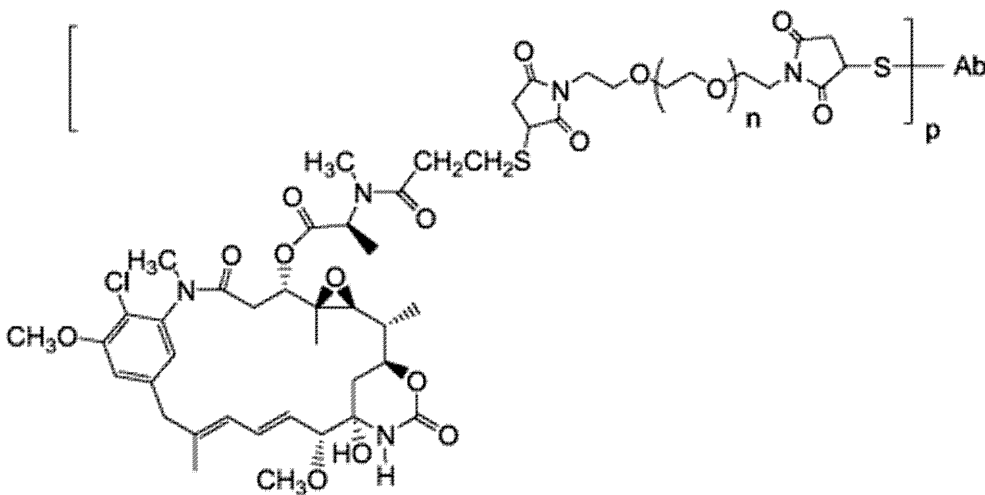
【0480】

1つの実施形態では、該抗体薬物複合体は、DM4がSPDBリンカーを介して該抗体のチオール基に結合している場合に形成される（参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許第6913748号及び第7276497号参照）。

【0481】

DM1がBMPEOリンカーを介して該抗体のチオール基に結合している例示的な抗体薬物複合体は以下の構造及び省略を有する：

【化 8】



ここで、Abは抗体であり、nは、0、1、または2であり、pは、1、2、3、または4である。

【0482】

マイタシンノイドを含む免疫複合体、それを作製する方法、及びそれらの治療的使用は、例えば、その開示が参照により明示的に本明細書に組み込まれる Erickson, et al (2006) Cancer Res. 66 (8) : 4426-4433、米国特許第5,208,020号、第5,416,064号、US 2005/0276812

A 1、及び欧州特許第 E P 0 4 2 5 2 3 5 B 1 に開示されている。

【0483】

抗体マイタンシノイド複合体は、抗体またはマイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性も著しく低下させることなく抗体をマイタンシノイド分子に化学的に連結させることによって調製される。例えば、米国特許第 5, 208, 020 号を参照されたい（その開示は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる）。マイタンシノイドは、既知の技術によって合成される場合もあれば、天然源から単離される場合もある。適切なマイタンシノイド、例えば、マイタンシノール及び当該マイタンシノール分子の芳香環または他の位置で修飾されたマイタンシノールアナログ、例えば、様々なマイタンシノールエステルは、例えば、米国特許第 5, 208, 020 号ならびに上記で言及した他の特許及び非特許刊行物に開示されている。

10

【0484】

抗体マイタンシノイド複合体の作製のための当技術分野で既知の多くの連結基、例えば、その開示が参照により明示的に本明細書に組み込まれる米国特許第 5 208 020 号または欧州特許第 0 4 2 5 2 3 5 B 1 号、Char i e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 (1 9 9 2)、及び U S 2 0 0 5 / 0 1 6 9 9 3 A 1 に開示されるものが存在する。リンカー成分 S M C C を含む抗体マイタンシノイド複合体は、U S 2 0 0 5 / 0 2 7 6 8 1 2 A 1, “ A n t i b o d y - d r u g c o n j u g a t e s a n d M e t h o d s ” に開示される通りに調製され得る。該リンカーは、上記の特許に開示される、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、光解離性基、ペプチダーゼに不安定な基、またはエステラーゼに不安定な基を含む。さらなるリンカーが本明細書に記載及び例示されている。

20

【0485】

該抗体とマイタンシノイドの複合体は、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (S M C C)、イミノチオラン (I T)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、アジブイミド酸ジメチル H C 1）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス (p-ジアゾニウムベンゾイル) -エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン 2, 6-ジイソシアネート）、及びビス-活性フッ素化合物（例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン）を使用して作製され得る。ある特定の実施形態では、該カップリング剤は、ジスルフィド結合を与えるための N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (S P D P) (C a r l s s o n e t a l . , B i o c h e m . J . 1 7 3 : 7 2 3 - 7 3 7 (1 9 7 8)) または N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート (S P P) である。

30

【0486】

該リンカーは、該結合の種類に応じて、様々な位置で該マイタンシノイド分子に結合され得る。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技術を使用してヒドロキシル基との反応によって形成され得る。該反応は、ヒドロキシル基を有する C-3 位、ヒドロキシメチルで修飾された C-14 位、ヒドロキシル基で修飾された C-15 位、及びヒドロキシル基を有する C-20 位で生じ得る。1つの実施形態では、該結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノールアナログの C-3 位で生じる。

40

【0487】

(2) オーリスタチン及びドラスタチン

いくつかの実施形態では、免疫複合体は、ドラスタチンまたはドラスタチンのペプチドアナログもしくは誘導体、例えば、オーリスタチンにコンジュゲートした抗体を含む（米国特許第 5 6 3 5 4 8 3 号、第 5 7 8 0 5 8 8 号）。ドラスタチン及びオーリスタチンは、微小管動態、G T P の加水分解、ならびに核及び細胞分裂を妨げ (W o y k e e t

50

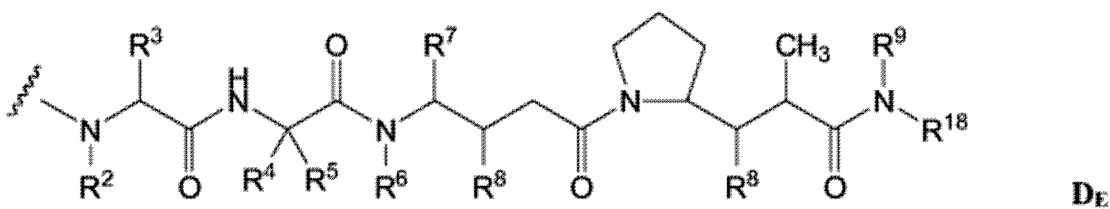
al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12) : 3580-3584)、抗がん活性 (米国特許第5663149号) 及び抗真菌活性 (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42 : 2961-2965) を有することが分かっている。該ドラスタチンまたはオーリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN (アミノ) 末端またはC (カルボキシル) 末端を介して該抗体に結合され得る (WO 02/088172) 。例示的なオーリスタチンの実施形態は、N末端結合モノメチルオーリスタチン薬物部分DE及びDFを含む (US 2005/0238649、Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示、2004年3月28日発表、その開示は、参照により全体として明示的に組み込まれる) 。

10

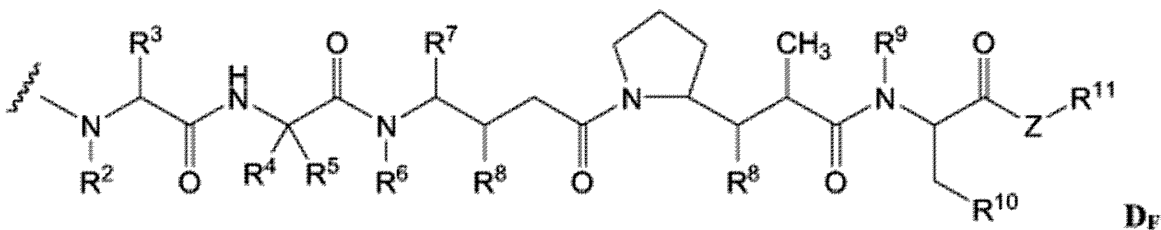
【0488】

ペプチド薬物部分は、以下の式DE及びDFから選択され得る：

【化9】



20



30

式中、DE及びDFの破線は、抗体または抗体-リンカー成分への共有結合部位を示し、独立して各位置において、

R^2 は、H及びCi-Csアルキルから選択され、

R^3 は、H、Ci-Cgアルキル、C3-C8炭素環、アリール、Ci-Cgアルキル-アリール、Ci-Cgアルキル-(C3-Cs炭素環)、C3-C8ヘテロ環及びCi-Cgアルキル-(C3-Csヘテロ環) から選択され、

R^4 は、H、Ci-Cgアルキル、C3-C8炭素環、アリール、Ci-Cgアルキル-アリール、Ci-Cgアルキル-(C3-Cs炭素環)、C3-C8ヘテロ環及びCi-Cgアルキル-(C3-Csヘテロ環) から選択され、

40

R^5 は、H及びメチルから選択されるか、

または R^4 と R^5 が一緒になって炭素環を形成し、式-(CR^aR^b)_n-を有し、

R^a 及び R^b は、独立して、H、Ci-Cgアルキル、及びC3-C8炭素環から選択され、nは、2、3、4、5及び6から選択され、

R^6 は、H及びCi-Cgアルキルから選択され、

R^7 は、H、Ci-Csアルキル、C3-C8炭素環、アリール、Ci-Csアルキル-アリール、Ci-Csアルキル-(C3-Cs炭素環)、C3-C8ヘテロ環及びCi-Cgアルキル-(C3-Csヘテロ環) から選択され、

各 R^8 は、独立して、H、OH、Ci-Csアルキル、C3-C8炭素環及びO-(Ci

50

—C s アルキル) から選択され、

R⁹ は、H 及び C i —C s アルキルから選択され、

R¹⁰ は、アリールまたは C₃—C₈ ヘテロ環から選択され、

Z は、O、S、NH、または NR¹² であり、R¹² は、C i —C s アルキルであり、R

¹¹ は、H、C₁—C₂₀ アルキル、アリール、C₃—C₈ ヘテロ環、—(R¹³O)_m

—R¹⁴、または—(R¹³O)_m—CH(R¹⁵)₂ から選択され、

m は、1～1000 の整数であり、

R¹³ は、C₂—C₈ アルキルであり、

R¹⁴ は、H または C i —C₈ アルキルであり、

R¹⁵ は出現ごとに、独立して、H、COOH、—(CH₂)_n—、—N(R¹⁶)₂、—

(CH₂)_n—、—SO₃H、または—(CH₂)_n—SO₃—C i —C₈ アルキルであり、

R¹⁶ は出現ごとに、独立して、H、C i —C₈ アルキル、または—(CH₂)_n—CO

OH であり、

R¹⁸ は、—C(R⁸)₂—C(R⁸)₂—アリール、—C(R⁸)₂—C(R⁸)₂—(C₃—C₈ ヘテロ環)、及び—C(R⁸)₂—C(R⁸)₂—(C₃—C₈ 炭素環) から選択され、

n は、0～6 の整数である。

【0489】

1つの実施形態では、R³、R⁴ 及び R⁷ は、独立して、イソプロピルまたは sec-ブチルであり、R⁵ は、—H またはメチルである。例示的な実施形態では、R³ 及び R⁴ は、各々イソプロピルであり、R⁵ は、—H であり、R⁷ は、sec-ブチルである。

【0490】

さらに別の実施形態では、R² 及び R⁶ は、各々メチルであり、R⁹ は、—H である。

【0491】

さらに別の実施形態では、R⁸ は出現ごとに、—OCH₃ である。

【0492】

例示的な実施形態では、R³ 及び R⁴ は、各々イソプロピルであり、R² 及び R⁶ は、各々メチルであり、R⁵ は、—H であり、R⁷ は、sec-ブチルであり、R⁸ は出現ごとに、—OCH₃ であり、R⁹ は、—H である。

【0493】

1つの実施形態では、Z は、—O—または—NH—である。

【0494】

1つの実施形態では、R¹⁰ は、アリールである。

【0495】

例示的な実施形態では、R¹⁰ は、—フェニルである。

【0496】

例示的な実施形態では、Z が—O—の場合、R¹¹ は、—H、メチル、またはtert-ブチルである。

【0497】

1つの実施形態では、Z は、—NH—であり、R¹¹ は、—CH(R¹⁵)₂ であり、R¹⁵ は、—(CH₂)_n—、—N(R¹⁶)₂ であり、R¹⁶ は、—C i —C s アルキルまたは—(CH₂)_n—、—COOH である。

【0498】

別の実施形態では、Z が—NH—の場合、R¹¹ は、—CH(R¹⁵)₂ であり、R¹⁵ は、—(CH₂)_n—SO₃H である。

【0499】

式 DE の例示的なオーリスタチンの実施形態は、MMAE であり、式中、波線は、抗体薬物複合体のリンカー (L) への共有結合を示す：

10

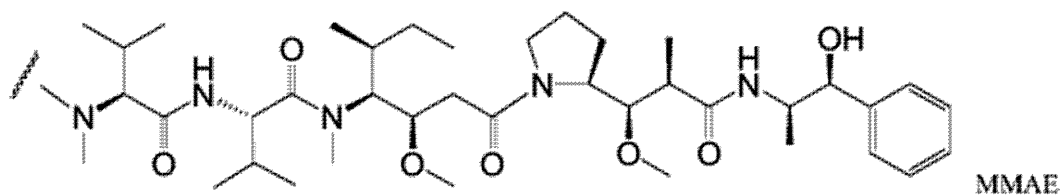
20

30

40

50

【化 10】



10

【0500】

式DFの例示的なオーリスタチンの実施形態は、MMAFであり、式中、波線は、抗体薬物複合体のリンカー（L）への共有結合を示す（US 2005／0238649及びDoronina et al.（2006）Bioconjugate Chem. 17：114－124参照）：

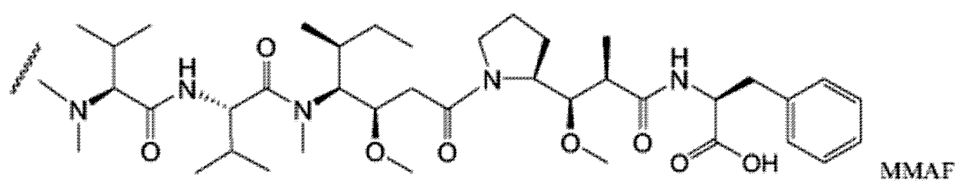
20

30

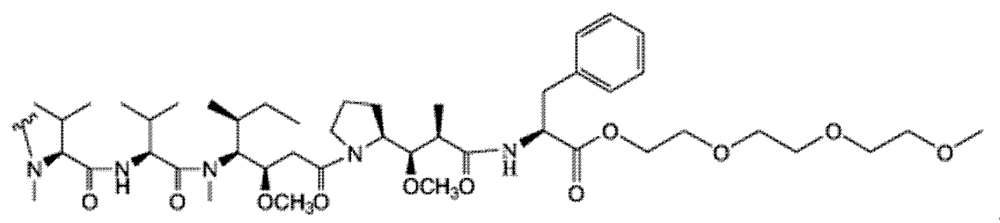
40

50

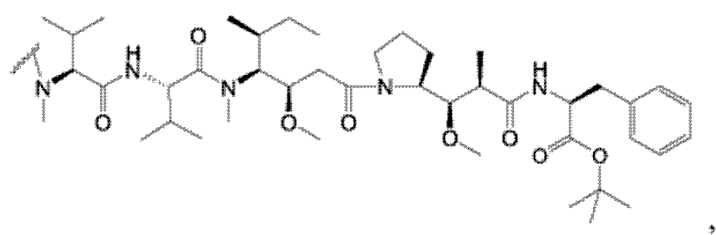
【化 1 1 - 1】



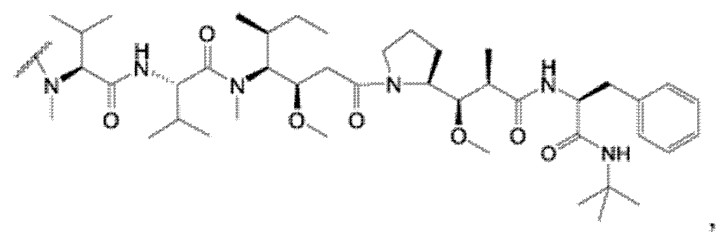
10



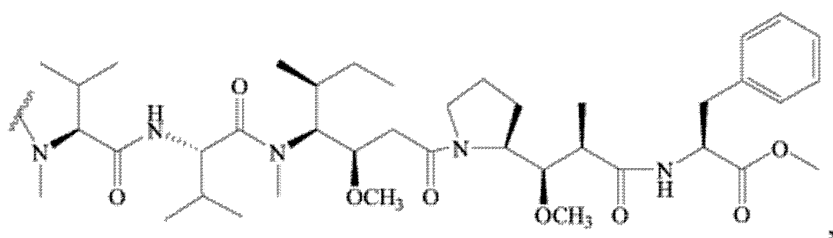
20



30

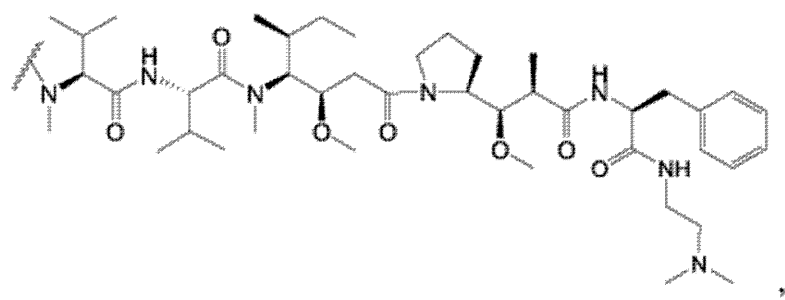


40

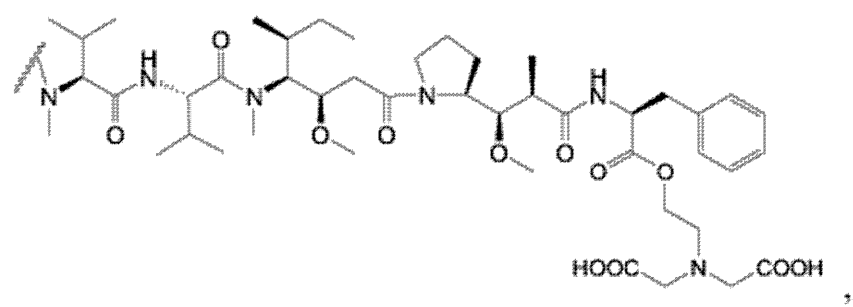


50

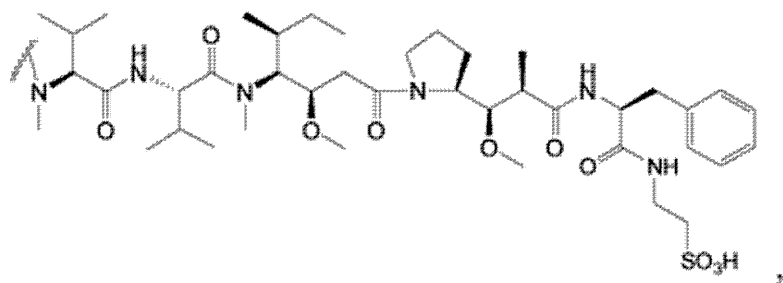
【化 1 1 - 2】



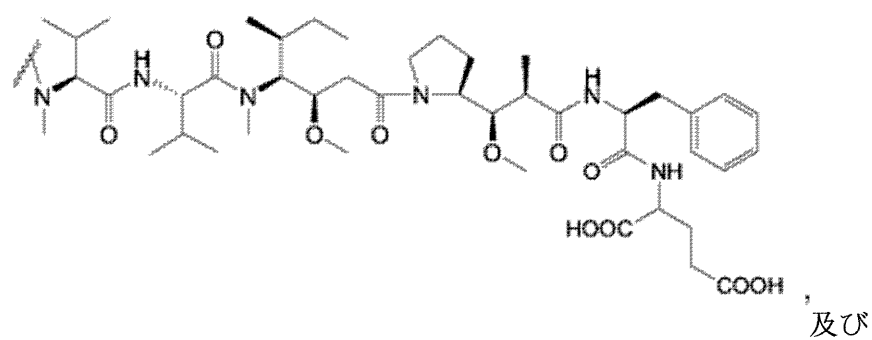
10



20



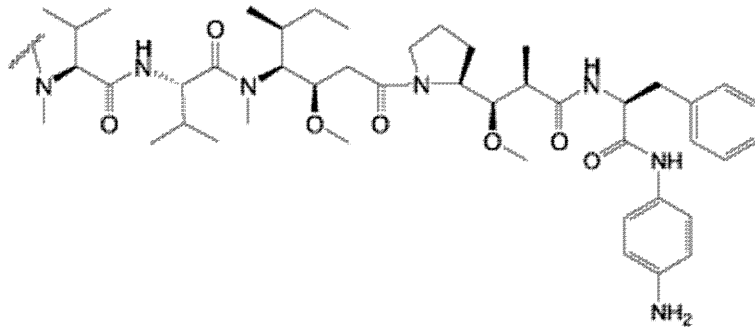
30



40

50

【化 1 1 - 3】



10

【0501】

1つの態様では、上記のトリエチレングリコールエステル（TEG）が挙げられるがこれに限定されない親水性基は、該薬物部分にR¹¹で結合され得る。いかなる特定の理論にも拘束されるものではないが、該親水性基は、該薬物部分の内在化及び非凝集に役立つ。オーリスタチン／ドラスタチンまたはその誘導体を含む式IのADCの例示的な実施形態は、参照により明示的に本明細書に組み込まれるUS 2005-0238649及びDoronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載されている。

20

【0502】

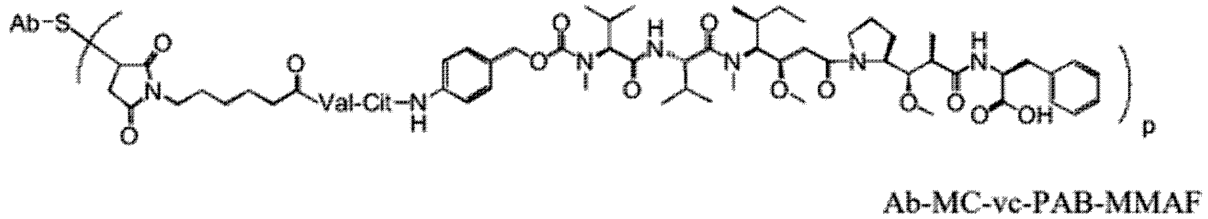
MMAEまたはMMAF及び様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施形態は、以下の構造及び省略を有する（「Ab」は抗体であり、pは、1～約8であり、「Val-Cit」または「vc」は、バリナーシトルリンジペプチドであり、「S」は、硫黄原子である。本明細書における硫黄結合ADCのある特定の構造記述において、該抗体は、単に硫黄結合の特徴を示すために「Ab-S」として表され、特定の硫黄原子が複数のリンカー-薬物部分を有することを示すものではないことが留意される。以下の構造の左側の括弧は、該硫黄原子の左側、すなわち、AbとSの間に配置してもよく、これは、本明細書を通して記載される本発明のADCの同等の記述である。

30

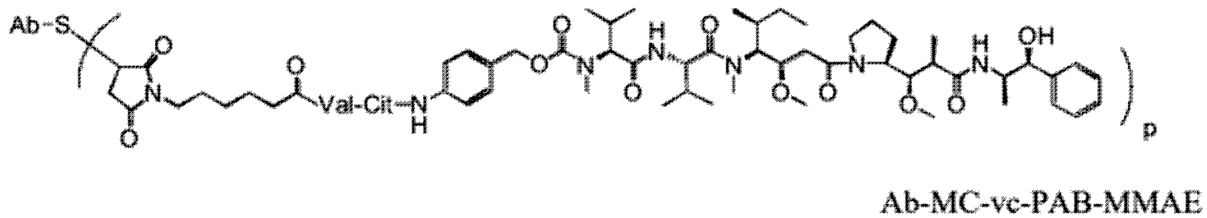
40

50

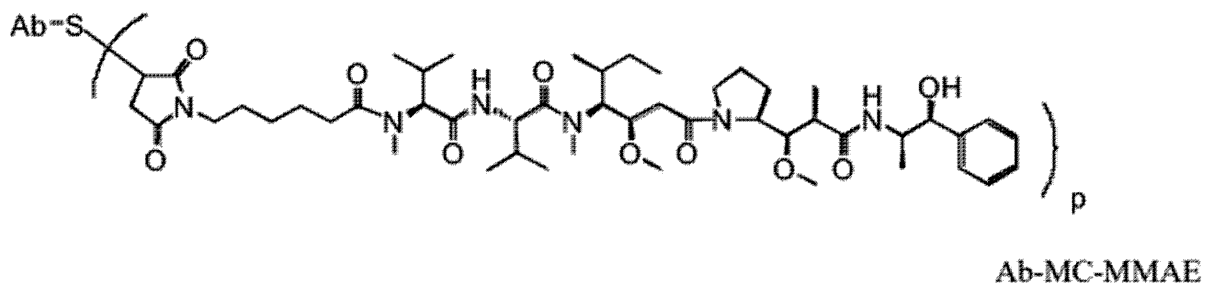
【化 1 2】



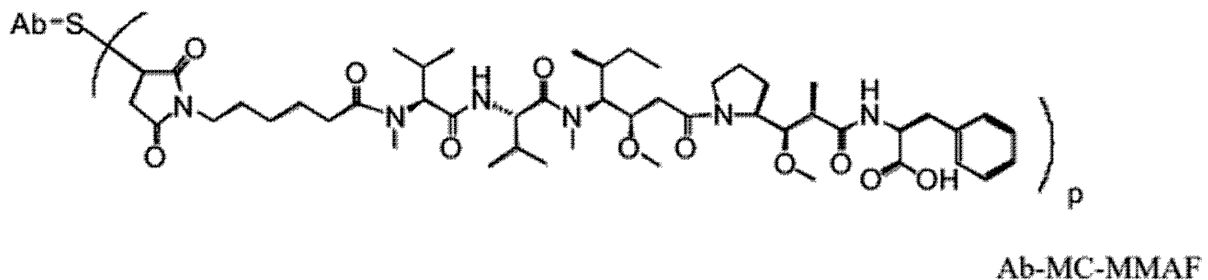
10



20



30



【0503】

MMAF及び様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施形態としてはさらに、Ab-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFが挙げられる。

40

【0504】

興味深いことに、タンパク質分解的に切断されないリンカーによって抗体に結合されたMMAFを含む免疫複合体は、タンパク質分解的に切断可能なリンカーによって抗体に結合されたMMAFを含む免疫複合体と同等の活性を有することが分かっている。Dorona et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124を参照されたい。かかる例では、薬物の放出は、細胞内での抗体の分解によって達成されると考えられる。同文献。

【0505】

通常、ペプチドベースの薬物部分は、2つ以上のアミノ酸及び／またはペプチド断片間にペプチド結合を形成することによって調製され得る。かかるペプチド結合は、例えば、

50

ペプチド化学の分野で周知の液相合成法 (E. Schröder and K. Libke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) に従って調製され得る。オーリスタチン／ドラスタチン薬物部分は、以下の方法に従って調製され得る：US 2005-0238649 A1、米国特許第5635483号、米国特許第5780588号、Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465、Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277、Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725、Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863、及びDoronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784。特に、式DFのオーリスタチン／ドラスタチン薬物部分、例えば、MMAF及びその誘導体は、US 2005-0238649 A1及びDoronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載されている方法を使用して調製され得る。式DEのオーリスタチン／ドラスタチン薬物部分、例えば、MMAE及びその誘導体は、Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784に記載されている方法を使用して調製され得る。薬物-リンカー部分MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、及びMC-vc-PAB-MMAEは、例えば、Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784、及び特許出願公開第US 2005/0238649 A1号に記載される常法によって便宜的に合成され、その後目的の抗体にコンジュゲートされ得る。

10

20

30

40

50

【0506】

(3) カリケアマイシン

他の実施形態では、該免疫複合体は、1つ以上のカリケアマイシン分子にコンジュゲートされた抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモルを下回る濃度で二本鎖DNA切断をもたらすことが可能である。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、第5,877,296号(すべてAmerican Cyanamid Company)を参照されたい。使用され得るカリケアマイシンの構造アナログとしては、 γ 1¹、 α 1¹、013¹、N-acetyl- γ 1¹、PSAG及び θ 1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)、及び上述のAmerican Cyanamidに対する米国特許)が挙げられるがこれらに限定されない。該抗体がコンジュゲートされ得る別の抗腫瘍薬物は、抗葉酸剤であるQFAである。カリケアマイシンとQFAの両方は、細胞内作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体介在性内在化を介したこれらの薬剤の細胞取り込みにより、それらの細胞毒性効果が大きく高まる。

【0507】

c. 他の細胞毒性薬

抗体にコンジュゲートされ得る他の抗腫瘍薬としては、BCNU、ストレプトゾシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5,053,394号、第5,770,710号に記載の集合的にLL-E33288複合体として知られる薬剤のファミリー、ならびにエスペラミシン(米国特許第5,877,296号)が挙げられる。使用され得る酵素的に活性な毒素及びそれらの断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖(Pseudomonas aeruginosa由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファーサルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca ameri

cana タンパク質 (PAPI、PAPII、及び PAP-S)、momordica charantia の阻害物質、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis の阻害物質、ゲロニン、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin)、及びトリコセンが挙げられる。例えば、1993 年 10 月 28 日に公開された WO 93/21232 を参照されたい。本発明はさらに、抗体と核酸分解活性を有する化合物 (例えば、リボヌクレアーゼまたは DNA エンドヌクレアーゼ、例えば、デオキシリボヌクレアーゼ、DNase) との間に形成される免疫複合体を企図する。ある特定の実施形態では、免疫複合体は、放射活性が高い原子を含み得る。様々な放射性同位体が、放射性コンジュゲート抗体の産生に利用可能である。例としては、 At^{211} 、 1^{131} 、 1^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位体が挙げられる。該免疫複合体が検出に使用される場合、それは、シンチグラフ検査用の放射性原子、例えば、 tc^{99m} もしくは I^{123} 、または核磁気共鳴 (MR) 画像 (別名、磁気共鳴画像、mri) 用のスピンラベル、例えば、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンもしくは鉄を含み得る。

10

【0508】

該放射性または他の標識は、既知の方法で該免疫複合体に組み込まれ得る。例えば、該ペプチドは、生合成される場合もあれば、例えば、水素の代わりにフッ素-19 を含む適切なアミノ酸前駆体を使用して化学的アミノ酸合成によって合成される場合もある。ラベル、例えば、 tc^{99m} または I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、当該ペプチドのシステイン残基を介して結合され得る。イットリウム-90 は、リジン残基を介して結合され得る。IODOGEN 法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) を使用して、ヨウ素-123 を組み込むことができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989) は、他の方法について詳述している。

20

【0509】

ある特定の実施形態では、免疫複合体は、プロドラッグ活性化酵素にコンジュゲートされた抗体分子を含み得る。該プロドラッグ活性化酵素は、プロドラッグ (例えば、ペプチジル化学療法剤、WO 81/01145 参照) を、抗がん剤等の活性薬物に変換する。かかる免疫複合体は、抗体依存的酵素プロドラッグ療法 (「ADEPT」) において有用である。抗体にコンジュゲートされ得る酵素としては、リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアルカリホスファターゼ、硫酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアリアルスルファターゼ、非毒性 5-フルオロシトシンを抗がん剤、5-フルオロウラシルに変換するために有用なシトシンデアミナーゼ、ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なプロテアーゼ、例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン (例えば、カテプシン B 及び L)、D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するために有用な D-アラニルカルボキシペプチダーゼ、グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用な炭水化物切断酵素、例えば、 β -ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼ、 β -ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するために有用な β -ラクタマーゼ、ならびにペニシリンアミダーゼ、例えば、アミン窒素にてフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基で誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するためにそれぞれ有用なペニシリン V アミダーゼ及びペニシリン G アミダーゼが挙げられるがこれらに限定されない。酵素は、当技術分野で周知の組み換え DNA 技術によって抗体に共有結合され得る。例えば、Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984) を参照されたい。

30

40

【0510】

d. 薬物担持

50

薬物担持は、式 I の分子における抗体当たりの薬物部分の平均数である、 p によって表される。薬物担持は、抗体当たり 1 ～ 20 個の薬物部分 (D) に及び得る。式 I の ADC は、1 ～ 20 個の範囲の薬物部分でコンジュゲートされた抗体の集団を含む。コンジュゲーション反応からの ADC の調製における抗体当たりの薬物部分の平均数は、従来の手段、例えば、質量分析、ELISA アッセイ、及び HPLC によって特徴づけられ得る。 p の単位での ADC の量的分布も特定され得る。場合によっては、 p がある特定の値である同種 ADC を、薬物担持が異なる ADC から分離、精製、及び特性評価することは、逆相 HPLC または電気泳動等の手段によって達成され得る。したがって、式 I の抗体薬物複合体の医薬製剤は、1、2、3、4、またはそれ以上の薬物部分に結合した抗体を含むかかるコンジュゲートの異種混合物であり得る。いくつかの抗体薬物複合体では、 p は、抗体の結合部位の数によって制限され得る。例えば、上記の例示的な実施形態のように、該結合がシステインチオールである場合、抗体は、システインチオール基を 1 個のみ有する場合もいくつか有する場合もあり、または十分に反応性があるチオール基を 1 個のみ有する場合もいくつか有する場合もあり、それらを介してリンカーが結合され得る。ある特定の実施形態では、より高い薬物担持、例えば、 $p > 5$ により、ある特定の抗体薬物複合体の凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の減少が生じ得る。ある特定の実施形態では、本発明の ADC の薬物担持は、1 ～ 約 8、約 2 ～ 約 6、または約 3 から約 5 に及ぶ。実際に、ある特定の ADC では、抗体当たりの薬物部分の最適比は、8 未満であり得ること、及び約 2 ～ 約 5 であり得ることが示されている。US 2005-0238649 A1 を参照されたい。

10

20

【0511】

ある特定の実施形態では、理論最大薬物部分未満が、コンジュゲーション反応の過程で抗体にコンジュゲートされる。抗体は、以下に論じる通り、例えば、薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しないリジン残基を含み得る。一般に、抗体は、薬物部分に連結し得る多くの遊離及び反応性システインチオール基を含まず、実際、抗体に含まれるほとんどのシステインチオール残基は、ジスルフィド架橋として存在する。ある特定の実施形態では、抗体は、還元剤、例えば、ジチオスレイトール (DTT) またはトリカルボニルエチルホスフィン (TCEP) により、一部または完全還元条件下で還元されて、反応性システインチオール基を生成し得る。ある特定の実施形態では、抗体は、反応性求核基、例えば、リジンまたはシステインを曝露するための変性条件に供される。

30

【0512】

ADC の担持 (薬物 / 抗体比) は、異なる方法で、例えば、(i) 抗体に対して薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬のモル過剰を制限すること、(ii) コンジュゲーション反応の時間または温度を制限すること、及び (iii) システインチオール修飾のための還元条件の一部分または該還元条件を制限することによって制御され得る。

【0513】

複数の求核基が薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬に続いて薬物部分試薬と反応する場合、得られる生成物は、抗体に結合した 1 つ以上の薬物部分が分布した ADC 化合物の混合物であることを理解されたい。抗体当たりの平均薬物数は、抗体に特異的及び薬物に特異的である、二重 ELISA 抗体アッセイによって混合物から算出され得る。個々の ADC 分子は、質量分析によって該混合物で同定され、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分離される (例えば、McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19 (7): 299-307、Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10: 7063-7070、Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31,

40

50

2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004, Alley, S. C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004 参照)。ある特定の実施形態では、単一の担持値を有する同種ADCは、該コンジュゲーション混合物から、電気泳動またはクロマトグラフィーによって単離され得る。

【0514】

I. 製品及びキット

本発明の別の実施形態は、GPC3を発現するがんの治療、予防、及び／または診断に有用な物質を含む製品である。該製品は、容器及び該容器上または該容器に結合させたラベルまたは添付文書を含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ等が挙げられる。該容器は、様々な材料、例えば、ガラスまたはプラスチックから形成され得る。該容器は、がんの状態を治療、予防、及び／または診断するのに有効な組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、該容器は、静脈注射溶液のバッグでも皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルでもよい）。該組成物に含まれる少なくとも1つの活性薬剤は、本発明の抗GPC3抗体である。いくつかの実施形態では、該ラベルまたは添付文書は、該組成物が、がんの治療に使用されることを示す。該ラベルまたは添付文書はさらに、該抗体組成物をがん患者に投与するための使用説明書を含む。さらに、該製品は、医薬的に許容される緩衝剤、例えば、静菌性の注射用水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液を含む第二の容器をさらに含んでもよい。それはさらに、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含めた、商業的及びユーザーの観点から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0515】

同様に、様々な目的、例えば、GPC3発現細胞の殺傷アッセイ、細胞からGPC3ポリペプチドの精製または免疫沈降、GPC3発現細胞のIHC分析等に有用なキットを提供する。GPC3ポリペプチドの単離及び精製の場合、該キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）に結合した抗GPC3抗体を含み得る。インビトロでの、例えば、ELISAもしくはウェスタンブロットにおけるGPC3ポリペプチドの検出及び定量的ための抗体を含むキットが提供され得る。該製品と同様に、該キットは、容器及び該容器上または該容器に結合させたラベルまたは添付文書を含む。該容器は、少なくとも1つの本発明の抗GPC3抗体を含む組成物を保持する。例えば、希釈剤及び緩衝剤、対照抗体を含むさらなる容器が含まれ得る。該ラベルまたは添付文書は、該組成物の説明ならびに意図されているインビトロまたは検出用途についての使用説明書を提供し得る。

【0516】

1つの実施形態では、本明細書に開示するIHCインビトロ診断（IVD）アッセイを行うための試薬は、キットまたはパケットの形態で提供され得る。組織調製物自体を除いて、アッセイに必要な材料の一部または全部がキットに提供され得る。該キットは、例えば、組織調製物を載せるスライド、熱処理エピトープ賦活化（HIER）緩衝液、任意に、内因性ペルオキシダーゼをブロックするための過酸化水素の高安定型、IHCでしばしば見られる非特異的染色を減少させるために使用される普遍的なブロッキング試薬、希釈または非希釈型の抗GPC3一次抗体（例えば、204）、特定の検出スキームに応じて適切に標識された抗マウス二次抗体、抗体抗原複合体形成の検出を可視化するための材料（例えば、該二次抗体がHRPで標識されている場合はDAB）、停止試薬、核対比染色として使用するためのヘマトキシリン等を含むがこれらに限定されない。

【0517】

該キットまたはパケットはまた、患者のサンプル（例えば、組織調製物）の採取もしくはヘルスケア提供者への輸送のため、またはヘルスケア提供者からのサンプルの受け取り

10

20

30

40

50

のため、あるいは本明細書に記載の評価方法を行うための使用説明書及び製品も含み得る。例えば、操作情報の他に、本発明で取り上げられるキットまたはパッケージは、腫瘍生検で使用される1つ以上のツールを含み得る。

【0518】

該キットは、該IHC IVDアッセイに必要な試薬のための1つ以上の容器を含み得る。該試薬は、該アッセイでの使用に適した濃度で、または該アッセイで使用するための希釈用の説明書とともに提供され得る。いくつかの実施形態では、該キットは、該アッセイ成分用の別々の容器、仕切りまたは区画、及び情報材料を含む。例えば、該アッセイ成分を、ボトルまたはバイアルに含めることができ、該情報材料は、プラスチック製スリーブまたはパッケージに含めることができる。他の実施形態では、該キットの別々の要素は、単一の、仕切りのない容器に含まれる。例えば、アッセイ試薬は、ラベルの形態の情報材料を取り付けたボトルまたはバイアルに含まれる。いくつかの実施形態では、該キットは、複数の（例えば、1パックの）個々の容器を含み、各々は、1つ以上の単位形態の（例えば、1つのアッセイで使用するための）アッセイ成分を含む。例えば、該キットは、複数のアンプル、フォイルパッケージ、またはブリスターパックを含み、各々が、本開示のIHC IVDに使用するための単一のアッセイ試薬の単位を含む。該キットの容器は、気密性及び／または防水性であり得る。該容器は、使用のためのラベル付きであり得る。

【0519】

該キットまたはパッケージの情報材料は、その形態が限定されない。多くの場合、該情報材料、例えば、使用説明書は、印刷物、例えば、印刷されたテキスト、描画、及び／または写真は、ラベルまたは印刷されたシートで提供される。しかしながら、該情報材料は、他のフォーマット、例えば、コンピュータ可読材料、映像記録、または録音で提供することもできる。別の実施形態では、該キットの情報材料は、連絡先情報、例えば、実際の住所、電子メールアドレス、ウェブサイト、または電話番号であり、該キットまたはパッケージのユーザーは、該IHC IVD分析に必要な情報をどのように見つけるか、例えば、対象に投与された前治療をどこでどのように特定するか、及び組織調製物の細胞でのGPC3発現を特定するためのアッセイをどのように行うかに関する実質的な情報をそこから得ることができる。該情報材料は、任意の組み合わせのフォーマットでも提供され得る。

【0520】

いくつかの実施形態では、組織調製物は、アッセイで該サンプルを評価し、読み取り値を提供するアッセイの提供者、例えば、サービス提供者（例えば、第三者施設）またはヘルスケア提供者に提供される。例えば、1つの実施形態では、アッセイの提供者は、対象から組織調製物、例えば、腫瘍生検サンプルを受け取り、本明細書に記載のIHC IVDアッセイを使用して該サンプルを評価し、該サンプルが、膜結合型GPC3を発現する細胞を含むことを判断する。いくつかの実施形態では、該アッセイの提供者、例えば、サービス提供者またはヘルスケア提供者は、さらに、例えば、ヘルスケア提供者またはデータベースサービス提供者と接触することによって、患者が受けた任意の量の以前の抗GPC3療法、または患者が以前に任意の他の関連のある免疫療法もしくは他のがん治療（例えば、化学療法）による治療を受けたかどうかを判断することができる。

【0521】

該アッセイの提供者は、さらに、該アッセイの結果に基づいて、該対象が抗GPC3療法、例えば、抗GPC3抗体または抗GPC3 CAR-T療法による治療を開始もしくは継続するための候補であるか、または該対象がかかる治療を開始もしくは継続するための候補ではないことを判断することができる。該患者が既にかかる抗GPC3療法を受けている場合、該アッセイの結果に基づいて、該アッセイ提供者は、投与、投与間隔等に関する現在の療法に対する任意の調整が行われるべきかまたは行われ得るかどうかを潜在的に判断することができる。かかる判断は、該キットに含まれる使用説明書に従ってなされ得る。換言すれば、かかる判断は、アッセイの提供者で勤務する者の単に「頭の中」ではなく、該キットに含まれる使用説明書に基づき、該IHC IVDアッセイ自体によって

定義され得る。

【0522】

該アッセイの提供者は、該IHC IVDアッセイの結果、及び任意に、診断、予後、または適切な治療選択肢のうちの1つ以上に関する結論を、例えば、ヘルスケア提供者、または患者、または保険会社に、任意の適切なフォーマットで、例えば、郵便でもしくは電子的に、またはオンラインデータベースを介して提供することができる。該アッセイの提供者によって収集及び提供された情報は、データベースに保存され得る。

【0523】

したがって、1つの態様では、本発明は、容器、及び該容器に含まれる組成物を含む製品を提供し、該組成物は、1つ以上のGPC3抗体またはCAR修飾免疫細胞、好ましくは、本発明のCAR-TまたはCAR-NK細胞を含む。1つの実施形態では、該組成物は、本発明の核酸を含む。1つの実施形態では、抗体またはCAR修飾免疫細胞、好ましくは、CAR-TまたはCAR-NK細胞を含む組成物は、さらに担体を含み、該担体は、いくつかの実施形態では、医薬的に許容される。1つの実施形態では、本発明の製品は、さらに、該組成物（例えば、該抗体）を対象に投与するための使用説明書を含む。

【0524】

1つの態様では、本発明は、1つ以上のGPC3抗体またはCAR修飾免疫細胞、好ましくは、本発明のCAR-TまたはCAR-NK細胞を含む組成物を含む第一の容器、及び緩衝剤を含む第二の容器を含むキットを提供する。1つの実施形態では、該緩衝剤は、医薬的に許容される。1つの実施形態では、キットは、さらに、該組成物（例えば、該抗体）を対象に投与するための使用説明書を含む。

【0525】

1つの態様では、本発明は、疾患、例えば、がん、腫瘍及び／または細胞増殖性障害の治療的及び／または予防的処置のための薬剤の調製における本発明の製品の使用を提供する。

【0526】

1つの態様では、本発明は、疾患、例えば、がん、腫瘍及び／または細胞増殖性障害の治療的及び／または予防的処置のための薬剤の調製における本発明のキットの使用を提供する。

【0527】

III. 抗GPC3抗体のさらなる使用方法

A. 治療法

本発明の抗体は、例えば、インビトロ、エキソビボ、及びインビボ治療法において使用され得る。1つの態様では、本発明は、インビボまたはインビトロのいずれかで、細胞の成長または増殖を阻害する方法を提供し、該方法は、細胞を、GPC3に対する抗GPC3抗体の結合を許容する条件下で該抗体に曝露することを含む。「細胞の成長または増殖を阻害すること」とは、細胞の成長または増殖を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%減少させることを意味し、細胞死を誘発することを含む。ある特定の実施形態では、該細胞は、腫瘍細胞である。ある特定の実施形態では、該細胞は、例えば、本明細書に例示されるような異種移植片である。該抗体はまた、(i) それらが結合する細胞の成長もしくは増殖を阻害し得るか、(ii) それらが結合する細胞の死を誘発し得るか、(iii) それらが結合する細胞の離層を阻害し得るか、(iv) それらが結合する細胞の転移を阻害し得るか、または(v) それらが結合する細胞を含む腫瘍の血管新生を阻害し得る。

【0528】

1つの態様では、本発明の抗体は、細胞増殖性障害を治療または予防するために使用される。ある特定の実施形態では、該細胞増殖性障害は、GPC3の発現及び／または活性の増加と関連する。例えば、ある特定の実施形態では、該細胞増殖性障害は、細胞の表面でのGPC3の発現の増加と関連する。ある特定の実施形態では、該細胞増殖性障害は、腫瘍またはがんである。

【0529】

1つの態様では、本発明は、個体に対して、有効量の抗GPC3抗体を投与することを含む、細胞増殖性障害の治療方法を提供する。1つの実施形態では、抗GPC3抗体は、GPC3の発現及び／または活性の増加と関連する障害に罹患した個体で、GPC3を結合するための方法に使用することができ、該方法は、GPC3が、該個体において結合されるように、該個体に該抗体を投与することを含む。1つの実施形態では、該GPC3は、ヒトGPC3であり、該個体は、ヒト個体である。抗GPC3抗体は、治療目的のためにヒトに投与することができる。さらに、抗GPC3抗体は、獣医学的な目的で、またはヒト疾患の動物モデルとして、該抗体が交差反応するGPC3を発現する非ヒト哺乳類（例えば、霊長類、ブタ、ラット、またはマウス）に投与することができる。後者に関して、かかる動物モデルは、本発明の抗体の治療効果を評価するのに有用であり得る（例えば、用量及び経時的な投与の試験）。

10

【0530】

本発明の抗体（及び任意のさらなる治療薬またはアジュバント）は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内、ならびに局所治療が望ましい場合、病変内投与を含めた任意の適切な手段によって投与され得る。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。さらに、該抗体は、パルスインフュージョンによって、特に該抗体の用量を減少させながら、適切に投与される。服薬は、該投与が短期であるか、または長期であるかに部分的に依存して、任意の適切な経路、例えば、静脈内または皮下注射等の注射によることができる。

20

【0531】

本発明の抗体は、適正な医療行為に相応した方法で、製剤化、服薬、及び投与される。これに関連して考慮する要因としては、治療される特定の障害、治療を受ける特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、及び医療従事者に既知の他の要因が挙げられる。

【0532】

B. 活性アッセイ

本発明の抗GPC3抗体は、それらの物理的／化学的特性及び／または生物学的活性について、当技術分野で既知の様々なアッセイによって特性評価され得る。

【0533】

1. 活性アッセイ

1つの態様では、アッセイは、生物学的活性を有する抗GPC3抗体を、そこから同定するために提供される。生物学的活性としては、例えば、細胞の成長または増殖を阻害する能力（例えば、「細胞殺傷」活性）、またはプログラム細胞死（アポトーシス）を含めた細胞死を誘発する能力が挙げられ得る。かかる生物学的活性をインビボ及び／またはインビトロで有する抗体もまた提供する。

30

【0534】

ある特定の実施形態では、抗GPC3抗体は、インビトロで細胞の成長または増殖を阻害するその能力について試験される。細胞の成長または増殖の阻害に関するアッセイは、当技術分野で周知である。本明細書に記載の「細胞殺傷」アッセイで例示される細胞増殖に関するある特定のアッセイは、細胞の生存を測定する。1つのかかるアッセイは、Cell Titer-Glo（商標）Luminescent Cell Viability Assayであり、これは、Promega（Madison, WI）から市販されている。そのアッセイは、代謝的に活性な細胞を示す、ATPの存在の定量に基づいて、培養中の生存細胞の数を測定する。Crouch et al（1993）J. Immunol. Meth. 160: 81-88、米国特許第6602677号を参照されたい。該アッセイは、96ウェルまたは384ウェルのフォーマットで行われ得るため、自動ハイスループットスクリーニング（HTS）に適している。Cree et al（1995）Anticancer Drugs 6: 398-404を参照されたい。該アッセイの手順は、単一の試薬（Cell Titer-Glo（登録商標）試薬）を培養細胞に

40

50

直接加えることを含む。これにより、細胞溶解、及びルシフェラーゼ反応によって生じる発光シグナルの生成がもたらされる。該発光シグナルは、ATPの存在量に比例し、これは、培養中に存在する生存細胞の数に直接比例する。データは、照度計またはCCDカメラの撮像装置によって記録され得る。該発光出力は、相対発光量（RLU）として表される。

【0535】

細胞増殖に関する別のアッセイは、「MTT」アッセイ、すなわち、ミトコンドリアレダクターゼによる3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミドのホルマザンへの酸化を測定する比色アッセイである。Cell Titer-Glo（商標）アッセイと同様、このアッセイは、細胞培養中に存在する代謝的に活性な細胞の数を示す。例えば、Mosmann（1983）J. Immunol. Meth. 65:55-63、及びZhang et al.（2005）Cancer Res. 65:3877-3882を参照されたい。

【0536】

ある特定の態様では、抗GPC3抗体は、インビトロで細胞死を誘発するその能力について試験される。細胞死の誘導に関するアッセイは、当技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、かかるアッセイは、例えば、ヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンブルー（Moore et al.（1995）Cytotechnology, 17:1-11参照）、または7AADの取り込みによって示される膜の完全性の喪失を測定する。例示的なPI取り込みアッセイでは、細胞を、10%熱不活化FBS（Hyclone）及び2mMのL-グルタミンを補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）：ハムF-12（50:50）にて培養する。したがって、該アッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の非存在下で行われる。細胞を、100x20mmのディッシュに、ディッシュ当たり3x10⁶個の密度で播種し、終夜付着させる。培地を除去し、新鮮培地のみまたは様々な濃度の抗体を含む培地と交換する。該細胞を、3日間インキュベートする。処理後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理により剥離する。次いで、細胞を1200rpmで5分間、4℃にて遠心分離し、そのペレットを3mlの冷Ca²⁺結合緩衝液（10mM HEPES, pH 7.4、140mM NaCl、2.5mM CaCl₂）に再懸濁し、細胞凝集塊を除去するための35mmのストレーナーで覆った12x75mmのチューブ（チューブ当たり1ml、処理群当たり3本）に等分する。次いで、チューブにPI（10μg/ml）を入れる。サンプルを、FACSCAN（商標）フローサイトメーター及びFACSCONVERT（商標）CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson）を使用して分析する。PIの取り込みによって特定される、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗体をこのようにして同定する。

【0537】

1つの態様では、抗GPC3抗体は、インビトロでアポトーシス（プログラム細胞死）を誘導するその能力について試験される。アポトーシスを誘導する抗体の例示的なアッセイは、アネキシン結合アッセイである。例示的なアネキシン結合アッセイでは、前の段落で論じたように、細胞を培養し、ディッシュに播種する。培地を除去し、新鮮培地のみまたは0.001~10μg/mlの抗体を含む培地と交換する。3日間のインキュベーション期間の後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理により剥離する。次いで、細胞を遠心分離し、Ca²⁺結合緩衝液に再懸濁し、前の段落で論じたようにチューブに等分する。次いで、チューブに、標識アネキシン（例えば、アネキシンV-FITC）（1μg/ml）を入れる。サンプルを、FACSCAN（商標）フローサイトメーター及びFACSCONVERT（商標）CellQuestソフトウェア（BD Biosciences）を使用して分析する。対照に対して統計的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体をこのようにして同定する。アポトーシスを誘導する抗体の別の例示的なアッセイは、ゲノムDNAのヌクレオソーム間分解を検出するためのヒストンDNA ELISA比色アッセイである。かかるアッセイは、例えば、細胞死検出ELISAキット（Roche, Palo Alto, CA）を用いて行われ得る。

【0538】

上記のインビトロアッセイのうちのいずれかで使用される細胞としては、GPC3を天然に発現するか、またはGPC3を発現するように操作された細胞または細胞株が挙げられる。かかる細胞は、同じ組織起源の正常細胞に対してGPC3を過剰発現する腫瘍細胞を含む。かかる細胞としては、GPC3を発現する細胞株（腫瘍細胞株を含む）、及びGPC3を通常発現しないがGPC3をコードする核酸でトランスフェクトされた細胞株も挙げられる。

【0539】

1つの態様では、その抗GPC3抗体は、インビボで細胞の成長または増殖を阻害するその能力について試験される。ある特定の実施形態では、その抗GPC3抗体は、インビボで腫瘍の成長を阻害するその能力について試験される。インビボモデル系、例えば、異種移植モデルが、かかる試験に使用され得る。例示的な異種移植系では、ヒト腫瘍細胞を、適切な免疫抑制状態にある非ヒト動物、例えば、SCIDマウスに導入する。本発明の抗体を該動物に投与する。該抗体が腫瘍成長を阻害または低減する能力を測定する。上記異種移植系のある特定の実施形態では、該ヒト腫瘍細胞は、ヒト患者由来の腫瘍細胞である。ある特定の実施形態では、該ヒト腫瘍細胞は、適切な免疫抑制状態にある非ヒト動物に、皮下注射によって、または適切な部位、例えば、乳腺脂肪体への移植によって導入される。

【0540】

2. 結合アッセイ及び他のアッセイ

1つの態様では、抗GPC3抗体は、その抗原結合活性について試験される。例えば、ある特定の実施形態では、抗GPC3抗体は、細胞の表面で発現されるGPC3に結合するその能力について試験される。FACSアッセイが、かかる試験に使用され得る。1つの態様では、競合アッセイを使用して、配列番号2及び配列番号4の可変ドメインを含むモノクローナル抗体、または配列番号2及び配列番号4の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインならびにIgG由来の定常ドメインを含むキメラ抗体と、GPC3への結合をめぐって競合するモノクローナル抗体を同定してもよい。ある特定の実施形態では、かかる競合抗体は、配列番号2及び配列番号4の可変ドメインを含むモノクローナル抗体、または配列番号2及び配列番号4の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインならびにIgG由来の定常ドメインを含むキメラ抗体が結合する同じエピトープ（例えば、線状またはコンフォメーションエピトープ）に結合する。例示的な競合アッセイとしては、Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) に提供されるもの等の日常的なアッセイが挙げられるがこれに限定されない。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に提供されている。2つの抗体は、各々が他方の結合を50%以上ブロックする場合、同じエピトープに結合すると言われる。

【0541】

例示的な競合アッセイでは、固定化GPC3を、GPC3（例えば、配列番号2及び配列番号4の可変ドメインを含むモノクローナル抗体、または配列番号2及び配列番号4の配列を含むモノクローナル抗体（図2）の可変ドメインならびにIgG由来の定常ドメインを含むキメラ抗体）に結合する一次標識抗体、ならびにGPC3への結合をめぐって該一次抗体と競合するその能力について試験される二次未標識抗体を含む溶液中でインキュベートする。該二次抗体は、ハイブリドーマ上清に存在し得る。対照として、固定化GPC3を、該一次標識抗体を含むが二次未標識抗体を含まない溶液中でインキュベートする。GPC3への該一次抗体の結合が可能な条件下でのインキュベーション後、過剰な未結合抗体を除去し、固定化GPC3と会合した標識の量を測定する。固定化GPC3と会

合した標識の量が対照サンプルに対して試験サンプルで実質的に減少している場合、該二次抗体がGPC3への結合をめぐって該一次抗体と競合していることを示す。ある特定の実施形態では、固定化GPC3は、細胞の表面に存在するか、またはその表面でGPC3を発現する細胞から得た膜調製物に存在する。

【0542】

1つの態様では、精製された抗GPC3抗体は、N末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー、及びパepsin消化が挙げられるがこれらに限定されない一連のアッセイによってさらに特性評価され得る。

【0543】

以下の実施例は、例示の目的で提供するに過ぎず、いかなる方法によっても本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本明細書に引用されるすべての特許、特許出願、及び文献参照は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0544】

以下の実施例は、当業者に対して、本発明の方法及び組成物がどのように作製及び使用されるかの完全な開示及び説明を提供するために提示されるものであり、本発明者らの発明であると本発明者らが見なすものの範囲を限定することを意図していない。使用される数字（例えば、量、温度等）については、精度を確保するように努めているが、ある程度の実験誤差及び偏差は考慮されたい。別途示されない限り、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は、摂氏温度であり、圧力は、大気圧であるか、またはそれに近い。

【0545】

実施例1．抗GPC3モノクローナル抗体の生成

免疫化

6週齢のBALB/cマウスを、精製rhGPC3タンパク質で免疫化し、アジュバント併用療法で処理した。その後のブーストに関しては、各マウスにrhGPC3とアジュバント療法を3～4日ごとに6週間にわたって施した。

【0546】

マウスドナーの選択

5回目及び12回目のrhGPC3の注射後に補足の採血を行い、血清サンプルを力価特定のために収集した。免疫応答を観察するため、免疫化マウスの血清をフローサイトメトリーにより、hGPC3発現細胞株（例えば、HepG2及びRAT2GPC3）に結合する抗hGPC3抗体についてスクリーニングした。最も高い血清力価を有するマウスを融合用を選択した。融合用を選択したマウスを、最後のブーストの4日後にサクリファイスした。

【0547】

マウス抗体を産生するハイブリドーマの生成

マウスリンパ節から単離したリンパ球を、非分泌性マウス骨髓腫細胞株Sp2/O-Ag14と融合させ、これらのハイブリドーマ細胞を6日間のインキュベーション期間後、384ウェルプレートにシングルセルソーティングした。

【0548】

9日間のインキュベーション期間後、ハイブリドーマ上清を、フローサイトメトリーを介して抗原特異性について希釈せずにスクリーニングした。陽性クローンを96ウェルプレートで増殖させ、続いて二次スクリーニングを行い、24ウェルプレートで増殖させた。ハイブリドーマ上清からの抗体濃度を定量し、アイソタイプ分類／配列決定し、小規模精製に供した。

【0549】

配列決定手順

全RNAをハイブリドーマから単離した。2段階逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-

10

20

30

40

50

PCR)を、SMARTer (登録商標)による5' / 3' cDNA末端迅速増幅 (RACE)を使用して行った (Takara Bio, Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)。簡潔には、cDNAを逆転写によって合成した。重鎖及び軽鎖のRACE PCRを、特定のアイソタイプに対する遺伝子特異的プライマーを用いて行った (Bradbury, A. 2010. Cloning Hybridoma cDNA by RACE. In: Kontermann R., Dubel S. (eds) Antibody Engineering. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01144-3_2)。

【0550】

RACE PCR産物を、CloneJET PCRクローニングキット (Thermo Fisher, Waltham, MA)を使用してサブクローニングし、続いて、サンガー法による配列決定ならびにKabatのナンバリング及び解析によるアノテーションを行った。具体的には、フレームワーク領域及びCDRの程度をKabat et al. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, 1991参照)に従って定義した。Kabatのデータベースはオンラインで維持されている (ワールド・ワイド・ウェブ ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)。

【0551】

V_H及びV_Lドメインの配列の概要

以下の表1は、204mAbのフレームワーク領域 (FR 1~4) 及び相補性決定領域 (CDR 1~3) のアミノ酸配列を示す。表2に示すのは、204の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域に対応する核酸配列及びアミノ酸配列である。表3及び4は、それぞれ、表1及び2に示される配列に対応する配列番号を示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1:204 のフレームワーク領域及び相補決定領域								
GPC 3 ク ロー ン	アイ ソタ イプ	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
204	IgG2b	EVQLQQ SGPELV KPGASV KISCKTS GYTFT (配列番 号 5)	EYAMH (配列番 号 6)	WVKQS HGKSLE WIG (配列番 号 7)	GINPN NGVTT YNQRF KG (配列番 号 8)	KATLTV DKSSST AYMEL RSLTSE DSAVYY CAR (配列番 号 9)	GLLW YAY (配列番 号 10)	WGQG TLVTV SA (配列番 号 11)
	カッ パ	DIKMTQ SPSSMY ASLGER VTITC (配列番 号 12)	KASQDI NSYLS (配列番 号 13)	WFQQK PGKSPK TLIY (配列番 号 14)	RANRL VD (配列番 号 15)	GVPSRF SGSGSG QDYSLT ISSLEYE DMGIYY C (配列番 号 16)	LQYDE FPLT (配列番 号 17)	FGAG TKLEL K (配列番 号 18)

10

20

30

40

50

【表 3】

表 2: 204 の VH 及び VL 領域			
GPC 3 ク ロー ン	アイ ソタ イプ	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列
204	IgG2b	EVQLQQSGPELVKPGASV KISCKTSGYTFTEYAMHW VKQSHGKSLEWIGGINPNN GVTTYNQRFK GKATLTVD KSSSTAYMELRSLTSEDSA VYYCARGLLWYAYWGQG TLVTVSA (配列番号 2)	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGA GCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCA CTGAATACGCCATGCACTGGGTGAAGCAG AGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG AGGTATTAATCCTAACAATGGTGTACTAC TTACAACCAGAGGTTCAAGGGCAAGGCCA CATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACA GCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATC TGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAG AGGCCTACTATGGTATGCTTACTGGGGCC AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号 1)
	カッ パ	DIKMTQSPSSMYASLGERV TITCKASQDINSYLSWFQQ KPGKSPKTLIYRANRLVDG VPSRFSGSGSGQDYSLTIS LEYEDMGIIYYCLQYDEFPL TFGAGTKLELK (配列番号 4)	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCC ATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCAC TATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTA ATAGCTATTTAAGCTGGTTCAGCAGAAA CCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTA TCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCC CATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG CAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTG GAGTATGAAGATATGGGAATTTATTATTG TCTACAGTATGATGAGTTTCTCTCACGTT CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (配列番号 3)

【 0 5 5 2 】

表 3 及び 4 は、それぞれ、表 1 及び 2 に示される配列に対応する配列番号を示す。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3: 204 の V _H 及び V _L の配列番号		
	ヌクレオチド	AA
V _H	配列番号 1	配列番号 2
V _L	配列番号 3	配列番号 4

10

【表 5】

表 4: 204 の FR 及び CDR の配列番号	
HFR1	配列番号 5
HCDR1	配列番号 6
HFR2	配列番号 7
HCDR2	配列番号 8
HFR3	配列番号 9
HCDR3	配列番号 10
HFR4	配列番号 11
LFR1	配列番号 12
LCDR1	配列番号 13
LFR2	配列番号 14
LCDR2	配列番号 15
LFR3	配列番号 16
LCDR3	配列番号 17
LFR4	配列番号 18

20

30

【0553】

実施例 2. GPC. 204 モノクローナル抗体の特性評価

細胞ベースのアッセイであるバイオレイヤー干渉 (BLI) 競合的結合アッセイ

交差競合アッセイは、抗原を低レベルで (混雑アーチファクトを最小限にするために) 固定し、その抗原を抗 GPC3 抗体で飽和させ、次いでバイオセンサーを競合抗体に曝露することによって直列に行った。ストレプトアビジン (SA) バイオセンサー (Fortebio, Fremont, CA) にビオチン化抗原を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 200 秒間かけてロードした (最終波長シフト 0.8 nm まで)。抗原をロードしたバイオセンサーを、 150 nM の飽和抗体に 600 秒間 (持続的なプラトーが達成されるまで)、次いで 150 nM の競合抗体に 300 秒間曝露した。各抗体に関して抗原への最大の結合を示すために、抗原をロードしたバイオセンサーを同様に、緩衝液のみ (すなわち、飽和抗体なし) に曝露した後に競合抗体に曝露した。これらの結合データは、Octet データ分析ソフトウェア v11.0 (Sartorius, AG, Göttingen, Germany) 及びこのソフトウェアの「プロセスエピソードビニングデータ」機能を使用して分析した。得られた各競合抗体の結合シグナル (nm) を、抗体ごとに最大結合シグナル (飽和抗体なし) で割ることによって、結合 % として表した。

40

50

【0554】

このアッセイの結果を以下の表5に数値化する。表5において、50%未満の競合的抗体結合をブロッキングと見なした。対角の結合パーセンテージは、自己ブロッキングを測定し、0%に近いことが予想される。

【表6】

表 5: BLI 競合的結合アッセイの結果		
飽和抗体	競合抗体の結合%	
	204	GC33
204	18.2	97.2
GC33	89.9	0
緩衝液	100	100

10

【0555】

表5のデータは、204が結合したGPC3は、GPC3の結合をブロックせず、GPC3が結合したGPC3は、204の結合を実質的にブロックしなかったことから、204が、GC33とは異なるGPC3エピトープに結合することを示している。

20

【0556】

BLI 結合アッセイ

本開示の精製されたマウス抗ヒトGPC3モノクローナル抗体の結合パラメータを評価するため、BLI 結合アッセイを行った。簡潔には、抗マウスIgG-Fc捕捉（AMC）バイオセンサー（Fortebio, Fremont, CA）に精製抗体（マウスIgG）を濃度1~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で300秒かけてロードした（最終的な波長シフト0.8~1.0 nmまで）。ヒト化GC33抗体を、同じパラメータを用いて抗ヒトIgG-Fc捕捉（AHC）バイオセンサーに固定した。これらの抗体をロードしたバイオセンサーを、100 nMから開始して1:3に連続希釈した5種の濃度の抗原（分析物）に曝露した。抗体をロードしたバイオセンサーを同様に、カインティック緩衝液のみを含む参照ウィル（will）に曝露した（ドリフトを補正するため）。抗体をロードしていないバイオセンサーも抗原に曝露して、センサーへの非特異的結合をチェックしたところ、結合は観察されなかった（データは示さず）。少なくとも4つの濃度からのデータを、グローバル1:1カーブフィットモデルを用いてフィットさせ、見込まれる動態会合及び解離速度ならびに K_D 値を特定した。計算された定数が許容されるためには、結合統計値は許容されるパラメータ内に収まらなければならない（すなわち、 $\chi^2 \leq 3.0$ 及び $R^2 \geq 0.95$ ）。

30

【0557】

本開示の種々の抗GPC3モノクローナル抗体に対応する結合アッセイについての生データを図1A~1Cに示す。特定された動態会合／解離速度及び K_D 値を以下の表6に示す。

40

【表 7】

表 6: 204、1G12、及び GC33 の結合及び動態パラメータ						
抗体	エピトープ ドメイン	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	χ^2	R^2
204	C 末端	2.5	8.2×10^5	2.1×10^{-3}	0.04	1.00
1G12	C 末端	3.0	1.7×10^5	5.3×10^{-4}	0.00	1.00
GC33	C 末端	1.0	3.4×10^5	3.4×10^{-4}	0.02	1.00

10

【0558】

表 6 に示すデータは、C 末端の 204 抗体が、他の対照の C 末端 GPC3 抗体 1G12 及び GC33 と比較した場合、組み換え GPC3 に対して同等の親和性を示すことを示す。

【0559】

ウェスタンブロットによる細胞溶解物中の GPC3 の評価

様々な腫瘍細胞株をコンフルエンスまで成長させ、無血清上清を 24 時間で回収し、20 倍濃縮した。4X LDS 緩衝液 (ThermoFisher, Waltham, MA) $\pm$ 8% β -Me を濃縮した無血清上清または rhGPC3 に最終濃度 1X LDS $\pm$ 2% β -Me まで加え、それらのサンプルを 95°C で 10 分間加熱した。サンプルを、10 ウェルの Bis-Tris ゲルに、40 μ L の上清または 300 ng の rhGPC3 とともにロードし、200 V で 40 分間泳動させた。タンパク質を、iBlot2 の説明書 (ThermoFisher, Waltham, MA) に従ってニトロセルロースに転写した。そのブロットを、5% BSA、1X TBS、0.1% Tween 20 染色希釈剤中、1 μ g/mL の一次抗体にて、室温で 2 時間染色した。次いで、ブロットを、IRDye 800 結合二次抗体 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) で、Li-Cor の推奨に従って染色し、Li-Cor Odyssey 装置を使用して撮像した。

20

30

【0560】

図 2A は、rhGPC3 の C 末端を認識する本開示の抗体のウェスタンブロッティングの結果を示す。示されるように、204、GC33、及び 1G12 の各々は、還元条件 (R) 下で GPC3 の 32 kDa ベータ鎖を検出するが、非還元条件 (NR) 下では検出しない。図 2B は、還元及び非還元条件下で、rhGPC3、rhGPC5、及び rhGPC6 をプローブするために使用した 204 及び 1G12 抗体のウェスタンブロッティングの結果を示す。図 2A と同様、GPC3 の 32 kDa ベータ鎖は、還元条件下で検出されるが、非還元条件下では検出されない。204 抗体も 1G12 抗体も、サンプルが還元されたか否かに関わらず、rhGPC5 も rhGPC6 も検出しない。

【0561】

図 3 を見ると、示されるのは、204 によってプローブされた、可溶性天然ヒト GPC3 のウェスタンブロット分析である。調べた腫瘍細胞株は、HepG2、NCI-H661、及び Hep3B を含んでいた。32 kDa ベータ鎖 (HS 側鎖なし) は、NCI-H661 腫瘍細胞株上清において還元条件下でのみ検出された。実際、この可溶性 GPC3 は、NCI-H661 上清中に非グリコシル化及び非スルフィン化コアタンパク質としてのみ存在すると考えられる。HepG2 及び Hep3B に関して、還元条件下での 37~50 kDa の間のスメアは、C 末端断片のグリコシル化されたスルフィン化型を表すと思われる。

40

【0562】

rhGPC3 の ADAM 切断

50

r h G P C 3 の A D A M 1 0 及び A D A M 1 7 切断を使用して、2 0 4 の結合領域をプローブした。図 4 に示すのは、主要な G P C 3 アイソフォーム（アイソフォーム 2）のハイレベルの図であり、フューリン切断部位、可能な 2 0 4 エピトープ、G C 3 3 免疫原（5 2 4 ~ 5 6 2）、1 G 1 2 免疫原（5 1 1 ~ 5 8 0）、及び G C 3 3 エピトープ（5 4 2 ~ 5 5 5）を示している。図 5 に示すのは、同様の図であり、潜在的な A D A M 1 0 切断部位をさらに示している。r h G P C 3（約 2 μ g）を切断するために A D A M 1 0 及び A D A M 1 7 を使用し、サンプルを S D S - P A G E で泳動し、タンパク質をクーマシー染色で可視化した（図 6 A）。示されるように、A D A M 1 0 及び A D A M 1 7（より低い程度まで）は両方とも、フューリン切断部位で r h G P C 3 を切断すると思われ、未消化 r h G P C 3 と比較して、N 末端及び C 末端断片の強度の増加をもたらす。同様に調製したサンプルを、ウェスタンブロットを介して分析した。ここで使用した一次抗体は、2 0 4 及び G C 3 3 であった（図 6 B）。

10

【0 5 6 3】

約 1 2 k D a の A D A M 1 0 断片（図 6 A ~ 6 B 参照）を、G C 3 3 抗体によって、及びクーマシーによって検出する。これは、提案された A D A M 1 0 切断部位と G P I アンカー切断部位（n o t u m による）の間の予測された 1 1 . 7 k D a の C 末端 G P C 3 Δ H S 切断断片に対応する。2 0 4 抗体はこのバンドを検出しないため、2 0 4 抗体のエピトープがフューリン切断部位と予測 A D A M 1 0 切断部位の間の場所にあることが示される。

20

【0 5 6 4】

実施例 3 . I H C による細胞表面 G P C 3 の評価

2 0 4 m A b について最適化された G P C 3 の I H C プロトコル

2 0 4 m A b について最適化された G P C 3 の I H C プロトコルの概要を図 7 の方法 7 0 0 として示す。簡潔には、方法 7 0 0 のステップ 7 0 2 は、L e i c a B o n d I I システム（L e i c a B i o s y s t e m s I n c . , R i c h m o n d , I L ）にスライドをロードすることを含むが、他の自動 I H C 染色システムを、本開示の範囲から逸脱することなく使用してもよい。ステップ 7 0 4 では、方法 7 0 0 は、脱パラフィンステップ及び再水和ステップを含む。ステップ 7 0 6 では、方法 7 0 0 は、E D T A ベースの高 pH 溶液に依存する熱誘導エピトープ回復ステップを含む。ステップ 7 0 8 では、方法 7 0 0 は、一次抗体（すなわち、2 0 4 m A b）中でスライドをインキュベートすることを含む。ステップ 7 0 8 に進むと、方法 7 0 0 は、H R P - ポリマー結合二次抗体とのスライドのインキュベーションを含む。ステップ 7 1 2 は、過酸化ブロッキングステップを含み、その後、ステップ 7 1 4 において、D A B 色素原とのインキュベーションが続く。ステップ 7 1 6 は、アンロード、脱水、及び染色されたスライドへのカバースリップの適用を含む。明確に図示されていないが、図 7 の方法を実施する前に、選択された組織を固定し、パラフィンに包埋し、その後、組織を切断し、マウントすることが理解され得る。具体的には、このプロトコルは、9 5 % E t O H に 5 / 5 / 3 分浸漬、1 0 0 % E t O H に 3 / 3 / 3 分浸漬に続いて、キシレンでの処理（透明になるまで / 5 / 5 分浸漬）、及びその後マウントすることを含んでいた。ステップ 7 0 4 における脱パラフィンは、標準的なプロトコルを用いて行った。

30

40

【0 5 6 5】

したがって、図 7 は、本開示の 2 0 4 m A b に対する最適化された G P C 3 I H C 染色プロトコルに対応するハイレベルの方法 7 0 0 を表す。上述の最適化プロトコルのより詳細なバージョンが表 7 に示されており、ここでは、ステップは、それらが表で降下する順序で行われる。

50

【表 8】

表 7: Leica Bond III 染色システムでの FFPE 標本に対して最適化された膜結合型 GPC3 IHC 染色手順			
ステップ	インキュベーション時間	分注体積	温度
組織切断及び空気乾燥	N/A	N/A	周囲
スライドベーキング	60 分	N/A	55-65°C
Leica Bond III へのスライドのロード	N/A	N/A	周囲
Bond Dewax Solution	N/A	150 µL, 3 回	72°C
アルコール	N/A	150 µL, 3 回	周囲
Bond Wash Solution	N/A	150 µL, 3 回	周囲
Bond ER Solution 2	20 分	150 µL, 4 回	100°C
Bond Wash Solution	N/A	150 µL, 5 回	周囲
一次抗体 (0.1µg/mL ; 1:5000 Bond Diluent 中)	30 分	150 µL, 1 回	周囲
Bond Wash Solution	N/A	150 µL, 3 回	周囲
一次後	8 分	150 µL, 1 回	周囲
Bond Wash Solution	N/A	150 µL, 3 回	周囲
ポリマー	8 分	150 µL, 1 回	周囲
Bond Wash Solution	N/A	150 µL, 3 回	周囲
過酸化物ブロック	5 分	150 µL, 1 回	周囲
Bond Wash Solution	N/A	150 µL, 3 回	周囲
脱イオン水	N/A	150 µL, 2 回	周囲
Mixed DAB Refine	10 分	150 µL, 2 回	周囲
脱イオン水	N/A	150 µL, 3 回	周囲
ヘマトキシリン	7 分	150 µL, 1 回	周囲
脱イオン水	N/A	150 µL, 3 回	周囲
Bond Wash Solution	N/A	150 µL, 1 回	周囲
脱イオン水	N/A	150 µL, 1 回	周囲
アンロード、脱水、及びカバースリップ	N/A	N/A	周囲

10

20

30

40

【0566】

典型的な結果を図 8 に示す。具体的には、図 8 は、ヒト HCC の TMA からの代表的な画像を示しており、組織は、204 mAb に関して上記で論じた最適化プロトコルで染色した。染色は、本明細書に開示する半定量的膜結合型 GPC3 Hスコアリングを用いて、正式な病理学者が評価した。

【0567】

肺及び肝臓の健常対罹患組織での 204 mAb と 1G12 mAb の比較

上記で論じた 204 抗体に対する最適化プロトコルを使用して、健常対罹患組織及び対応する膜結合型の Hスコアを 204 抗体に関して、1G12 抗体と比較して調べた。具体

50

的には、罹患組織サンプルは、肺扁平上皮癌及びHCCを含んでいた。図9に示すのは、204抗体及び1G12抗体で染色した疾患組織の代表例であり、対応する膜結合型のHスコア決定とともに示す。図10に示すのは、正常な肝臓及び肺組織（すなわち、図9の対応する罹患組織サンプルに隣接する組織）における204mAb及び1G12mAbで観察された染色の欠如の代表例である。

【0568】

1G12と204のGPC3^{hi}及びGPC3^{lo}細胞での比較

本試験では、ヒトHCC細胞株を、NSGマウスに皮下移植し、PP5及びHepG2の移植後、それぞれ、24日目及び31日目に腫瘍を採取した。PP5腫瘍は、HepG2腫瘍と比較して、GPC3発現のばらつきがかなり高く、PP5腫瘍は、全体的なGPC3発現が低い。したがって、PP5細胞を、本明細書ではGPC3^{lo}と呼び、HepG2細胞を、本明細書ではGPC3^{hi}と呼ぶ。上記で論じたプロトコルと同様のプロトコルを本試験で使用した。このIHCプロトコルは、1G12に対して0.5 µg/mL、及び204に対して0.1 µg/mLを含め、病理学者によって選択された抗体力価を使用した。アイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。図11に示すように、この状況において、膜結合型のHスコアは、GPC3^{hi}細胞では実質的に同様であった。代替的に、膜結合型のHスコアは、204抗体で染色したGPC3^{lo}細胞では、1G12抗体と比較して有意に高かった。図11に対応するデータを図12に数値化する。

【0569】

様々ながんにおけるGPC3の出現率

本試験では、204抗体及び1G12抗体を使用して、GPC3発現に関して、様々ながん細胞型から調製したTMAをプローブした。具体的には、204抗体を用いた分析のために調製したTMAの型には、HCC、肺の小細胞癌（SCC）、卵巣明細胞癌（OCCC）、及び胃癌（ステージIII/IV）を含めた。1G12抗体を用いた分析のために調製したTMAの型には、HCC、SCC、及びOCCCを含めた。HCC TMAでは、対象当たり2つのコアを29のうちの28対象を含めた。204抗体を用いてプローブしたHCC TMAに関して、すべての陽性対象のコアからの膜結合型のHスコアを用いて、平均及び中央値を計算した。204抗体を用いて得られたデータを表8に示し、1G12抗体を用いて得られたデータを表9に示す。

【表9】

表 8: 204 mAb でプローブした TMA							
TMA の型	評価した症例の合計数	GPC3 陽性症例の合計数	細胞質プラス膜結合型 GPC3 の出現率	膜結合型 GPC3 の陽性症例数	膜結合型 GPC3 の陽性症例の出現率	陽性症例のみからの膜結合型 GPC3 の Hスコアの中央値	陽性症例のみからの膜結合型 GPC3 の Hスコアの平均値
HCC**,***	29	22	76%	13	45%	60.0	117
肺の SCC	65	18	28%	11	17%	4.0	43.3
OCCC	30	9	30%	6	20%	4.0	31.3
胃(III/IV)*	120	3	3%	1	1%	N/A	N/A

【表 10】

表 9: 1G12 mAb でプローブした TMA							
TMA の型	評価した症例の合計数	GPC3 陽性症例の合計数	細胞質プラス膜結合型 GPC3 の出現率	膜結合型 GPC3 の陽性症例数	膜結合型 GPC3 の陽性症例の出現率	陽性症例のみからの膜結合型 GPC3 の H スコアの中央値	陽性症例のみからの膜結合型 GPC3 の H スコアの平均値
HCC**	29	22	76%	12	41%	30.0	106.1
肺の SCC	65	22	34%	15	23%	10.0	22.4
OCCC	30	10	33%	6	20%	5.0	26.5

10

【0570】

20

膜結合型 GPC3 の出現率分布

本試験では、膜結合型 GPC3 の HCC 及び肺 SCC（図 14 A）、HCC（図 14 B）、ならびに肺 SCC（図 14 C）での出現率分布を、204 抗体及び 1G12 抗体の各々を使用して調べた。染色強度は、認定病理学者が、0（陰性）～3（または 3+）の半定量的整数スケールを用いて採点した。強度パーセントを、1+、2+、及び 3+について合わせた。第一のピンは 0～1% に設定され、第二のピンは 1% を超えて 10% 以下に設定され、以下同様に 10% の単位で設定された。図 14 A 及び 14 B に関して、多くの場合（29 のうちの 28 対象）において、対象当たり 2 つのコアが HCC TMA TA 3134 に含まれるため、それらの場合には強度を平均した。

【0571】

30

膜結合型 GPC3 の HCC 及び肺 SCC（図 14 D）、HCC（図 14 E）、ならびに肺 SCC（図 14 E）での出現率分布を同様に、204 抗体及び 1G12 抗体を使用し、IHC 染色から得た膜特異的な H スコアを使用して調べた。膜結合型 GPC3 の出現率分布を、3 以下（1% 以下）で開始し、3 を超えて（1% を超えて）30 以下（10% 以下）、その後 30（10%）単位で膜特異的な H スコアを評価することによって評価した。図 14 A～14 C に関して論じたものと同様に、204 mAb 及び 1G12 mAb を用いた分析のために、HCC TMA では、対象（サンプル）当たり 2 つのコアを 29 のうちの 28 対象に含めた。膜結合型の H スコアの平均及び中央値を計算するため、すべての陽性対象からのコアを使用した。

【0572】

40

肝硬変患者及び HCC 患者における GPC3 の出現率

本試験では、肝硬変患者及び HCC 患者における膜結合型 GPC3 の存在を、204 抗体を使用し、1G12 抗体と比較して評価した。分析した TMA の型には、HCC 患者からの組織、隣接する正常な肝臓組織（軽度の炎症を有する）、及び肝硬変のみ／プラス炎症または肝炎を有する患者からの肝臓組織を含めた。HCC TMA では、対象当たり 2 つのコアを 29 のうちの 28 対象に含めた。204 抗体を用いて得られたデータを表 10 に示し、1G12 抗体を用いて得られたデータを表 11 に示す。示されるように、GPC3 の発現は、204 抗体または 1G12 抗体を用いてプローブした場合、肝硬変を有する患者の肝細胞の細胞膜では検出されなかった。

50

【表 1 1】

表 10: 204 mAb でプローブした TMA において評価した肝硬変患者及び HCC 患者における GPC3 の出現率					
TMA の型	評価した症例の合計数	GPC3 陽性症例の合計数	細胞質プラス膜結合型 GPC3 の出現率	膜結合型 GPC3 の陽性症例数	膜結合型 GPC3 の陽性症例の出現率
隣接する正常な肝臓組織（軽度の炎症）	26	0	0%	0	0%
肝硬変のみ/プラス炎症または肝炎を有する患者からの肝臓組織	35	2	6%	0	0%
HCC	29	22	76%	13	45%

10

20

【表 1 2】

表 11: 1G12 mAb でプローブした TMA において評価した肝硬変患者及び HCC 患者における GPC3 の出現率					
TMA の型	評価した症例の合計数	GPC3 陽性症例の合計数	細胞質プラス膜結合型 GPC3 の出現率	膜結合型 GPC3 の陽性症例数	膜結合型 GPC3 の陽性症例の出現率
隣接する正常な肝臓組織（軽度の炎症）	27	0	0%	0	0%
肝硬変のみ/プラス炎症または肝炎を有する患者からの肝臓組織	37	2	5%	0	0%
HCC	29	22	76%	12	41%

30

40

【0 5 7 3】

性能特性：2 0 4 対 1 G 1 2

2 0 4 抗体の性能特性を調べた。この分析におけるホルマリン固定パラフィン包埋（F P E）ブロックからの組織及び T M A には、正常な隣接組織（N A T）、肝硬変組織、

50

HCC、肺のSCC、及びOCCCを含めた。感度は、真陽性評価の数を全陽性評価の数で割ったもの（ $TP / (TP + FN)$ ）（TP：真陽性、FN：偽陰性）として計算した。特異性は、真陰性評価の数を全陰性評価の数で割ったもの（ $TN / (TN + FP)$ ）（TN：真陰性、FP：偽陽性）として計算した。正確さは、正しい評価の数を全評価の数で割ったもの（ $(TN + TP) / (TN + TP + FN + FP)$ ）として計算した。薬事承認検査（LDT）の検証に進むために受け入れられるように、3つすべてのパラメータ（正確さ、感度、及び特異性）は、90%を超える一致を有しなければならない。結果を表12に示す。

【表13】

10

表 12: 204 の性能特性-FFPE ブロックと TMA の組み合わせ			
	一致 (カットオフ> 1%)	一致 (カットオフ> 5%)	一致 (カットオフ> 10%)
真陽性	42	32	28
真陰性	207	217	221
偽陽性	4	9	10
偽陰性	7	2	1
正確さ	96%	96%	96%
感度	86%	94%	97%
特異性	98%	96%	96%

20

【0574】

表13は、FFPE NAT及び腫瘍ブロックのみに限定されたさらなるデータを示し、表14は、FFPE NAT、肝硬変及びTMAからの腫瘍コアに限定されたさらなるデータを示す。さらに総合すれば、これらの結果は、5%超または10%超の一時的なカットオフを使用して204に対するLDT検証に進むための許容される正確さ、感度、及び特異性を実証する。

30

【表14】

表 13: 204 の性能特性-FFPE NAT 及び腫瘍ブロック			
	一致 (カットオフ> 1%)	一致 (カットオフ> 5%)	一致 (カットオフ> 10%)
真陽性	13	11	11
真陰性	23	24	24
偽陽性	1	2	2
偽陰性	0	0	0
正確さ	97%	95%	95%
感度	100%	100%	100%
特異性	96%	92%	92%

40

50

【表 1 5】

表 14: 204 の性能特性-FFPE NAT、肝硬変及び TMA からの腫瘍コア			
	一致 (カットオフ> 1%)	一致 (カットオフ> 5%)	一致 (カットオフ> 10%)
真陽性	29	21	17
真陰性	184	193	197
偽陽性	3	7	8
偽陰性	7	2	1
正確さ	96%	96%	96%
感度	81%	91%	94%
特異性	98%	97%	96%

10

【0 5 7 5】

2 0 4 対 1 G 1 2 の 直 接 比 較

本試験では、FFPE 腫瘍ブロック及びFFPE 腫瘍コアを、204 抗体または1G12 抗体でプローブし、膜結合型のHスコアを計算した。腫瘍ブロック及び腫瘍コアの供給源を、組織供給源ごとに腫瘍ブロックの数／腫瘍コアの数、及び症例数とともに、表15 に示す。

20

【表 1 6】

表 15: 204 抗体と 1G12 抗体を直接比較するに値する腫瘍ブロック、腫瘍コア、及び症例数			
適応	腫瘍ブロック	腫瘍コア(TMA)	症例数(TMA)
胃癌, 腺癌*	6	N/A	N/A
肝臓癌, HCC**	8	57	29
肺癌, SCC	9	65	65
卵巣癌, CCC	9	30	30

30

【0 5 7 6】

この分析では、1G12 のIHC 染色を使用した胃癌のTMAは、直接比較には含めなかった。HCC サンプルに関しては、対象当たり2つのコアを、多くの症例のHCC TMAに含めた。利用可能な組織の量は、FFPE 腫瘍ブロックとコアとの間の重要な差であり、その他の点ではこれらのサンプルを同様に処理した。

40

【0 5 7 7】

図13は、FFPE 腫瘍ブロック（上、n=32 サンプル）及びTMAからのFFPE 腫瘍コア（下、n=152 サンプル）の両方に関して、1G12 抗体を使用して得た膜結合型のHスコアに対してプロットした204 抗体を使用して得た膜結合型のHスコアを示す。示されるように、204 抗体を使用して得た膜結合型のHスコアは、1G12 抗体を使用したものとよく一致する（スピアマンの相関 $r=0.99$ がFFPE 腫瘍ブロックの場合及び $r=0.86$ がTMAからのFFPE 腫瘍コアの場合）。さらに、204 抗体を使用したIHC 染色により、同じTMAでの1G12 の染色に対して、腫瘍ブロックにお

50

いて高い膜結合型のHスコアが得られ、特に腫瘍コアはさらに頻繁であった。

【0578】

異種移植腫瘍モデル由来のFFPE組織における膜結合型GPC3の発現

本試験では、204抗体を使用して、異種移植腫瘍モデルからの様々なFFPE組織におけるGPC3発現をプローブした。具体的には、この腫瘍モデルには、Hep3B、HepG2、HuH-7、及びPLC/PRF/5（これらすべてヒトHCCの不死化細胞株である）を含めた。204抗体または1G12抗体を用いてIHC染色を行い、染色の差及び異なる抗体に対する対応する膜結合型のHスコアを示した。簡潔には、腫瘍細胞をMatrigel及びPBSと1:1で混合し、その後、その細胞を、ICR-SCIDマウスの右後方脇腹から皮下移植した。図15の画像は、204mAbまたは1G12mAbを使用したGPC3のIHC染色を表す。各画像の大きい方の正方形は、各画像の小さい方の正方形を含む領域の高解像度画像を表す。さらに示すのは、対応する計算された膜結合型のHスコアであり、204mAbを使用した場合に得られた、1G12mAbと比較して同等または高い膜結合型のHスコアを示す。図16Aは、204抗体または1G12抗体を使用して得られた決定された膜結合型のHスコアのプロットを示し、図16Bは、204抗体のみに対応する中等度／高膜強度の計算%のプロットを示す。

10

【0579】

204抗体及び1G12抗体についての膜性染色と細胞質染色の比較

本試験では、Hep3B及びHepG2異種移植片からの組織を、204抗体または1G12抗体を使用してIHC分析に供し、膜性染色に対応する強度及びHスコアを特定した。さらに、細胞質染色に対応する平均強度を特定し、染色が主に細胞質か膜性かに関して評価した。204抗体を使用して得た結果を図17Aに示し、1G12抗体を使用して得た結果を図17Bに示す。示されるように、204抗体及び1G12抗体の両方で、腫瘍細胞株Hep3B及びHepG2に対して染色は主に膜性であった。しかしながら、膜結合型のHスコアは、該して204で高く、細胞質染色の平均強度は、1G12抗体と比較して、204抗体でやや低かった。

20

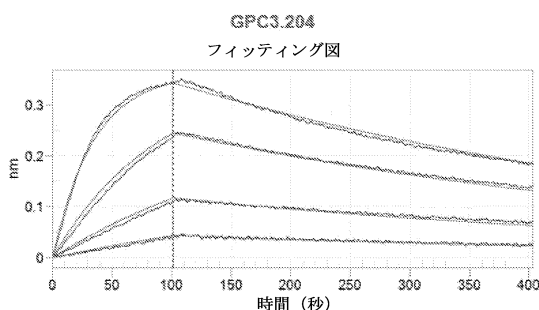
【0580】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲を限定されるものではない。実際に、本明細書に記載のものに加えて、本発明の様々な修飾が、上記の説明及び添付の図面から当業者に明らかとなるであろう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

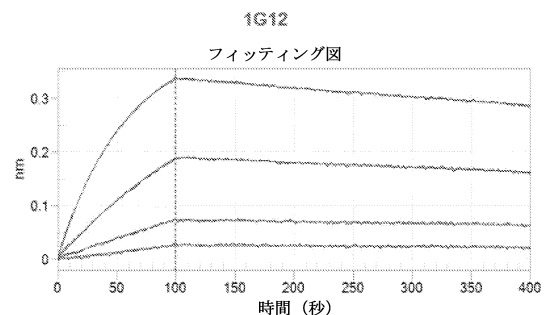
30

【図面】

【図1A】

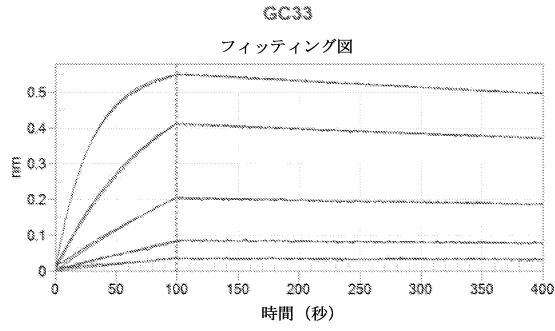


【図1B】

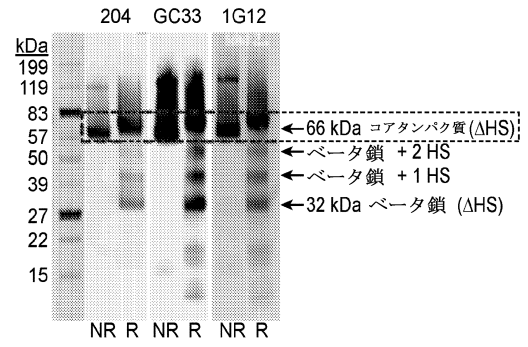


40

【図 1 C】

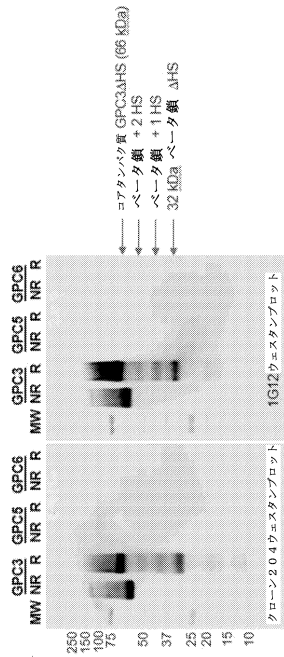


【図 2 A】

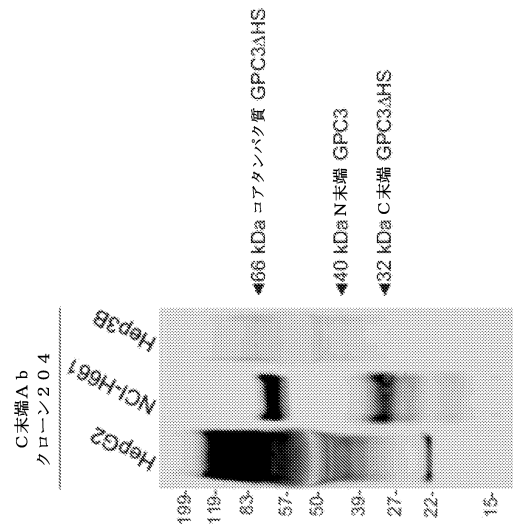


10

【図 2 B】



【図 3】



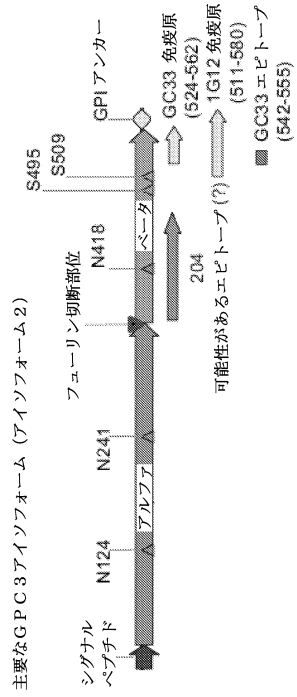
20

30

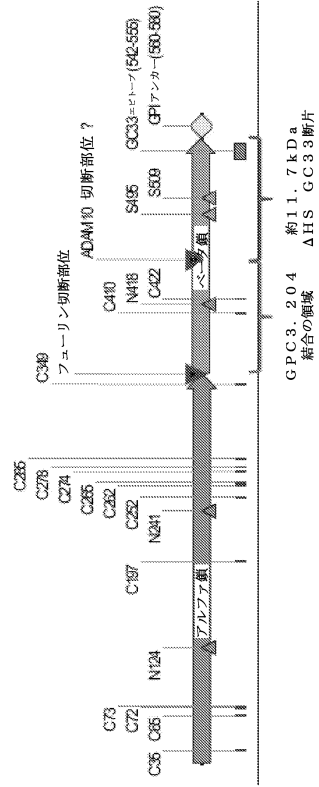
40

50

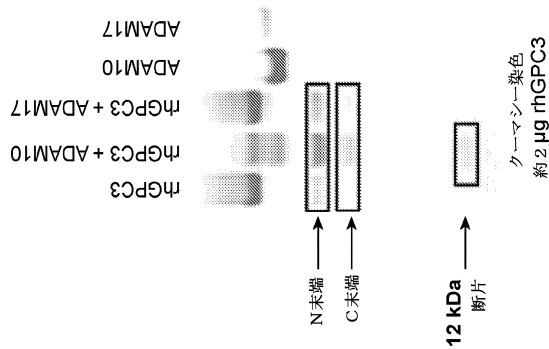
【図 4】



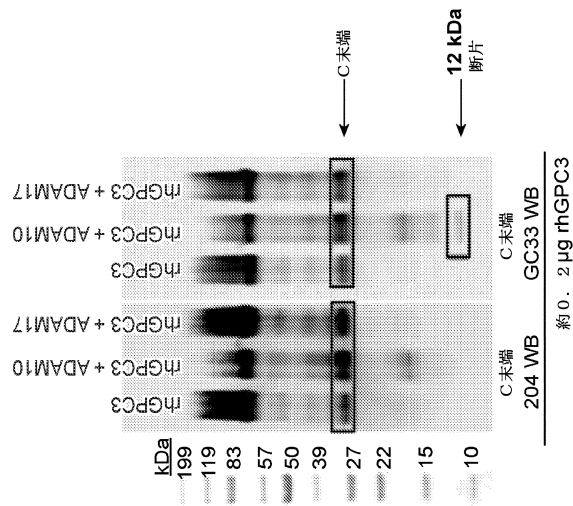
【図 5】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

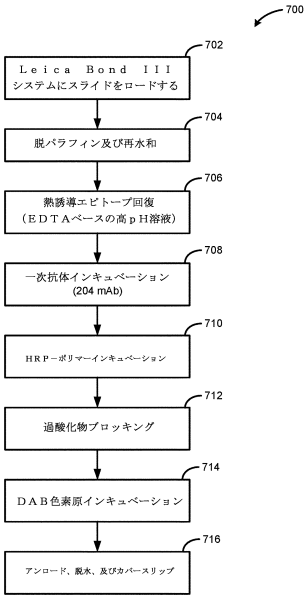
20

30

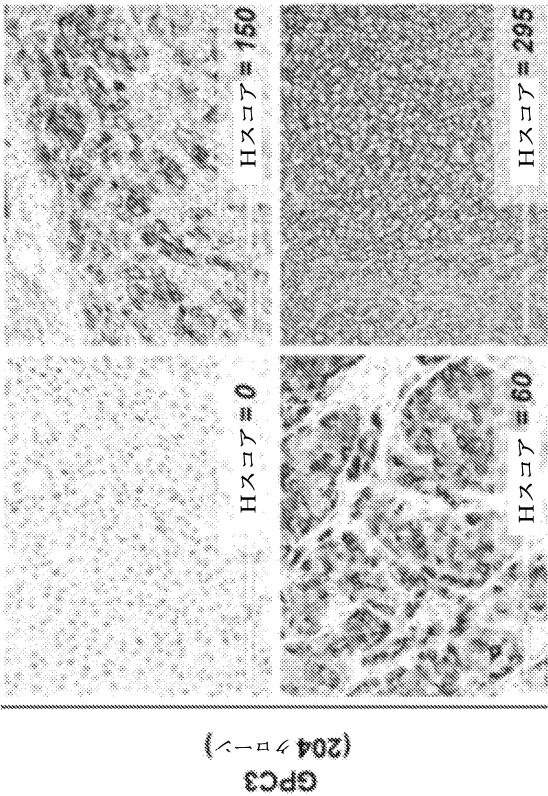
40

50

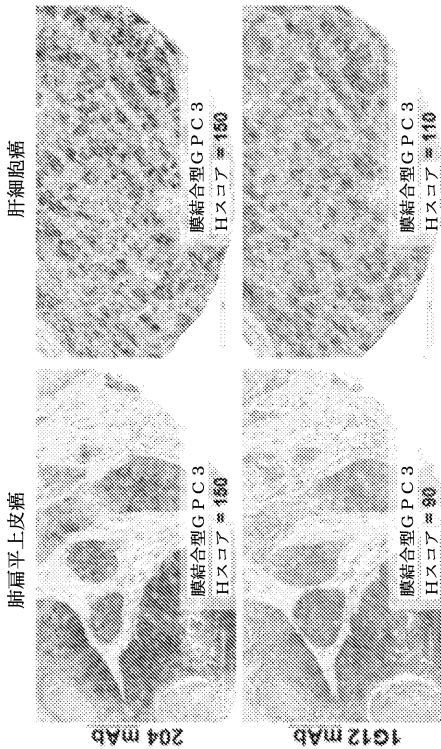
【図 7】



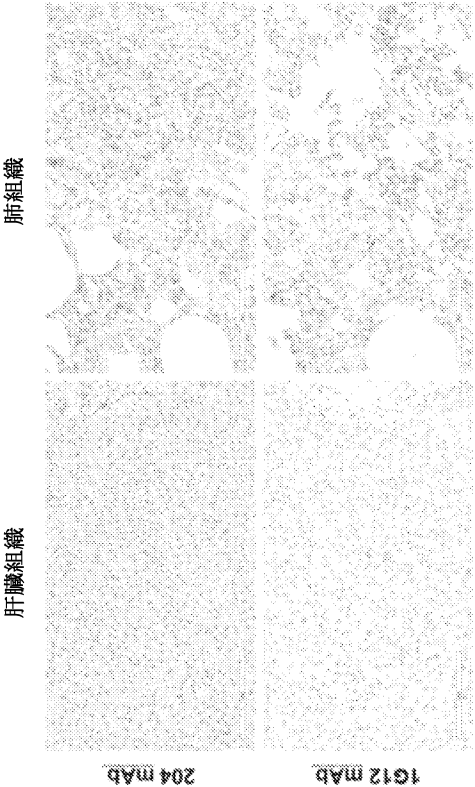
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

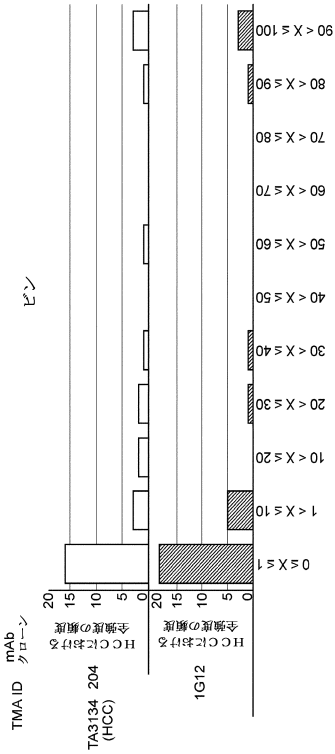
20

30

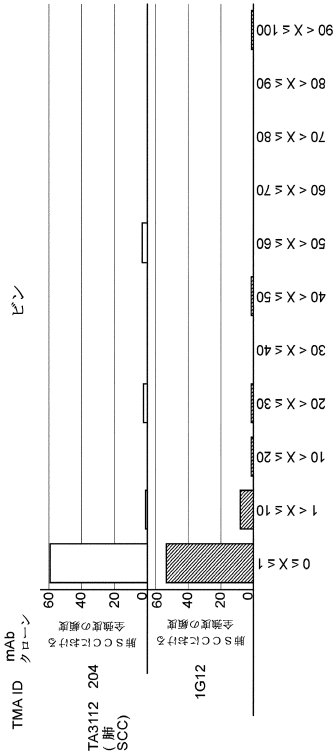
40

50

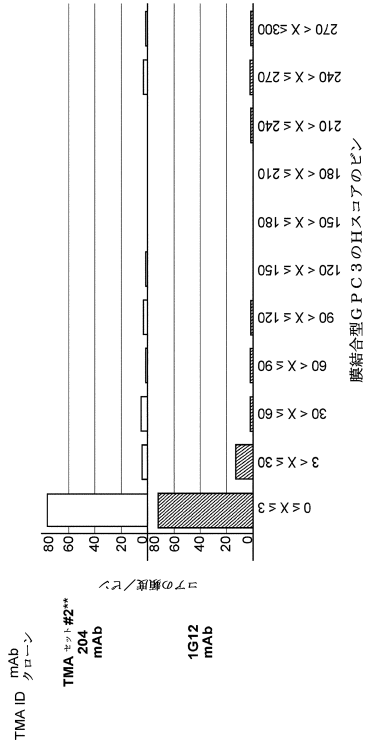
【図 1 4 B】



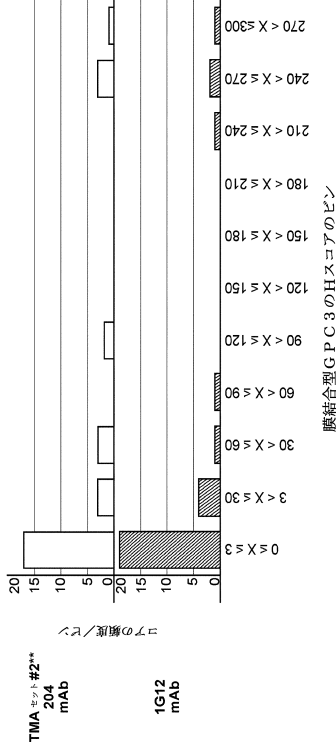
【図 1 4 C】



【図 1 4 D】



【図 1 4 E】



10

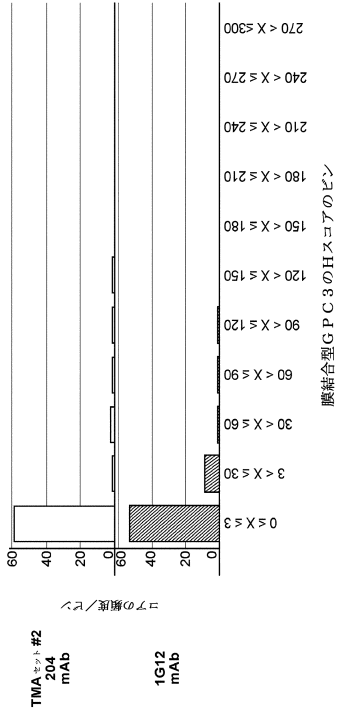
20

30

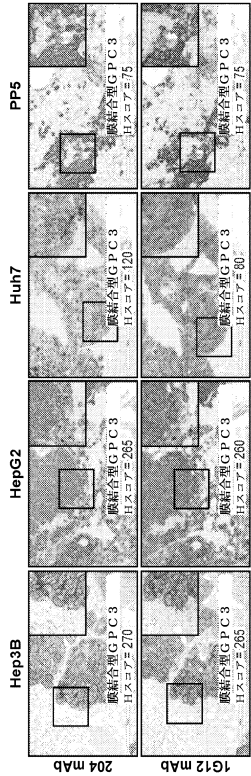
40

50

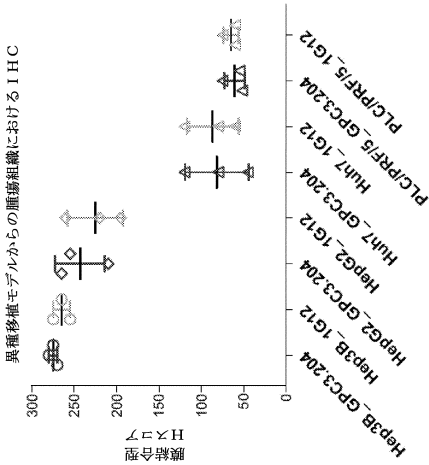
【図 1 4 F】



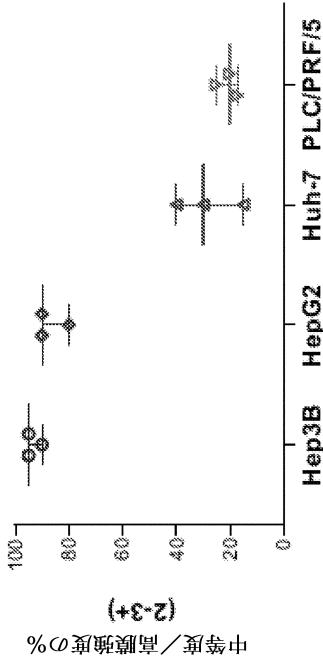
【図 1 5】



【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



10

20

30

40

50

【図 1 7 A】

Adicet GPC3 (クロン204)										
腫瘍細胞株	腫瘍細胞陽性%—膜性染色									
	細胞質染色が存在する場合：									
アイソタイプ 対照強度	中等度／ 高強度 (2/3+)				Hスコア		平均強度		染色は主に細胞 質であるか膜性 であるか？	
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+	フォーカル1+	膜性
Hep3B	0	5	5	85	90	270	270	280	フォーカル1+	膜性
Hep3B	0	0	5	10	85	95	280	275	わずかな 細胞が1+	膜性
Hep3B	0	0	5	15	80	95	275	210	1+	膜性
HepG2	0	10	10	40	80	210	255	255	1+	膜性
HepG2	0	5	5	20	70	90	265	265	フォーカル1+	膜性
HepG2	0	5	5	10	80	90	265	265	フォーカル1+	膜性

【図 1 7 B】

腫瘍細胞株	臨床的GPC3 (クロン1G12)									
	腫瘍細胞陽性%—膜性染色									
アイソタイプ 対照強度	0	1+	2+	3+	中等度／ 高強度 (2/3+)	Hスコア	平均強度	細胞質染色が存在する場合：		
	0	5	10	80	90	265	275	1+	膜性	染色は主に細胞 質であるか膜性 であるか？
Hep3B	0	5	10	80	90	265	275	1+	膜性	膜性
Hep3B	0	0	5	15	80	95	255	1+	膜性	膜性
Hep3B	0	5	20	20	90	195	220	2+	膜性	膜性
HepG2	0	5	20	45	85	260	260	2-3+	膜性	膜性
HepG2	0	5	10	5	80	85	85	2-3+	膜性	膜性

【配列表】

2024534806000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/40931

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C07K 16/28, C07K 16/30, A61K 39/00 (2022.01)

ADD, A61P 35/00 (2022.01)

CPC - INV. C07K 16/28, A61K 39/0011, A61K 39/001102, C07K 2317/56, C07K 2317/565

ADD, A61P 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019/0046859 A1 (CARSGEN THERAPEUTICS, LTD.) 14 February 2019 (14.02.2019) claim 1	1-5, 22-27
A	US 2014/0363455 A1 (STEM CENTRX, INC.) 11 December 2014 (11.12.2014) SEQ ID NO: 109	1-5, 22-27
A	US 2020/0399388 A1 (PHANES THERAPEUTICS, INC.) 24 December 2020 (24.12.2020) Especially SEQ ID NO: 40	1-5, 22-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 November 2022

Date of mailing of the international search report

FEB 02 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Karl Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/40931

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed.

b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/40931

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-8, 16-21, 28-40, 42
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Go to Extra Sheet for continuation—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-5, 22-27

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/40931

Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-5, 22-27, drawn to a monoclonal antibody that binds glypican 3 (GPC3).

Group II: Claims 9-15, drawn to a method of detecting GPC3 in a tissue preparation.

Group III: Claim 41, drawn to use of antibody-drug conjugate (ADC) for preparation of a medicament for the treatment of cancer.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a composition comprising a monoclonal antibody that binds glypican 3 (GPC3), not required by Groups II or III.

Group II has the special technical feature of a method comprising contacting a tissue preparation with a monoclonal antibody, not required by Groups I or III.

Group III has the special technical feature of use of antibody-drug conjugate (ADC) for preparation of a medicament for the treatment of cancer, not required by Groups I or II.

Common Technical Features:

Group II claim 9 depends from Group I claim 1, so both Groups I and II share claim 1.

Group III claim 41 ultimately depends from Group I claim 1, so both Groups I and III share claim 1.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is disclosed by US 2019/0046859 A1 to Carsgen Therapeutics Ltd. (hereinafter "Carsgen").

As to claim 1, Carsgen discloses an isolated monoclonal antibody that binds glypican-3 (GPC3), wherein: the heavy chain of the anti-GPC3 antibody comprises a complementary determining region (CDR) 1, CDR2 and CDR3 and the light chain of the antibody comprises a CDR1, CDR2, and CDR3 (claim 1; "An antibody that specifically recognizes glypican-3, wherein the antibody has a light chain variable region and a heavy chain variable region, and CDR1 of the light chain variable region has an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69; CDR2 of the light chain variable region has an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70; CDR3 of the light chain variable region has the amino acid sequence: SEQ ID NO: 20; CDR1 of the heavy chain variable region has an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64; CDR2 of the heavy chain variable region has an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 71; CDR3 of the heavy chain variable region has an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 72.").

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued): Claims 6-8, 16-21, 28-40, 42 are dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 1 2 N 5/078 (2010.01)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
C 0 7 K 14/705
C 0 7 K 19/00
C 1 2 N 5/078
C 1 2 N 5/0783
A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 35/17
A 6 1 K 47/68
G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N 33/577 B
G 0 1 N 33/48 M

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

ストリート 1 3 1

(72)発明者 バット, アルン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 5, シアトル, ダーランド アベニュー ノースイースト
1 1 0 5 0

(72)発明者 ターコズ, ムスタファ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 5, レッドウッド シティ, ソルト コート 8 1 3

(72)発明者 ミードウ, エリカ エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 2 0, ギルロイ, ホピー レーン 9 7 7 1

(72)発明者 シャオ, フィ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, サビル ウェイ 2 1 1

(72)発明者 ワイルド, ジャクリーン ケネディー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 7, サニーベール, マンダリン ドライブ 1 2 3 9

(72)発明者 マラー, オリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 9, ハーフ ムーン ベイ, シルバー アヴェニュー 6 6 5

(72)発明者 ペレス, エリザベス マウラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 0, マウンテン ビュー, イースト エル カミノ リ
アル 1 9 1, スペース 2 9 2

(72)発明者 フープス, マシュー イアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 6 0 6 7, マウント シャスタ, ティンバー ヒルズ ロード
1 5 1 5

(72)発明者 ニシモト, ケヴィン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, バレー ビュー コート 9 2

F ターム (参考)

2G045 AA24 AA26 CB02 DA36 FA16 FB03

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C076 AA95 CC41 EE41 EE59

4C085 AA14 BB31 CC23 DD61 EE01 GG01

4C087 AA01 AA02 BB63 NA13 ZB26

F ターム (参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 BA72 CA40 DA50 DA76 EA20 EA50
FA74