(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 11 月 12 日(12.11.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/170480 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/002352

(22) 国際出願日: 2015 年 5 月 8 日(08.05.2015)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
61/990,238 2014 年 5 月 8 日(08.05.2014) US

(71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間五丁目５番１号 Tokyo (JP). エフ．ホフマン－ラ ロシュ アーゲー(F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) [CH/CH]; CH-4070 バーゼルグレンツァッハーシュトラーセ１２４番 Basel (CH).

(72) 発明者: 大友 俊彦(OHTOMO, Toshihiko); 〒1038324 東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 田中 孝欣(TANAKA, Takayoshi); 〒1038324 東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 杉谷 康雄(SUGITANI, Yasuo); 〒1038324 東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). プッチ オスカル(PUIG, Oscar); 07302 ニュージャージー州 ジャージーシティ１２６ダッドリーストリート アパートメント４１４ New Jersey (US).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則 4.17(ii))

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: GPC3-TARGETED THERAPEUTIC AGENT FOR ADMINISTRATION TO PATIENTS FOR WHOM GPC3-TARGETED THERAPEUTIC AGENT THERAPY IS EFFECTIVE

(54) 発明の名称 : ＧＰＣ３標的治療剤療法が有効である患者に投与されるＧＰＣ３標的治療剤

(57) **Abstract**: Disclosed is a method for determining the efficacy of a GPC3-targeted therapeutic agent therapy for a patient or against a cancer in the patient, prior to receiving GPC3-targeted therapeutic agent therapy, or for determining whether to continue GPC3-targeted therapeutic agent therapy for a patient. The method includes: measuring the number of immunocytes or the quantity of molecules expressed on said immunocytes in a biological sample isolated from a patient prior to receiving GPC3-targeted therapeutic agent therapy and/or a patient having received GPC3-targeted therapeutic agent therapy; and determining the GPC3-targeted therapeutic agent therapy to be effective or determining that the GPC3-targeted therapeutic agent therapy is to be continued when the number or immunocytes or the quantity of molecules expressed is a predetermined value. Also disclosed is a GPC3-targeted therapeutic agent or drug formulation to be administrated to a patient for whom GPC3-targeted therapeutic agent therapy has been determined effective, or for whom it has been determined to continue GPC3-targeted therapeutic agent therapy.

(57) 要約: GPC3 標的治療剤療法を受ける前の患者又は患者における癌に対する GPC3 標的治療剤療法の有効性を決定する、または、患者に対する GPC3 標的治療剤療法の継続を決定する方法であって、GPC3 標的治療剤療法を受ける前の患者及び/又は GPC3 標的治療剤療法を受けた患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量を測定することを含み、当該細胞数又は発現量が所定の値である場合に当該 GPC3 標的治療剤療法が有効であると決定する、または、当該 GPC3 標的治療剤療法の継続を決定する方法が開示される。また、GPC3 標的治療剤療法が有効であると決定された、または GPC3 標的治療剤療法を継続することが決定された患者に投与するための GPC3 標的治療剤もしくは製剤も開示される。

WO 2015/170480 A1

明　細　書

発明の名称 ：

ＧＰＣ３標的治療剤療法が有効である患者に投与されるＧＰＣ３標的治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法の有効性を決定する、または、患者に対するGPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法、GPC3標的治療剤療法が有効であると決定された、またはGPC3標的治療剤療法を継続することが決定された患者にさらに投与するためのGPC3標的治療剤もしくは製剤を提供する。

背景技術

[0002] 肝細胞癌に起因する死亡は通年で60万に相当し、世界の癌による死亡のうちでは5番目に位置するといわれている（非特許文献１）。肝細胞癌の大半はその疾患であるとの診断後1年以内に死亡する。不幸にも、肝細胞癌は治癒可能な療法があまり奏功しない後期ステージで診断される例が頻繁である。こうした患者に対しての化学療法、化学塞栓術、焼灼や陽子ビーム療法を含む医療処置の効果は依然として不十分である。多くの患者が疾患の再発を示し、これは血管浸潤および多部位肝内転移を伴って進行ステージに急速に進行して、その5年生存率は7％に過ぎない（非特許文献２）。局部癌の切除術が可能な肝細胞癌の患者の予後は比較的よいが、その5年生存率は15％から39％に留まる（非特許文献３）。当該技術分野においては、このような悪性疾患である肝細胞癌に対する新規療法が求められている。

[0003] 肝細胞癌は日本における原発性肝癌の90％以上の原因を占めるといわれている。こうした肝細胞癌に対する内科的治療方法としては、例えば、化学療法剤を用いて、腫瘍への栄養供給経路となる肝動脈に油性造影剤（リピオドール）と抗癌剤、塞栓物質（ゼルフォーム）を混和したものを注入し、栄養動脈を閉塞することにより、選択的に肝細胞癌を壊死に導く治療法であるTAE

（肝動脈塞栓療法）のほか、経皮的エタノール注入法、経皮的マイクロ波凝固療法、ラジオ波焼灼療法等の侵襲を伴う手法が用いられている。また、化学療法剤として、5-FU（フルオロウラシル）、UFT（ウラシルとテガフール）、MMC（マイトマイシンC）、DHAD（ミトキサントロン）、ADR（アドリアマイシン）、EPI（エピルビシン）、CDDP（シスプラチン）等が単独で、あるいはIFN（インターフェロン）との併用療法として、全身化学療法の臨床試験が行われた（非特許文献４）。

[0004] こうした中、Raf/MEK/ERKシグナル伝達をRafキナーゼの段階で阻害することによって癌細胞の増殖をブロックし、かつ、VEGFR-2、VEGFR-3およびPDGFR-βチロシンキナーゼを標的とすることによって抗血管形成効果を発揮し、上記の化学療法剤に比べて有利な効果を示した経口活性型のソラフェニブ（Nexavar、BAY43-9006）が承認されている。ソラフェニブの有効性については，進行性肝細胞癌を対象とした2つの第III相多施設共同プラセボ対照比較試験（SHARP試験及びアジア・太平洋地域において実施された試験）において検討が行われている。これらいずれの試験においても生存期間の延長が認められ，共にHRは0.68であった。SHARP試験では生存期間は7.9カ月から10.7カ月に延長された。一方，アジアの試験では，生存期間は4.2カ月から6.5カ月に延長された。しかし，客観的奏効率は低く，画像上の腫瘍進行までの期間は延長されたものの（欧米の試験では2.8カ月から5.5カ月，アジアの試験では1.4カ月から2.8カ月），症状悪化までの期間の延長は認められなかった。アジア人コホートでは生存延長期間が短かったが，これはアジア地域では欧米と比較して疾患経過のやや遅い時期に治療が開始されたためであると考えられる（非特許文献５、６）。

[0005] 一般的に、肝癌の進行に伴い肝機能障害を伴う、食欲不振、体重減少、全身倦怠感、右悸肋部腫瘤触知、右悸肋部痛、腹部膨満感、発熱、黄疸等の肝癌特有の症状が観察される。しかしながらソラフェニブ等の化学療法剤は、下痢または便秘、貧血、（致死的な重篤度の）感染や敗血症を引き起こすほどの免疫系の抑制、出血、心毒性、肝毒性、腎毒性、食欲不振、体重減少等

の化学療法剤に固有の副作用も併発するという、克服すべき課題を有している。

[0006] 一般に、肝癌は初期には特別な初期症状は観察されないが、肝癌の進行に伴い肝機能障害を伴う、食欲不振、体重減少、全身倦怠感、右悸肋部腫瘤触知、右悸肋部痛、腹部膨満感、発熱、黄疸等の肝癌特有の症状が観察される。こうした症状は上記の化学療法剤の使用によって増幅されることが臨床上観察される。たとえば、肝癌細胞が検出される患者の食欲不振、および、それに伴うまたはそれとは独立して生じる体重減少等の症状は、当該患者に対する化学療法剤の投与によって、非投与に比較してより増幅されることがある。こうした症状が表れる場合には当該化学療法剤の使用を断念せざるを得なくなる場合もあり、上記の症状の増幅は化学療法剤による治療を妨げる要因となる。したがって、治療効果の向上や治療を受ける患者のQOLの改善等の観点からより優れた治療法の確立が求められていた。

[0007] グリピカン３（GPC3）は肝癌で頻繁に高発現していることから、GPC3は、GPC3の肝癌における機能の同定、肝癌の治療の標的もしくは肝癌の診断の標的として有用であろうと考えられている。

[0008] 前記の情況の下で、GPC3を肝癌の治療の標的とする治療剤の開発が進められている。GPC3を発現する細胞に対して抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下「ADCC」と述べられる。）活性および/または補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity、以下「CDC」と述べられる）活性を奏する抗GPC3抗体を有効成分として含む肝癌治療剤が開発された（特許文献１）。また、ADCC活性およびCDC活性を有するヒト化抗GPC3抗体を有効成分として含むGPC3標的治療剤が開発された（特許文献２）。さらに、ADCC活性が増強されたヒト化抗GPC3抗体（特許文献３、４）に加え、ADCC活性およびCDC活性を有し、血漿中動態が改善されたGPC3抗体（特許文献５）を含むGPC3標的治療剤が開発された。また、これらの抗GPC3抗体とソラフェニブ等の化学療法剤との併用療法によってソラフェニブ等の化学療法剤による単独療法がもたらす副作用等が減弱されるとともに、両薬剤

による相乗的効果を示すことも見出されており（特許文献６）、治療効果の向上や治療を受ける患者のQOLの改善等の観点から、GPC3標的治療剤を中核とするより優れた肝癌の治療法が確立されつつある。

[0009] 一方で、GPC3を肝癌の診断の標的とする診断方法の開発もまた進められている。GPC3は細胞表面への発現途中もしくは発現後、その特定の部位においてコンバルターゼ、フォスフォリパーゼD、Notumまたは未同定のメカニズムによってプロセッシングを受けることが知られている（非特許文献７、８）。こうした現象を利用することによって、患者の血漿中に存在する、プロセッシングを受けて血漿中に分泌された可溶型GPC3のエピトープに結合する抗体を含む肝癌の診断薬または診断方法が開発されている（特許文献７）。また、患者から単離された組織標本等に存在する、プロセッシングを受けた後に細胞表面になお存在する係留型GPC3のエピトープに結合する抗体を含む肝癌の診断薬または診断方法が開発されている（特許文献８）。しかしながら、以上の診断薬または診断方法は、被験患者における肝癌の存在を検出する方法であって、GPC3標的治療剤療法を受けた患者における、当該療法の有効性を決定する方法、または、当該患者に対するGPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法については知られていなかった。

[0010] 本明細書において引用される参考文献は以下のとおりである。これらの文献に記載される内容はすべて本明細書に参照として取り込まれる。なお、これらの文献のいずれかが、本明細書に対する先行技術であると認めるものではない。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：WO2003/000883

特許文献2：WO2006/006693

特許文献3：WO2006/046751

特許文献4：WO2007/047291

特許文献5：WO2009/041062

特許文献6：WO2009/122667

特許文献7：WO2004/038420

特許文献8：WO2009/116659

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Llovet JM, Burroughs A, Bruix J; Lancet (2003), 362, 1907-17

非特許文献2：Bosch FX, Ribes J, Cleries R; Gastroenterology (2004), 127, S5-16

非特許文献3：Takenaka K, Kawahara N, Yamamoto K, Kajiyama K, Maeda T, Itasaka H, Shirabe K, Nishizaki T, Yanaga K, Sugimachi K; Arch Surg (1996), 131, 71-6

非特許文献4：Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, Koh J, Mo FK, Yu SC, Chan AT, Hui P, Ma B, Lam KC, Ho WM, Wong HT, Tang A, Johnson PJ; J Natl Cancer Inst (2005), 97, 1532-8

非特許文献5：Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. New Eng. J. Med. (2008) 359, 378-90

非特許文献6：Cheng AL, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorefanib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomized, double-blind, placebo- controlled trial. Lancet Oncol. (2009) 10, 25-34

非特許文献7：De Cat B, Muyldermans S-Y, Coomans C, Degeest G, Vanderschueren B, et al. Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. J. Cell. Biol. (2003) 163, 625-635

非特許文献8：Traister A, Shi W and Filmus J. Mammalian Notum induces the release of glypicans and other GPI-anchored proteins from the cell surface. Biochem. J. (2008) 410, 503-511

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明はこのような情況に鑑みて為されたものであり、その目的は、GPC3標的治療剤療法を受けた患者における、当該療法の有効性を決定する方法、または、当該患者に対するGPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法を提供することにある。また、併せて、GPC3標的治療剤療法が有効であると決定された、またはGPC3標的治療剤療法を継続することが決定された患者にさらに投与するためのGPC3標的治療剤もしくは製剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは前記のような情況下で鋭意研究を進めたところ、GPC3標的治療剤療法を受けた患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量を測定し、当該細胞数又は発現量が所定の値である場合、またはGPC3標的治療剤療法を受けた後に当該細胞数又は発現量が所定の値である場合、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定する、または、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法を創作した。また、GPC3標的治療剤療法が有効であると決定された、またはGPC3標的治療剤療法を継続することが決定された患者に投与するためのGPC3標的治療剤もしくは製剤を創作した。

[0015] より具体的には以下の発明が提供される。

〔１〕患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法の有効性を決定する、または、患者に対するGPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法であって、GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者及び/又はGPC3標的治療剤療法を受けた患者から単離された生物学的試料中の、免疫細胞数又は当該細胞上に発現している分子の発現量を測定することを含み、当該免疫細胞数又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に当該GPC3標的治療剤療法

が有効であると決定する、または、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法、

〔２〕前記生物学的試料が、患者から単離された末梢血である、〔１〕に記載の方法、

〔３〕前記免疫細胞が、白血球、単球、好中球及びリンパ球から選ばれる少なくとも１つの細胞である、〔１〕又は〔２〕に記載の方法、

〔４〕前記リンパ球が、CD45+リンパ球、CD3+T細胞、CD4+T細胞、及び、CD8+T細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、〔３〕に記載の方法、

〔５〕前記リンパ球が、CD16+NK細胞、NKp46+NK細胞、、及び、CD56-CD16+NK細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、〔３〕に記載の方法、

〔６〕前記免疫細胞上に発現している分子が、CD16又はCD107aである、〔１〕又は〔２〕に記載の方法、

〔７〕前記患者が、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する患者である、〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の方法、

〔８〕前記癌が肝癌である〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の方法、

〔９〕前記GPC3標的治療剤が、癌患者の血中トラフ値で200μg/ml以上となるように投与される、〔１〕から〔８〕のいずれかに記載の方法、

〔１０〕前記GPC3標的治療剤が、抗GPC3抗体を有効成分として含む治療剤である、〔１〕から〔９〕のいずれかに記載の方法、

〔１１〕前記抗GPC3抗体が、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗体である、〔１０〕に記載の方法、

〔１２〕前記抗GPC3抗体が、以下の（１）から（５）のいずれか；

（１）配列番号：４、配列番号：５、および配列番号：６でそれぞれ表され

る重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：７、配列番号：８、および配列番号：９でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（２）配列番号：１２、配列番号：１３、および配列番号：１４でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：１５、配列番号：１６、および配列番号：１７でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（３）配列番号：２０、配列番号：２１、および配列番号：２２でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：２３、配列番号：２４、および配列番号：２５でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（４）配列番号：２８、配列番号：２９、および配列番号：３０でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３１、配列番号：３２、および配列番号：３３でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；もしくは

（５）配列番号：３６、配列番号：３７、および配列番号：３８でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３９、配列番号：４０、および配列番号：４１でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体である〔１０〕または〔１１〕に記載の方法、

〔１３〕前記抗GPC3抗体が、以下のいずれか；

（１）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５１で表される軽鎖可変領域；

（２）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖

可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６１、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：６５、および配列番号：６６で表される軽鎖可変領域の群から選択される軽鎖可変領域；

（３）配列番号：６７で表される重鎖可変領域、および配列番号：６８で表される軽鎖可変領域；

（４）配列番号：６９で表される重鎖可変領域、および配列番号：７０で表される軽鎖可変領域；

（５）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７２で表される軽鎖可変領域；もしくは

（６）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７３で表される軽鎖可変領域；

を含む抗体である〔１０〕から〔１２〕のいずれかに記載の方法、

〔１４〕前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体に細胞傷害性物質が連結された抗体を含む、〔１０〕に記載の方法、

〔１５〕免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が所定の値を有する癌患者に投与するためのGPC3標的治療剤、

〔１６〕免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が、癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量である、〔１５〕に記載のGPC3標的治療剤、

〔１７〕前記生物学的試料が、癌患者から単離された末梢血である、〔１６〕に記載の治療剤、

〔１８〕前記免疫細胞が、白血球、単球、好中球及びリンパ球から選ばれる少なくとも１つの細胞である、〔１５〕から〔１７〕のいずれかに記載の治療剤、

〔１９〕前記リンパ球が、CD45+リンパ球、CD3+T細胞、CD4+T細胞、及び、CD

8+T細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、〔１８〕に記載の治療剤、

〔２０〕前記リンパ球が、CD16+NK細胞、NKp46+NK細胞、、及び、CD56-CD16+NK細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、〔１８〕に記載の治療剤、

〔２１〕前記免疫細胞上に発現している分子が、CD16又はCD107aである、〔１５〕から〔１７〕のいずれかに記載の治療剤、

〔２２〕前記患者が、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する患者である、〔１５〕から〔２１〕のいずれかに記載の治療剤、

〔２３〕前記癌患者が肝癌患者である〔１５〕から〔２２〕のいずれかに記載の治療剤、

〔２４〕前記GPC3標的治療剤が、癌患者の血中トラフ値で200μg/ml以上となるように投与される、〔１５〕から〔２３〕のいずれかに記載の治療剤、

〔２５〕前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体を有効成分として含む治療剤である、〔１５〕から〔２４〕のいずれかに記載の治療剤、

〔２６〕前記抗GPC3抗体が、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗体である、〔２５〕に記載の治療剤、

〔２７〕前記抗GPC3抗体が、以下の（１）から（５）のいずれか；

（１）配列番号：４、配列番号：５、および配列番号：６でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：７、配列番号：８、および配列番号：９でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（２）配列番号：１２、配列番号：１３、および配列番号：１４でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：１５、配列番号：１６、および配列番号：１７でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR

2および軽鎖CDR3；

（３）配列番号：２０、配列番号：２１、および配列番号：２２でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：２３、配列番号：２４、および配列番号：２５でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（４）配列番号：２８、配列番号：２９、および配列番号：３０でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３１、配列番号：３２、および配列番号：３３でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；もしくは

（５）配列番号：３６、配列番号：３７、および配列番号：３８でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３９、配列番号：４０、および配列番号：４１でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体である〔２５〕または〔２６〕に記載の治療剤、

〔２８〕前記抗GPC3抗体が、以下のいずれか；

（１）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５１で表される軽鎖可変領域；

（２）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６１、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：６５、および配列番号：６６で表される軽鎖可変領域の群から選択される軽鎖可変領域；

（３）配列番号：６７で表される重鎖可変領域、および配列番号：６８で表される軽鎖可変領域；

（４）配列番号：６９で表される重鎖可変領域、および配列番号：７０で表される軽鎖可変領域；

（５）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７２で表される軽鎖可変領域；もしくは

（６）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７３で表される軽鎖可変領域；

を含む抗体である〔２５〕から〔２７〕のいずれかに記載の治療剤、

〔２９〕前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体に細胞傷害性物質が結合された抗体である、〔２５〕に記載の治療剤、

〔３０〕GPC3標的治療剤療法を受ける前の癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者に投与する旨の指示書を含むGPC3標的治療のための製剤、

〔３１〕GPC3標的治療剤療法を受けた癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者にさらに投与する旨の指示書を含むGPC3標的治療のための製剤、

〔３２〕前記生物学的試料が、癌患者から単離された末梢血である、〔３０〕又は〔３１〕に記載の製剤、

〔３３〕前記免疫細胞が、白血球、単球、好中球及びリンパ球から選ばれる少なくとも１つの細胞である、〔３０〕から〔３２〕のいずれかに記載の製剤、

〔３４〕前記リンパ球が、CD45+リンパ球、CD3+T細胞、CD4+T細胞、及び、CD8+T細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、〔３３〕に記載の製剤、

〔３５〕前記リンパ球が、CD16+NK細胞、NKp46+NK細胞、及び、CD56-CD16+NK細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、〔３３〕に記載の製剤、

〔３６〕前記免疫細胞上に発現している分子が、CD16又はCD107aである、〔３０〕から〔３２〕のいずれかに記載の製剤、

〔３７〕前記患者が、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する患者である、〔３０〕から〔３６〕のいずれかに記載の製剤、

〔３８〕前記癌患者が肝癌患者である〔３０〕から〔３７〕のいずれかに記載の製剤、

〔３９〕前記GPC3標的治療剤が、癌患者の血中トラフ値で200μg/ml以上となるように投与される、〔３０〕から〔３８〕のいずれかに記載の製剤、

〔４０〕前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体を有効成分として含む治療剤である、〔３０〕から〔３９〕のいずれかに記載の製剤、

〔４１〕前記抗GPC3抗体が、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗体である、〔４０〕に記載の製剤、

〔４２〕前記抗GPC3抗体が、以下の（１）から（５）のいずれか；

（１）配列番号：４、配列番号：５、および配列番号：６でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：７、配列番号：８、および配列番号：９でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（２）配列番号：１２、配列番号：１３、および配列番号：１４でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：１５、配列番号：１６、および配列番号：１７でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（３）配列番号：２０、配列番号：２１、および配列番号：２２でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：２３、配列番号：２４、および配列番号：２５でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（４）配列番号：２８、配列番号：２９、および配列番号：３０でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３１、配列番号：３２、および配列番号：３３でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；もしくは

（５）配列番号：３６、配列番号：３７、および配列番号：３８でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３９、配列番号：４０、および配列番号：４１でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体である〔４０〕または〔４１〕に記載の製剤、

〔４３〕前記抗GPC3抗体が、以下のいずれか；

（１）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５１で表される軽鎖可変領域；

（２）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６１、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：６５、および配列番号：６６で表される軽鎖可変領域の群から選択される軽鎖可変領域；

（３）配列番号：６７で表される重鎖可変領域、および配列番号：６８で表される軽鎖可変領域；

（４）配列番号：６９で表される重鎖可変領域、および配列番号：７０で表される軽鎖可変領域；

（５）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７２で表

される軽鎖可変領域；もしくは

（６）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７３で表される軽鎖可変領域；

を含む抗体である〔４０〕から〔４２〕のいずれかに記載の製剤、

〔４４〕前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体に細胞傷害性物質が結合された抗体である、〔４０〕に記載の製剤、

〔４５〕GPC3標的治療剤を〔１〕から〔１４〕のいずれかに記載の方法によって決定される患者に投与することによる、癌の治療方法、

を提供する。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、簡便かつ的確に、GPC3標的治療剤療法が有効かどうか、あるいはGPC3標的治療剤療法を継続すべきかどうかを決定することができる。これにより、GPC3標的治療剤療法の効果の向上と、治療を受ける患者のQOL改善が可能となり、より優れた癌の治療が実現される。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]GPC3標的治療剤療法もしくはプラセボを受けた患者の無憎悪生存期間もしくは全生存期間を示した図である。破線はGC33投与群、実線はプラセボ群、それぞれの無増悪生存期間、もしくは全生存期間を示す。

[図2]GPC3標的治療剤療法もしくはプラセボを受けた患者の無憎悪生存期間もしくは全生存期間を示した図である。実線はプラセボ群、点線はGC33高暴露群、破線はGC33低暴露群それぞれの無憎悪生存期間、もしくは全生存期間を示す。

[図3]GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者から採取された血液中の好中球が中央値（3,607個/μL）より少ない群、もしくは多い群における当該患者の無憎悪生存期間との相関関係を示した図である。破線はGC33投与群、実線はプラセボ群、それぞれの無増悪生存期間を示す。好中球数が少ない群においては、プラセボ群に対し、GC33投与群のハザード比は1.229（p=0.369）であったのに対し、好中球が多い群ではハザード比が0.607（p=0.030)であった。

[図4]GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者から採取された血液中のCD4陽性T細胞が中央値（490個/μL）より少ない群、もしくは多い群における当該患者の無憎悪生存期間との相関関係を示した図である。破線はGC33投与群、実線はプラセボ群、それぞれの無増悪生存期間を示す。CD4陽性T細胞数が少ない群においては、プラセボ群に対し、GC33投与群のハザード比は1.273（p=0.307）であったのに対し、多い群ではハザード比が0.635（p=0.05)であった。

[図5]GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者から採取された血液中のCD56陰性CD16陽性NK細胞が中央値（6.3個/μL）より少ない群、もしくは多い群における当該患者の無憎悪生存期間との相関関係を示した図である。破線はGC33投与群、実線はプラセボ群、それぞれの無増悪生存期間を示す。CD56陰性CD16陽性NK細胞が少ない群においては、プラセボ群に対し、GC33投与群のハザード比は1.259（p=0.344）であったのに対し、多い群ではハザード比が0.571(p=0.022)であった。

[図6]GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者から採取された血液中のNK細胞上のCD16発現量（MESF）が中央値（372,254 mesf）より少ない群、もしくは多い群における当該患者の無憎悪生存期間との相関関係を示した図である。破線はGC33投与群、実線はプラセボ群、それぞれの無増悪生存期間を示す。CD16発現が少ない群においては、プラセボ群に対し、GC33投与群のハザード比は1.130（p=0.612）であったのに対し、多い群ではハザード比が0.668（p=0.101)であった。

[図7]GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者から採取された血液細胞を用いたADCC活性値を細胞表面上のCD16発現量の変化により評価した際のCD16発現変化量が中央値（-64.33%）より少ない群（ADCC高活性群）、もしくは多い群（ADCC低活性群）における当該患者の無憎悪生存期間との相関関係を示した図である。実線はプラセボ群、点線はGC33高暴露群、破線はGC33低暴露群、それぞれの無増悪生存期間を示す。

[図8]GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者から採取された血液細胞を用いたADCC活性値を細胞表面上のCD107a発現量の変化により評価した際のCD107a発

現変化量が中央値（34.15%）より多い群（ADCC高活性群）、もしくは少ない群（ADCC低活性群）における当該患者の無憎悪生存期間との相関関係を示した図である。実線はプラセボ群、点線はGC33高暴露群、破線はGC33低暴露群、それぞれの無増悪生存期間を示す。

発明を実施するための形態

[0018] 定義

本明細書において別段の定義がない限り、本発明に関連して用いられる化学的用語および技術的用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有するものとする。

[0019] 不定冠詞

「一つの（a）」および「一つの（an）」という不定冠詞は、本発明において、一つのまたは二つ以上の（すなわち少なくとも一つの）その不定冠詞の文法上の対象をいう。例えば「一つの（a）要素」は、一つの要素または二つ以上の要素を意味する。

[0020] アミノ酸

本明細書において、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸は1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記されている。

[0021] アミノ酸の改変

抗原結合分子のアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357）。例えば、終止コドンの１つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸

が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。

[0022] 本明細書において、アミノ酸の改変部位を表す際に用いられる「および/または」の用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わされたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「43位、52位、および/または105位のアミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変のバリエーションが含まれる；

(a) 43位、(b) 52位、(c) 105位、(d) 43位および52位、(e) 43位および105位、(f) 52位および105位、(g) 43位および52位および105位。

[0023] EUナンバリングおよびKabatナンバリング

本発明で使用されている方法によると、抗体のCDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置はKabatにしたがって規定される（Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987年および1991年）。本明細書において、抗原結合分子が抗体または抗原結合断片である場合、可変領域のアミノ酸はKabatナンバリングにしたがい、定常領域のアミノ酸はKabatのアミノ酸位置に準じたEUナンバリングにしたがって表される。

[0024] 生物学的試料

本発明において「生物学的試料」という用語は、対象から単離される組織または流体の試料をいう。そのような試料の非限定な一態様として、例えば血漿、血清、髄液、リンパ液、皮膚、気道、腸管、および尿生殖路の外部切片、涙、唾液、痰、乳、全血またはあらゆる血液画分、血液誘導体、血球、腫瘍、神経組織、器官またはあらゆるタイプの組織、洗浄により得られるあらゆる試料（例えば気管支系のもの）、ならびにインビトロでの細胞培養物の構成成分の試料が含まれる。

[0025] 免疫細胞数又は免疫細胞上に発現している分子の発現量は、患者から単離される生物学的試料において測定することができる。例えば、生物学的試料として血液を用いる場合は、末梢血が好ましく、単離された末梢血中の免疫

細胞数又は免疫細胞上に発現している分子の発現量が測定され得る。非限定な一態様として、患者から単離された末梢血中の免疫細胞数は、例えば、ギムザ染色による白血球分画や、自動血球計数測定機などを用いて測定され得る。また、非限定な一態様として、患者から単離された末梢血中の免疫細胞上に発現している分子の発現量は、例えば、特異的な抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。

[0026] 「単離された」とは、その天然の状態から「人為的」に変化されたこと、すなわち、天然で生じた場合、その本来の環境から変化および/または取り出されたことをいう。例えば、生物中に存在する細胞、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然の状態で一緒に存在する材料から分離された同じ細胞、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていることを本発明では意味する。さらに、形質転換、遺伝学的操作またはいずれの他の組換え方法によって生物に導入されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、生物（生存していても非生存でもよい）内にまだ存在している場合でも、単離されている。

[0027] 免疫細胞

本発明において「免疫細胞」とは、白血球等の生体内の免疫反応に関与する細胞を意味し、具体的には、例えば、顆粒球(好中球、好塩基球、好酸球)、単球(マクロファージ)、リンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞)、樹状細胞等が挙げられる。

[0028] 免疫細胞数の測定方法

本発明において、対象となる患者の末梢血中の免疫細胞数を測定する方法は、特に限定されない。例えば、対象となる患者から生物学的試料として血液を採取し、採取した血液を試料として自動血球計数機によって測定することができる。また、例えば血球計算版を用い、赤血球や白血球を計数し、かつギムザ染色により血液細胞を染色した後、染色のされ方や形状の違いにより好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球に区分でき、その割合からそれぞれの細胞数を算出することができる。ここで採取される生物学的試料は

、患者由来の免疫細胞を測定することのできる試料であれば特に限定されず、例えば、末梢血が挙げられる。具体的には、例えば実施例に記載の方法によって測定され得る。

[0029] 免疫細胞上に発現している分子の発現量の測定方法

本発明において、対象となる患者の免疫細胞上に発現している分子の発現量を測定する方法は、特に限定されない。例えば、対象となる患者から生物学的試料として血液を採取し、細胞に発現している分子に対する特異的な抗体と反応させ、フローサイトメトリー等を用い測定することができる。さらに、蛍光標識されたキャリブレーションビーズを用い可溶性蛍光色素分子等量（Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome：MESF）を設定することで、ある細胞集団のフローサイトメトリーによる蛍光強度測定値をMESF値に変換し定量化することができる。具体的には、例えばJournal of Research of the National Institute of Standard and Technology, vol. 107, No. 4 (2002) pp339-353に記載の方法に従って測定することができる。ここで採取される生物学的試料は、患者由来の免疫細胞を測定することのできる試料であれば特に限定されず、例えば、末梢血が挙げられる。具体的には、例えば実施例に記載に記載の方法によって測定され得る。

[0030] Fcγ受容体多型の確認

本発明において、対象となる患者がFcγ受容体の遺伝子多型を有するかどうか確認する方法は、特に限定されない。例えば、対象となる患者から生物学的試料を採取し、採取した試料からゲノム遺伝子を単離してFcγ受容体に該当する遺伝子の塩基配列を決定することによって確認することができる。具体的には例えば、Journal of Clinical Oncology, vol.21, No.21 (2003) pp3940-3947に記載の方法に従って測定することができる。ここで採取される生物学的試料は、患者由来のゲノム遺伝子を取得することのできる試料であれば特に限定されず、例えば、末梢血、皮膚切片などが挙げられる。

[0031] 本発明において、組織におけるGPC3の発現量を検出するために用いられる生物学的試料として被験体標品が好適に挙げられる。好ましい被験体標品は

、被験体から得られた組織であり、さらに好ましくは、被験体の肝癌または肝細胞癌組織である。肝癌または肝細胞癌組織を採取する方法としては公知の方法である生検（バイオプシー）が好適に用いられる。肝生検とは細く長い針が皮膚の表面から直接肝臓に刺され、肝臓の組織が採取される方法をいう。通常、針が穿刺される部位は右胸下部の肋間である。術前に超音波検査装置を用いて穿刺部の安全性が確認された上で、穿刺部が消毒される。更に皮膚から肝臓の表面までが麻酔の対象となり、穿刺部の皮膚が小切開された後に穿刺針が穿刺される。

[0032] 組織標品が顕微鏡下で透過光線によって観察されるために、組織標品が顕微鏡に使用される光線を十分に透過する程度に薄切される。薄切の前段階として組織標品が固定される。すなわち、組織・細胞の蛋白質に脱水や変性を起こさせて凝固させることによって、組織を構成する細胞が速やかに死滅し、その構造が安定化および不溶化される。まず、固定の対象とされる組織標品が、パラフィン包埋切片を作るのに適した大きさおよび形の断片として手術用メス等の刃物で切り取られる。次いで、固定を実施するために用いられる試薬である固定液中で当該断片が浸漬される。固定液としては、ホルマリン、更に好ましくは中性緩衝ホルマリンが好適に使用される。中性緩衝ホルマリンの濃度は組織標品の特性または物性に応じて適宜選択される。濃度は1～50%、好ましくは5～25%、更に好ましくは10～15%の間で適宜変更されて使用され得る。組織標品が浸漬された固定液が真空ポンプを用いて適宜脱気される。固定は組織標本を常圧および室温の条件下で固定液中に数時間放置することによって実施される。固定に要する時間は、1時間から7日間、好ましくは2時間から3日間、また好ましくは3時間から24時間、更に好ましくは4時間から16時間の範囲で適宜選択され得る。固定の後にリン酸緩衝液等に更に数時間（2時間から48時間、好ましくは3時間から24時間、更に好ましくは4時間から16時間の範囲で適宜選択され得る時間）、適宜浸漬される。

[0033] 次に、固定が適用された組織標品から、凍結切片法またはパラフィン切片法を用いて切片が好適に作製され得る。凍結切片法の好適な例としては、O.C

.T.compound（Miles. Inc）中に組織を投入して凍結させたものを、クリオスタット（凍結切片作製装置）を用いて薄切する方法が挙げられる。パラフィン切片法においては、固定が適用された組織標品が包埋剤に浸漬され固められることにより、均一かつ適切な硬度が付与される。包埋剤としては、パラフィンが好適に使用され得る。固定が適用された組織標品はエタノールを用いて脱水される。具体的には、組織標品が70％エタノール、80％エタノール、100％エタノールに順次浸漬されることによって、当該組織標品が脱水される。浸漬に要する時間および回数は、1時間から数日および1回から3回の範囲で適宜選択され得る。また、室温または4℃においても浸漬され得るが、4℃において浸漬される場合には、浸漬時間は終夜等その時間が長いほうが好ましい。次いでその液相がキシレンに置換された後に、組織標品がパラフィンによって包埋される。その液相のキシレンへの置換に要する時間は1時間から数時間の範囲で適宜選択され得る。その際に、室温で置換され得るし、4℃においても置換され得るが、4℃において置換される場合には、置換の時間は、終夜等その時間が長いほうが好ましい。パラフィン包埋に要する時間および回数は、1時間から数時間および1回から4回の範囲で適宜選択され得る。その際に、室温で包埋され得るし、4℃においても包埋され得るが、4℃において包埋される場合には、包埋の時間は、終夜等その時間が長いほうが好ましい。また、パラフィン包埋反応が自動化処理されるパラフィン包埋装置（EG1160、Leica等）を用いることによって、組織標品が好適にパラフィン包埋され得る。

[0034] 上述のようにしてパラフィン包埋された組織標品を台木に接着することによって「ブロック」が作製され、このブロックがミクロトームよって1から20μmの厚さから選択される所望の厚さに薄切される。薄切された組織切片は透過性の支持体であるスライドグラス上に静置されることにより固着される。この場合において、組織切片の剥離を防止するためにスライドガラスに0.01％ポリ－L－リジン（Sigma）を塗布し乾燥させたスライドグラスも好適に使用され得る。固着された組織切片は数分から1時間の間から選択される適切な

時間風乾される。

[0035] 抗原賦活化

好ましい態様においては、ホルマリン固定により抗体との反応性が減弱した抗原の反応性を賦活化する。本発明においては、プロテアーゼ抗原賦活化法（PIER法）を適用することも可能であるし、熱誘導抗原賦活化法（HIER法）を適用することも可能である。また、非限定な一態様では、下記で示されるように調製される「同視され得る二つの組織標品」のうち一の標品に対して、PIER法を適用し、他方の標品に対して、HIER法を適用し、抗体と反応させたときの両者間の染色程度の相違を数値化することも可能である。

[0036] 非限定な一態様においては、「生物学的試料」の項で示されるように調製され、透過性の支持体上に取り付けられた二つの組織標品が一組用意される。この当該組織標品は組織上同視され得る二つの組織標品であることが望ましい。「同視され得る」とは、相比較する二つの組織標品がその組織標品が由来する被験体標品中でほぼ同一の細胞または組織から構成されていることを意味する。例えば、隣接する切片として調製された二つの組織標品は同視され得る二つの組織標品である。本発明においても特段別に記載しない限り、「同視され得る二つの組織標品」とは隣接する切片として調製された二つの組織標品をいうが、これに加えて、隣接する切片として調製されていなくとも二つの組織標品を構成する細胞または組織の構成が当該二つの組織標品間で同視できるものであれば「同視され得る二つの組織標品」に該当する。細胞または組織の構成が当該二つの組織標品間で同視できる場合としては、例えば、（１）組織切片中の平面座標上で同一の位置に同一の細胞から由来する細胞の切片が存在する場合、（２）当該細胞の切片が当該平面座標上の同一の位置に存在する割合が少なくとも50％以上、好ましくは60％以上、また好ましくは70％以上、更に好ましくは80％以上、より好ましくは90％以上、特に好ましくは95％以上である場合、等が好適に例示される。

[0037] 熱誘導抗原賦活化法は、マイクロ波による加熱方法やオートクレーブによる加熱方法、または、煮沸処理による加熱方法等が適宜用いられる。液温が

約98℃に保たれるように780Wの出力で煮沸処理する場合、処理等賦活化に要する時間は5分－60分の間から適宜選択され、例えば10分間である。抗原の賦活化処理は、10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液の他、市販のTarget Retrieval Solution (DakoCytomation) 等の中で行うことができる。下記の実施例においてはTarget Retrieval Solutionを使用する。賦活化処理の結果として抗GPC3抗体が認識する抗原中のエピトープが抗体との結合性を獲得して、後述する抗原と抗体の複合体の検出が可能となるものであれば、いずれの緩衝液、水溶液も好適に用いられる。

[0038] プロテアーゼ抗原賦活化法において使用されるプロテアーゼは、その種類や由来について特に限定されるものでなく、一般的に入手可能なプロテアーゼを適宜選択して使用され得る。用いられるプロテアーゼの例として、0.01N塩酸中0.05%濃度のペプシン、または、pH7.6のTris緩衝液中0.01%濃度の$CaCl_2$を更に含有する0.1%濃度のトリプシン、10 mMのEDTAおよび0.5%のSDSを含むpH7.8の10 mM Tris塩酸緩衝液中1～50μg/ml濃度のプロテアーゼK等が好適に挙げられる。さらにプロテアーゼKを用いる場合、その反応液のpHは6.5から9.5の間で適宜選択され、SH試薬やトリプシン阻害剤やキモトリプシン阻害剤も適宜利用され得る。ヒストファインHER2キット (MONO) （ニチレイバイオサイエンス）に添付されるプロテアーゼもこうした好適なプロテアーゼの具体例として挙げられる。プロテアーゼ抗原賦活化は通常37℃にて行われるが、反応温度は25℃から50℃の範囲内において適宜変更され得る。プロテアーゼ抗原賦活化が37℃にて行われる場合には、反応時間は例えば1分から5時間の間で適宜選択され、例えば、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間等である。賦活化処理が終了した後、当該処理が施された組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS (Phosphate buffer saline) が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

[0039] 組織標品と抗GPC３抗体との反応

熱誘導抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施された組織標品および/またはプロテアーゼ抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施された組織標品に対して、後述される抗GPC3抗体を一次抗体として反応させる。当該反応は抗GPC3抗体が抗原中のエピトープを認識して抗原抗体複合体を形成するのに適切な条件下で実施される。通常、当該反応は4℃にて終夜、または37℃にて1時間実施されるが、反応条件は、抗体が抗原中のエピトープを認識して抗原抗体複合体を形成するのに適切な範囲で適宜変更され得る。例えば、反応温度は4℃から50℃の範囲内で変更され得るし、反応時間は1分から7日の間で変更され得る。低温での反応が実施される場合には長い時間反応させることが好ましい。一次抗体反応が終了した後、組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS（Phosphate buffer saline）が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて５分間の洗浄を３回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

[0040] 次いで、一次抗体反応が施された組織標品に対して、一次抗体を認識する二次抗体を反応させる。通常、二次抗体を可視化するための標識物質によって予め標識された二次抗体が用いられる。標識物質としては、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）やCy2（Amersham）、Alexa488（Molecular Probe）等の蛍光色素、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素、または金コロイド等が好適に挙げられる。

[0041] 二次抗体との反応は、抗GPC3抗体と、当該抗GPC3抗体を認識する二次抗体とが抗原抗体複合体を形成するのに適切な条件下で実施される。通常、当該反応は室温または37℃にて30分乃至1時間実施されるが、抗GPC3抗体と二次抗体とが抗原抗体複合体を形成するのに適切な範囲で適宜変更され得る。例えば、反応温度は4℃から50℃の範囲内で変更され得るし、反応時間は1分から7日の間で変更され得る。低温での反応が実施される場合には長い時間反応させることが好ましい。二次抗体反応が終了した後、組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS（Phosphate buffer saline）が好

適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

[0042] 次に、二次抗体反応が施された組織標品に対して、標識物質を可視化する物質を反応させる。二次抗体の標識物質としてペルオキシダーゼを用いた場合には、0.02%過酸化水素水とpH 7.2の0.1 Mトリス塩酸緩衝液で0.1%濃度に調整されたDAB（ジアミノベンジジン）溶液とをインキュベート直前に等量混合することによって得られる反応液で組織標品がインキュベートされる。DABの他には、DAB-NiやAEC+（以上、DAKO）等の発色基質が適宜選択され得る。インキュベートの過程において、時折顕微鏡下で発色の程度を観察し、適切な発色が確認された段階で組織標品をＰＢＳに浸漬することによって可視化反応が止められる。

[0043] 二次抗体の標識物質として、アルカリフォスファターゼを用いた場合には、BCIP（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸）/NBT（ニトロブルーテトラゾリウム）（Zymed）基質溶液（10 mM濃度の$MgCl_2$および28 mM濃度のNaClを含有するpH9.8の50 mM炭酸ナトリウム緩衝液に、0.4 mM濃度でNBTおよび0.38 mM濃度でBCIPが溶解されたもの）で組織標品がインキュベートされる。また、BCIPおよびNBTの他には、Permanent Red、Fast Red、またはFuchsin+（以上、DAKO）等も適宜使用されうる。インキュベートに先立って、1 mM濃度の内在性アルカリフォスファターゼの阻害剤である塩化レバミソール（ナカライテスク）、0.1 M塩化ナトリウムおよび50 mM塩化マグネシウムを含む0.1 Mトリス－塩酸緩衝液（pH 9.5）と、室温にて1分から数時間プレインキュベートしてもよい。インキュベートの過程において、時折顕微鏡下で観察し、反応最終産物である紫色のホルマザンの沈着が観察された段階で、組織標品を水洗または2%ポリビニルアルコールを含むTBSによる反応停止の後、TBST（0.1%のTween20を含むTBS）にて洗浄される。金コロイドが二次抗体の標識として使用される場合には、銀増感によって金粒子に金属銀が付着されることによって金コロイドが可視化される。銀増感の方法は当業者に公知である。

[0044] FITC（フルオレセインイソチオシアネート）やCy2（Amersham）、Alexa488（Molecular Probe）等の蛍光色素を二次抗体の標識物質として用いた場合には、可視化物質の反応工程は不要であり、当該蛍光物質の励起波長の光を照射して、放出される光が蛍光顕微鏡を用いることによって適宜検出され得る。

[0045] 組織免疫染色スコア

本発明の非限定な一態様では、遊離GPC3濃度に加えて、上記の方法によって検出された組織におけるGPC3の発現量から、GPC3標的治療剤療法が有効であると決定する、または、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法も提供される。非限定な一態様では、上記の方法によって検出された組織におけるGPC3の発現が、例えば下記に例示される非限定な方法によって数値化される。本発明において、そのように数値化された組織におけるGPC3の発現量を「GPC3の組織免疫染色スコア」という。

[0046] WO2009116659に記載された方法にしたがって、表１に示す基準に従って算出された、陽性細胞率（Positive cell rate: PR）、細胞質または細胞膜における染色強度（Staining intensity of cytoplasm: SI-cp, Staining intensity of cell membrane: SI-cm）および細胞膜染色パターン（Staining pattern of cell membrane: Sp-cm）の各々のスコアを式１および式２の計算式にもとづいて加算して得られるスコアが、本発明の非限定なGPC3の組織免疫染色スコア（便宜的に、「複合評価スコア１」と呼ぶ）として例示される。

[0047]

[表1-1]

基準	評価	スコア
陽性細胞率 (PR)	0	0
	1%以上20%未満	1
	20%以上50%未満	2
	50%以上	3
染色強度 (SI) ・細胞質 (SI cp) ・細胞膜 (SI cm)	軽微陽性	0
	弱陽性	1
	中程度陽性および/または強陽性を伴う弱陽性	2
	中程度陽性	3
	強陽性	4
細胞膜染色性 (SP cm)	陰性	0
	細胞膜の一部のみ染色	1
	殆どの細胞の細胞膜の一部および一部の細胞の細胞膜の円周状の染色	2
	殆どの細胞の細胞膜の円周状の染色	3

（Sp-Cmの評価に際して、4倍または10倍の対物レンズを用いた検鏡下での視野中細胞の染色が評価された。）

[0048] 式１

IHC total = PR + SI-Cp + SI-Cm + Sp-Cm

[0049] 式２

IHC cm = PR + SI-Cm + Sp-Cm

[0050] [表1-2]

複合評価スコア１	IHC total スコア
高発現	7以上
低または中発現	7未満

[0051] 他に、細胞膜、もしくは細胞質内の染色強度を0～3に分類し、それぞれの染色強度を示す細胞の割合を元に算出するHスコア（文献：KS. McCarty Jr. et al., Use of a monoclonal anti-Estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. Cancer Res. Suppl. (1986) 46, 4244s-4248s）が知られている。

[0052] 一方で、膜、ならびに細胞質の染色強度、染色の割合を元に0～3+に分類する下記スコアリングアルゴリズムおよび同アルゴリズムにもとづく評価スコア（複合評価スコア２）が例示される。

[0053] [表2]

スコア(複合評価スコア2)	評価
0	細胞膜不染色
	腫瘍細胞の10%未満における細胞質内の染色
1+	腫瘍細胞の10%未満における細胞膜の染色
	および/または
	腫瘍細胞の10%以上における細胞質内の染色（注：細胞質内の強染色がある場合、腫瘍細胞の50%未満）
2+	腫瘍細胞の10%以上における弱ないし中程度の細胞膜の染色（注：細胞膜の強染色がある場合、腫瘍細胞の10%未満）（ただし、腫瘍細胞の10%以上における細胞質内の染色の有無によらない（注：細胞質内の染色がある場合、腫瘍細胞の50%未満））
3+	細胞質内の染色の有無によらず腫瘍細胞の10%以上における細胞膜の強染色
	または
	腫瘍細胞の50%以上における細胞質内の強染色

[0054] 本発明において、「GPC3の組織免疫染色スコア」としては、例えばこれらの複合評価スコア１、Hスコア、複合評価スコア２等の単独でまたはこれらを組み合わせて用いることが可能である。非限定の一態様としては、「GPC3の組織免疫染色スコア」は複合評価スコア１が使用され得るし、別の非限定の一態様としては、「GPC3の組織免疫染色スコア」は複合評価スコア２が使用され得る。

[0055] GPC3標的治療剤

本発明において「GPC3標的治療剤」という用語は、GPC3により媒介されるシグナル経路を含めた、GPC3の生物学的活性の遮断、抑制、阻害、または低減をもたらす、またはGPC3を発現する細胞に対する細胞傷害をもたらすあらゆる分子をいう。「標的治療」という用語は、生物学的作用のある特定のメカニズムも示唆するものではなく、GPC3の薬理学的、生理学的、および生化学的相互作用のうち可能性のある作用をすべて含む概念である。GPC3標的治療剤の例として、（１）GPC3に結合するリガンドに対するGPC3の結合の拮抗阻害剤または非拮抗阻害剤、よってGPC3とそのリガンドとの結合に干渉する作用物質、（２）GPC3とそのリガンドとの結合には干渉しないが、その代わり、GPC3によるそのリガンドに対する結合によって生じる活性を阻害または

減少させる作用物質、（３）GPC3の発現を減少させる作用物質、（４）GPC3を発現する細胞に対して細胞傷害活性を誘起することが可能な作用物質、が含まれる。リガンドの非限定な一態様として、wnt（Cancer Res.（2005）65, 6245-6254）、IGF-II（Carcinogenesis（2008）29（7）, 1319-1326）またはFibroblast Growth Factor 2（Int. J. Cancer（2003）103（4）, 455-465）等が例示され得る。このような作用物質の非限定な一態様として、抗体（その抗原結合ドメインを含む）、核酸分子（アンチセンスまたはRNAi分子等）、ペプチド、非ペプチド低分子有機物等が含まれ得る。

[0056] 本発明のGPC3標的治療剤として使用される非ペプチド性の低分子有機物の非限定な一態様として、メチル化抑制遺伝子に作用する非ペプチド性の低分子キノリン誘導体（WO2008/046085）等が例示される。また、細胞傷害性T細胞の細胞傷害活性を誘起するHLA-A2拘束性GPC3ペプチド144-152（配列番号：２）またはHLA-A24拘束性GPC3ペプチド298-306（配列番号：３）（Clin. Cancer Res.（2006）12（9）, 2689-2697）等もまた例示され得る。

[0057] 抗GPC3抗体

本発明のGPC3標的治療剤として使用される抗GPC3抗体の非限定な一態様として、（BioMosaic社よりカタログ番号B0134Rのもとに販売されている）1G12抗体（WO2003/100429）に細胞傷害性物質が連結された抗体薬物複合体（Antibody drug conjugate（ADC））（WO2007/137170）が例示され得る。

[0058] また、上記と異なる非限定な一態様として、WO2006/006693またはWO2009/041062に記載されたヒト化抗GPC3抗体が例示される。すなわち、配列番号：４、配列番号：５、および配列番号：６でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：７、配列番号：８、および配列番号：９でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3を含むヒト化抗GPC3抗体が、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。当該ヒト化抗GPC3抗体の作製に際して、配列番号：１０で表される重鎖フレームワーク配列または配列番号：１１で表される軽鎖フレームワーク配列と配列の同一性が高いヒトフレームワーク配列が適宜選択の上でヒト化の際のテンプレートとして

使用される。

[0059] さらに異なる非限定な一態様として、配列番号：１２、配列番号：１３、および配列番号：１４でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：１５、配列番号：１６、および配列番号：１７でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体が、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。当該ヒト化抗GPC3抗体の作製に際して、配列番号：１８で表される重鎖フレームワーク配列または配列番号：１９で表される軽鎖フレームワーク配列と配列の同一性が高いヒトフレームワーク配列が適宜選択の上でヒト化の際のテンプレートとして使用される。

[0060] 別の異なる非限定な一態様として、配列番号：２０、配列番号：２１、および配列番号：２２でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：２３、配列番号：２４、および配列番号：２５でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体が、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。当該ヒト化抗GPC3抗体の作製に際して、配列番号：２６で表される重鎖フレームワーク配列または配列番号：２７で表される軽鎖フレームワーク配列と配列の同一性が高いヒトフレームワーク配列が適宜選択の上でヒト化の際のテンプレートとして使用される。

[0061] さらに別の異なる非限定な一態様として、配列番号：２８、配列番号：２９、および配列番号：３０でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３１、配列番号：３２、および配列番号：３３でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体が、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。当該ヒト化抗GPC3抗体の作製に際して、配列番号：３４で表される重鎖フレームワーク配列または配列番号：３５で表される軽鎖フレームワーク配列と配列の同一性が高いヒトフレームワーク配列が適宜選択の上でヒト化の際のテンプレートとして使用される。

[0062] また、別の異なる非限定な一態様として、配列番号：３６、配列番号：３７、および配列番号：３８でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３９、配列番号：４０、および配列番号：４１でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体が、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。当該ヒト化抗GPC3抗体の作製に際して、配列番号：４２で表される重鎖フレームワーク配列または配列番号：４３で表される軽鎖フレームワーク配列と配列の同一性が高いヒトフレームワーク配列が適宜選択の上でヒト化の際のテンプレートとして使用される。

[0063] また、さらに別の異なる非限定な一態様として、配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５１で表される軽鎖可変領域を含むヒト化抗GPC3抗体が、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。その他の非限定な一態様として、配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６１、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：６５、および配列番号：６６で表される軽鎖可変領域の群から選択される軽鎖可変領域を含むヒト化抗GPC3抗体が、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。

[0064] また、別の異なる非限定な一態様として、配列番号：６７で表される重鎖可変領域および配列番号：６８で表される軽鎖可変領域を含むヒト化抗GPC3抗体、配列番号：６９で表される重鎖可変領域および配列番号：７０で表される軽鎖可変領域を含むヒト化抗GPC3抗体、配列番号：７１で表される重鎖可変領域および配列番号：７２で表される軽鎖可変領域を含むヒト化抗GPC3

抗体、もしくは配列番号：７１で表される重鎖可変領域および配列番号：７３で表される軽鎖可変領域を含むヒト化抗GPC3抗体もまた、本発明のGPC3標的治療剤として使用され得る。

[0065] 細胞傷害活性

本発明の抗GPC3抗体として、細胞傷害活性を有する抗GPC3抗体が例示される。本発明において細胞傷害活性の非限定な例として、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity：CDC）活性およびT細胞による細胞傷害活性等が挙げられる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味する。一方ADCC活性とは、標的細胞の細胞膜に発現された膜型分子に結合する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のFc領域に、免疫細胞等が当該免疫細胞に発現したFcγレセプターを介して結合し、当該免疫細胞が標的細胞に傷害を与える活性を意味する。目的の抗原結合分子がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定され得る（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans、Coliganら編(1993)等）。

[0066] 具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞が調製される。

（１）エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから摘出された脾臓から、RPMI1640培地（Invitrogen）中で脾臓細胞が分離される。10％ウシ胎児血清（FBS、HyClone）を含む同培地で洗浄された当該脾臓細胞の濃度を5×10^{6}/mLに調製することによって、エフェクター細胞が調製され得る。

[0067] （２）補体溶液の調製

10％ FBS含有培地（Invitrogen）によってBaby Rabbit Complement（CEDARLANE）を10倍に希釈することによって、補体溶液が調製され得る。

[0068] （３）標的細胞の調製

抗原を発現する細胞を0.2 mCiの^{51}Cr-クロム酸ナトリウム（GEヘルスケアバイオサイエンス）とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37℃にて１時間培養することにより該標的細胞が放射性標識され得る。放射性標識後、10% FBS含有RPMI1640培地にて３回洗浄された細胞の濃度を2×10^5/mLに調製することによって、当該標的細胞が調製され得る。

[0069] ADCC活性、又はCDC活性は下記に述べる方法により測定され得る。ADCC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート（Becton Dickinson）に加えられた各50μlずつの標的細胞と抗原結合分子が氷上にて15分間反応させられる。その後、エフェクター細胞100μlが加えられた当該プレートが、炭酸ガスインキュベーター内で4時間静置される。抗体（抗原結合分子）の終濃度は例えば0または10μg/ml等の濃度が設定され得る。静置後、各ウェルから回収された100μlの上清の放射活性が、ガンマカウンター（COBRAII AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company）を用いて測定される。測定値を用いて細胞傷害活性（%）が(A-C) / (B-C) x 100の計算式に基づいて計算され得る。Aは各試料における放射活性（cpm）、Bは1% NP-40 (nacalai tesque)を加えた試料における放射活性（cpm）、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性（cpm）を表す。

[0070] 一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート（Becton Dickinson）に加えられた各50μlずつの標的細胞と抗原結合分子が氷上にて15分間反応させられる。その後、補体溶液100μlが加えられた当該プレートが、炭酸ガスインキュベーター内で４時間静置される。抗体抗原結合分子の終濃度は例えば0または3μg/mL等の濃度が設定され得る。静置後、各ウェルから回収された100μlの上清の放射活性が、ガンマカウンターを用いて測定される。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様に計算され得る。

[0071] 細胞傷害性物質

また、本発明の抗GPC3抗体の非限定な一態様として、細胞傷害性物質が連結された抗GPC3抗体も例示される。そのような抗GPC3-抗体薬物複合体（Antibody drug conjugate (ADC)）はWO2007/137170等に具体的に開示されている

がこれに限定されない。すなわち、細胞傷害性物質としては、以下に例示される化学療法剤であってもよく、またAlleyら（Curr. Opin. Chem. Biol.（2010）14, 529-537）やWO2009/140242に開示されている化合物であってもよく、これらの化合物が適切なリンカー等で抗原結合分子に結合される。

[0072] 本発明の抗GPC3抗体に結合される化学療法剤が以下に例示され得る；アザリビン（azaribine）、アナストロゾール（anastrozole）、アザシチジン（azacytidine）、ブレオマイシン（bleomycin）、ボルテゾミブ（bortezomib）、ブリオスタチン-1（bryostatin-1）、ブスルファン（busulfan）、カンプトテシン（camptothecin）、10-ヒドロキシカンプトテシン（10-hydroxycamptothecin）、カルムスチン（carmustine）、セレブレックス（celebrex）、クロラムブシル（chlorambucil）、シスプラチン（cisplatin）、イリノテカン（irinotecan）、カルボプラチン（carboplatin）、クラドリビン（cladribine）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、シタラビン（cytarabine）、ダカルバジン（dacarbazine）、ドセタキセル（docetaxel）、ダクチノマイシン（dactinomycin）、ダウノマイシングルクロニド（daunomycin glucuronide）、ダウノルビシン（daunorubicin）、デキサメタゾン（dexamethasone）、ジエチルスチルベストロール（diethylstilbestrol）、ドキソルビシン（doxorubicin）、ドキソルビシンブルクロニド（doxorubicin glucuronide）、エピルビシン（epirubicin）、エチニルエストラジオール（ethinyl estradiol）、エストラムスチン（estramustine）、エトポシド（etoposide）、エトポシドグルクロニド（etoposide glucuronide）、フロキシウリジン（floxuridine）、フルダラビン（fludarabine）、フルタミド（flutamide）、フルオロウラシル（fluorouracil）、フルオキシメステロン（fluoxymesterone）、ゲムシタビン（gemcitabine）、ヒドロキシプロゲステロンカプロエート（hydroxyprogesterone caproate）、ヒドロキシウレア（hydroxyurea）、イダルビシン（idarubicin）、イフォスファミド（ifosfamide）、ロイコボリン（leucovorin）、ロムスチン（lomustine）、マイタンシノイド（maytansinoid）、メクロレタミン（mechlorethamine）、メドロキシプロゲステ

ロンアセテート（medroxyprogesterone acetate）、メゲストロールアセテート（megestrol acetate）、メルファラン（melphalan）、メルカプトプリン（mercaptopurine）、メトトレキセート（methotrexate）、ミトキサントロン（mitoxantrone）、ミトラマイシン（mithramycin）、ミトマイシン（mitomycin）、ミトタン（mitotane）、フェニルブチレート（phenylbutyrate）、プレドニゾン（prednisone）、プロカルバジン（procarbazine）、パクリタキセル（paclitaxel）、ペントスタチン（pentostatin）、セムスチン（semustine）、ストレプトゾシン（streptozocin）、タモキシフェン（tamoxifen）、タキサン類（taxanes）、タキソール（taxol）、テストステロンプロピオネート（testosterone propionate）、サリドマイド（thalidomide）、チオグアニン（thioguanine）、チオテパ（thiotepa）、テニポシド（teniposide）、トポテカン（topotecan）、ウラシルマスタード（uracil mustard）、ビンブラスチン（vinblastine）、ビノレルビン（vinorelbine）、ビンクリスチン（vincristine）。

[0073] 本発明において、好ましい化学療法剤は、低分子の化学療法剤である。低分子の化学療法剤は、本発明の抗GPC3-抗体薬物複合体が結合した後も、抗GPC3抗体の機能に干渉する可能性が低い。本発明において、低分子の化学療法剤は、通常100～2000、好ましくは200～1000の分子量を有する。ここに例示した化学療法剤は、いずれも低分子の化学療法剤である。これらの本発明における化学療法剤は、生体内で活性な化学療法剤に変換されるプロドラッグを含む。プロドラッグの活性化は酵素的な変換であり得るし、非酵素的な変換でもあり得る。

[0074] また、本発明の抗GPC3-抗体薬物複合体に連結される細胞傷害性物質としては、Pseudomonas exotoxin A、Saporin-s6、Diphtheria toxin、Cnidarian toxin等の毒性ペプチド（トキシン）やRadioiodine、Photosensitizerも例示され得る。毒性ペプチドの例としては、例えば、次のものが好適に挙げられる。

ジフテリアトキシンＡ鎖（Diphtheria toxin A Chain）（Langoneら（Met

hods in Enzymology (1983) 93, 307-308)) ;

シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas Exotoxin) (Nature Medicine (1996) 2, 350-353) ;

リシン鎖 (Ricin A Chain) (Fultonら (J. Biol. Chem. (1986) 261, 5314-5319)、Sivamら (Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173)、Cumberら、(J. Immunol. Methods (1990) 135,15-24、Wawrzynczakら (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562)、およびGheeiteら (J. Immunol.Methods (1991) 142,223-230)) ;

無糖鎖リシンＡ鎖 (Deglycosylated Ricin A Chain) (Thorpeら (Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)) ;

アブリンＡ鎖 (Abrin A Chain) (Wawrzynczakら (Br. J. Cancer (1992) 66, 361-366)、Wawrzynczakら (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562)、Sivamら (Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173)、およびThorpeら (Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)) ;

ゲロニン (Gelonin) (Sivamら (Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173)、Cumberら (J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24)、Wawrzynczakら (Cancer Res., (1990) 50, 7519-7562)、およびBolognesiら (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)) ;

ポークウイード抗ウィルス蛋白 (PAP-s; Pokeweed anti-viral protein fromseeds) (Bolognesiら (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)) ;

ブリオジン (Bryodin) (Bolognesiら (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)) ;

サポリン (Saporin) (Bolognesiら (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)) ;

モモルジン (Momordin) (Cumberら (J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24) ;Wawrzynczakら (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562)、およびBolognesiら (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)) ;

モモルコキン（Momorcochin）（Bolognesiら（Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346））；

ジアンシン３２（Dianthin 32）（Bolognesiら（Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346））；

ジアンシン３０（Dianthin 30）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter (1986) 195, 1-8））；

モデッシン（Modeccin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter (1986) 195, 1-8））；

ビスカミン（Viscumin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter (1986) 195, 1-8））；

ボルケシン（Volkensin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter (1986) 195, 1-8））；

ドデカンドリン（Dodecandrin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter (1986) 195, 1-8））；

トリチン（Tritin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter (1986) 195, 1-8））；

ルフィン（Luffin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter (1986) 195, 1-8））；および

トリコキリン（Trichokirin）（Casellasら（Eur. J. Biochem. (1988) 176, 581-588）、およびBolognesiら（Clin. exp. Immunol., (1992) 89, 341-346））。

[0075] 一方、本発明の抗GPC3-抗体薬物複合体による細胞傷害活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート（Becton Dickinson）に、標的細胞と、当該抗GPC3-抗体薬物複合体の50 μlずつが加えられ、氷上にて15分間の反応が実施される。当該プレートは炭酸ガスインキュベーター内で１から４時間インキュベートされる。抗GPC3-抗体薬物複合体の終濃度は0から3μg/mlの範囲内で適宜使用され得る。培養後、100 μlの上清が回収され、ガンマカウンターで当該上清が有する放射活性が測定される。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様

にして計算され得る。

[0076] Fc領域

本発明の抗GPC3抗体に含まれる定常領域に含まれるFc領域は、ヒトIgGから取得され得るが、IgGの特定のサブクラスに限定されるものでもない。Fc領域とは、EUナンバリングで表されるおよそ216位のアミノ酸における、パパイン切断部位のヒンジ領域のN末端から、当該ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含める抗体の重鎖定常領域をいう。当該Fc領域の好適な例として、後述されるようにFcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域が挙げられる。そのようなFc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：７４）、IgG2（配列番号：７５）、IgG3（配列番号：７６）、またはIgG4（配列番号：７７）で表される定常領域に含まれるFc領域が例示される。

[0077] Fcγレセプター（FcγR）

Fcγレセプター（FcγRとも記載される）とは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合し得るレセプターをいい、実質的にFcγレセプター遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131およびR131を含む。 即ち、FcγRIIa（H)およびFcγRIIa（R））、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；およびアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む。 即ち、FcγRIIIa（V)およびFcγRIIIa（F））およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）、ならびにいかなる未発見のヒトFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含むが、これらに限定されるものではない、いかなる生物由来でもよい。マウスFcγR類には、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）およびFcγRIII-2（FcγRIV、CD16-2）、並びにいかなる未発見のマウスFcγR類またはFcγRアイソフォームまたは

アロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFcγレセプターの好適な例としてはヒトFcγRI（CD64）、FcγRIIa（CD32）、FcγRIIb（CD32）、FcγRIIIa（CD16）及び/又はFcγRIIIb（CD16）が挙げられる。ヒトFcγRIのポリペプチド配列は配列番号：７８（NP_000557.1）に、ヒトFcγRIIa（アロタイプH131）のポリペプチド配列は配列番号：７９（AAH20823.1）に（アロタイプR131は配列番号：７９の166番目のアミノ酸がArgに置換されている配列である）、FcγRIIbのポリペプチド配列は配列番号：８０（AAI46679.1）に、FcγRIIIaのポリペプチド配列は配列番号：８１（AAH33678.1）に、およびFcγRIIIbのポリペプチド配列は、配列番号：８２（AAI28563.1）に記載されている（カッコ内はRefSeq等のデータベース登録番号を示す）。Fcγレセプターが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合活性を有するか否かは、FACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等の公知の方法によって確認され得る（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010）。

[0078] FcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）ならびにアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）は、IgGのFc領域と結合するα鎖と細胞内に活性化シグナルを伝達するITAMを有する共通γ鎖が会合する。一方、アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131およびR131を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）の自身の細胞質ドメインにはITAMが含まれている。これらのレセプターは、マクロファージやマスト細胞、抗原提示細胞等の多くの免疫細胞に発現している。これらのレセプターがIgGのFc領域に結合することによって伝達される活性化シグナルによって、マクロファージの貪食能や炎症性サイトカインの産生、マスト細胞の脱顆粒、抗原提示細胞の機能亢進が促進される。上記のように活性化シグナルを伝達する能力を有するFcγレセプターは、本明細書において活性型Fcγレセプターと呼ばれる。

[0079] 一方、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）の自身の細胞質内ドメインには抑制型シグナルを伝達するITIMが含まれている。B細胞ではFcγRIIbとB細胞レセプター（BCR）との架橋によってBCRからの活性化シグナルが抑制される結果BCRの抗体産生が抑制される。マクロファージでは、FcγRIIIとFcγRIIbとの架橋によって貪食能や炎症性サイトカインの産生能が抑制される。上記のように抑制化シグナルを伝達する能力を有するFcγレセプターは、本明細書において抑制型Fcγレセプターと呼ばれる。

[0080] FcγRに対するFc領域の結合活性

前述されるように、本発明の抗GPC3抗体に含まれるFc領域として、Fcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域が挙げられる。そのようなFc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：７４）、IgG2（配列番号：７５）、IgG3（配列番号：７６）、またはIgG4（配列番号：７７）で表される定常領域に含まれるFc領域が例示される。Fcγレセプターが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合活性を有するか否かは、FACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等の公知の方法によって確認され得る（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010）。

[0081] ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルを検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光

反応は起きない。

[0082] 例えば、ドナービーズにビオチン標識されたFc領域を含む抗GPC3抗体が結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ化されたFcγレセプターが結合される。競合するFc領域改変体を含む抗GPC3抗体の非存在下では、天然型Fc領域を有する抗GPC3抗体とFcγレセプターは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていないFc領域改変体を含む抗GPC3抗体は、天然型Fc領域を有する抗GPC3抗体とFcγレセプター間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。抗体をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。FcγレセプターをGSTでタグ化する方法としては、FcγレセプターをコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子が作動可能に連結されたベクターに保持した細胞等において発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM（GraphPad社、San Diego）等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合（one-site competition）モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0083] 相互作用を観察する物質の一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムのカーブからカイネティクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数(kd）が、当該定数

の比からアフィニティー（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好適に用いられる。阻害測定法の例はLazorら（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010）において記載されている。

[0084] Fcγレセプター（FcγR）結合改変Fc領域

本発明の抗GPC3抗体が含むFc領域として、ヒトIgG1（配列番号：７４）、IgG2（配列番号：７５）、IgG3（配列番号：７６）、またはIgG4（配列番号：７７）で表される定常領域に含まれるFc領域のほかに、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFcγR結合改変Fc領域も適宜使用され得る。本明細書において、「天然型ヒトIgGのFc領域」とは、配列番号：７４、７５、７６または７７で例示されるヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4の定常領域に含まれるFc領域のEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるFc領域を意味する。そのようなFcγR結合改変Fc領域は、天然型ヒトIgGのFc領域のアミノ酸を改変することによって作製され得る。FcγR結合改変Fc領域のFcγRに対する結合活性が、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγRに対する結合活性より高いか否かは、前記のFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等の公知の方法を用いて適宜実施され得る。

[0085] 本発明において、Fc領域の「アミノ酸の改変」または「アミノ酸改変」とは、出発Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列に改変することを含む。出発Fc領域の修飾改変体がpH中性域においてヒトFcγレセプターに結合することができる限り、いずれのFc領域も出発Fc領域として使用され得る。また、既に改変が加えられたFc領域を出発Fc領域としてさらなる改変が加えられたFc領域も本発明のFc領域として好適に使用され得る。出発Fc領域とは、ポリペプチドそのもの、出発Fc領域を含む組成物、または出発Fc領域をコードするアミノ酸配列を意味し得る。出発Fc領域には、抗体の項で概説された組換えによって産生された公知のFc領域が含まれ得る。出発Fc領域の起源は、限定されないが非ヒト動物の任意の生物またはヒトから取得され得る。

好ましくは、任意の生物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、アレチネズミ、ネコ、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、および非ヒト霊長類から選択される生物が好適に挙げられる。別の態様において、出発Fc領域はまた、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、チンパンジー、またはヒトから取得され得る。好ましくは、出発Fc領域は、ヒトIgG1から取得され得るが、IgGの特定のクラスに限定されるものでもない。このことは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc領域を出発Fc領域として適宜用いることができることを意味する。同様に、本明細書において、前記の任意の生物からのIgGの任意のクラスまたはサブクラスのFc領域を、好ましくは出発Fc領域として用いることができることを意味する。天然に存在するIgGのバリアントまたは操作された型の例は、公知の文献（Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91、Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470、Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202、国際公開WO2009/086320、WO2008/092117、WO2007/041635、およびWO2006/105338）に記載されるがそれらに限定されない。

[0086] 改変の例としては一以上の変異、例えば、出発Fc領域のアミノ酸とは異なるアミノ酸残基に置換された変異、あるいは出発Fc領域のアミノ酸に対して一以上のアミノ酸残基の挿入または出発Fc領域のアミノ酸から一以上のアミノ酸の欠失等が含まれる。好ましくは、改変後のFc領域のアミノ酸配列には、天然に生じないFc領域の少なくとも部分を含むアミノ酸配列を含む。そのような変種は必然的に出発Fc領域と100%未満の配列同一性または類似性を有する。好ましい実施形態において、変種は出発Fc領域のアミノ酸配列と約75%～100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性、より好ましくは約80%～100%未満、より好ましくは約85%～100%未満の、より好ましくは約90%～100%未満、最も好ましくは約95%～100%未満の同一性または類似性のアミノ酸配列を有する。本発明の非限定の一態様において、出発Fc領域および本発明のFcγR結合改変Fc領域の間には少なくとも１つのアミノ酸の差がある。出発Fc領域と本発明のFcγR結合改変Fc領域のアミノ酸の違いは、特に前述のEU

ナンバリングで特定されるアミノ酸残基の位置の特定されたアミノ酸の違いによっても好適に特定可能である。

[0087] Fc領域のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法も採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357））。例えば、終止コドンの１つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。

[0088] 本発明の抗原結合分子に含まれる、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFcγR結合改変Fc領域はいかなる方法によっても取得され得るが、具体的には、出発Fc領域として用いられるヒトIgG型免疫グロブリンのアミノ酸の改変によって当該FcγR結合改変Fc領域が取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えば、配列番号：７４、７５、７６または７７で例示されるヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）の定常領域に含まれるFc領域が挙げられる。

[0089] 他のアミノ酸への改変は、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。抗原結合分子が、ヒトFc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高い効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。こうしたアミノ酸の改変としては、例えば国際公開WO2007/024249、WO2007/021841、WO2006/031370、WO2000/042072、WO2004/029

207、WO2004/099249、WO2006/105338、WO2007/041635、WO2008/092117、WO2005/070963、WO2006/020114、WO2006/116260およびWO2006/023403などにおいて報告されている。

[0090] そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、EUナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFc領域（FcγR結合改変Fc領域）を取得することができる。

[0091] 本発明に使用するために、特に好ましい改変としては、例えば、Fc領域のEUナンバリングで表される；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gl

n、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Se

r、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、もしくは

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ一つ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所以上のアミノ酸が改変され得る。二箇所以上のアミノ酸の改変の組合せとしては、例えば表３（表３－１～表３－３）に記載されるような組合せが挙げられる。また、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFcγR結合改変Fc領域（FcγR結合改変Fc領域）を含む抗GPC3抗体の具体的な例が、WO2007/047291に記載されている。

[0092]

[表3-1]

アミノ酸の組合せ	アミノ酸の組合せ
K370E/P396L/D270E	S239Q/I332Q
Q419H/P396L/D270E	S267D/I332E
V240A/P396L/D270E	S267E/I332E
R255L/P396L/D270E	S267L/A327S
R255L/P396L/D270E	S267Q/A327S
R255L/P396L/D270E/R292G	S298A/I332E
R255L/P396L/D270E	S304T/I332E
R255L/P396L/D270E/Y300L	S324G/I332D
F243L/D270E/K392N/P396L	S324G/I332E
F243L/R255L/D270E/P396L	S324I/I332D
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	S324I/I332E
F243L/R292P/Y300L/P396L	T260H/I332E
F243L/R292P/Y300L	T335D/I332E
F243L/R292P/P396L	V240I/V266I
F243L/R292P/V305I	V264I/I332E
F243L/R292P	D265F/N297E/I332E
S298A/E333A/K334A	D265Y/N297D/I332E
E380A/T307A	F243L/V262I/V264W
K326M/E333S	N297D/A330Y/I332E
K326A/E333A	N297D/T299E/I332E
S317A/K353A	N297D/T299F/I332E
A327D/I332E	N297D/T299H/I332E
A330L/I332E	N297D/T299I/I332E
A330Y/I332E	N297D/T299L/I332E
E258H/I332E	N297D/T299V/I332E
E272H/I332E	P230A/E233D/I332E
E272I/N276D	P244H/P245A/P247V
E272R/I332E	S239D/A330L/I332E
E283H/I332E	S239D/A330Y/I332E
E293R/I332E	S239D/H268E/A330Y
F241L/V262I	S239D/I332E/A327A
F241W/F243W	S239D/I332E/A330I

[0093]

[表3-2]

F243L/V264I	S239D/N297D/I332E
H268D/A330Y	S239D/S298A/I332E
H268E/A330Y	S239D/V264I/I332E
K246H/I332E	S239E/N297D/I332E
L234D/I332E	S239E/V264I/I332E
L234E/I332E	S239N/A330L/I332E
L234G/I332E	S239N/A330Y/I332E
L234I/I332E	S239N/S298A/I332E
L234I/L235D	S239Q/V264I/I332E
L234Y/I332E	V264E/N297D/I332E
L235D/I332E	V264I/A330L/I332E
L235E/I332E	V264I/A330Y/I332E
L235I/I332E	V264I/S298A/I332E
L235S/I332E	Y296D/N297D/I332E
L328A/I332D	Y296E/N297D/I332E
L328D/I332D	Y296H/N297D/I332E
L328D/I332E	Y296N/N297D/I332E
L328E/I332D	Y296Q/N297D/I332E
L328E/I332E	Y296T/N297D/I332E
L328F/I332D	D265Y/N297D/T299L/I332E
L328F/I332E	F241E/F243Q/V262T/V264E
L328H/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R
L328I/I332D	F241E/F243Y/V262T/V264R
L328I/I332E	F241L/F243L/V262I/V264I
L328M/I332D	F241R/F243Q/V262T/V264R
L328M/I332E	F241S/F243H/V262T/V264T
L328N/I332D	F241W/F243W/V262A/V264A
L328N/I332E	F241Y/F243Y/V262T/V264T
L328Q/I332D	I332E/A330Y/H268E/A327A
L328Q/I332E	N297D/I332E/S239D/A330L
L328T/I332D	N297D/S298A/A330Y/I332E
L328T/I332E	S239D/A330Y/I332E/K326E
L328V/I332D	S239D/A330Y/I332E/K326T
L328V/I332E	S239D/A330Y/I332E/L234I
L328Y/I332D	S239D/A330Y/I332E/L235D

[0094]

[表3-3]

L328Y/I332E	S239D/A330Y/I332E/V240I
N297D/I332E	S239D/A330Y/I332E/V264T
N297E/I332E	S239D/A330Y/I332E/V266I
N297S/I332E	S239D/D265F/N297D/I332E
P227G/I332E	S239D/D265H/N297D/I332E
P230A/E233D	S239D/D265I/N297D/I332E
Q295E/I332E	S239D/D265L/N297D/I332E
R255Y/I332E	S239D/D265T/N297D/I332E
S239D/I332D	S239D/D265V/N297D/I332E
S239D/I332E	S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/I332N	S239D/I332E/A330Y/A327A
S239D/I332Q	S239D/I332E/H268E/A327A
S239E/D265G	S239D/I332E/H268E/A330Y
S239E/D265N	S239D/N297D/I332E/A330Y
S239E/D265Q	S239D/N297D/I332E/K326E
S239E/I332D	S239D/N297D/I332E/L235D
S239E/I332E	S239D/V264I/A330L/I332E
S239E/I332N	S239D/V264I/S298A/I332E
S239E/I332Q	S239E/V264I/A330Y/I332E
S239N/I332D	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
S239N/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
S239N/I332N	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
S239N/I332Q	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
S239Q/I332D	S239D/I332E/H268E/A330Y/A327A
S239Q/I332E	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239Q/I332N	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E
S267E/L328F	G236D/S267E
S239D/S267E	

[0095] 本発明の抗GPC3抗体に含まれるFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合活性を測定するpHの条件はpH酸性域乃至pH中性域の条件が適宜使用され得る。本発明の抗原結合分子に含まれるFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合活性を測定する条件としてのpH酸性域乃至pH中性域とは、通常pH5.8～pH8.0を意味する。好ましくはpH6.0 ～pH7.4の任意のpH値によって示される範囲であり、好ましくはpH6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、

6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、および7.4から選択され、特に好ましくは癌組織のpHに近いpH6.15～7.4である（Vaupelら（Cancer Res.（1989）49, 6449-6665））。測定条件に使用される温度として、Fc領域とヒトFcγレセプターとの結合アフィニティーは、10℃～50℃の任意の温度で評価され得る。好ましくは、Fc領域とヒトFcγレセプターとの結合アフィニティーを決定するために、15℃～40℃の温度が使用される。より好ましくは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35℃のいずれか1つのような20℃から35℃までの任意の温度も同様に、Fc領域とFcγレセプターとの結合アフィニティーを決定するために使用される。25℃という温度は本発明の態様の非限定な一例である。

[0096] 本明細書において、FcγR結合改変Fc領域のFcγレセプターに対する結合活性が天然型Fc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いとは、FcγR結合改変Fc領域のFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、これらのヒトFcγレセプターに対する天然型Fc領域の結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、対照とするヒトIgGの天然型Fc領域を含む抗GPC3抗体の結合活性に比較してFcγR結合改変Fc領域を含む抗GPC3抗体の結合活性が、105%以上、好ましくは110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特に好ましくは130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、7.5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上の結合活性を示すことをいう。天然型Fc領域としては、出発Fc領域も使用され得るし、同じサブクラスの抗体の天然型Fc領域も使用され得る。

[0097] 本発明では、対照とするヒトIgGの天然型Fc領域として、EUナンバリングで表される297位のアミノ酸に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が好適に用いられる。EUナンバリングで表される297位のアミ

ノ酸に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かは、公知の手法を用いて確認され得る。例えば、下記のような方法によって、天然型ヒトIgGのFc領域に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かを判定することが可能である。被験天然型ヒトIgGにN-Glycosidase F (Roche diagnostics) を反応させることによって、被験天然型ヒトIgGから糖鎖が遊離される (Weitzhandlerら (J. Pharma. Sciences (1994) 83, 12, 1670-1675)。次に、エタノールを反応させてタンパク質が除かれた反応液 (Schenkら (J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695) の濃縮乾固物が、2-アミノベンズアミドによって蛍光標識される (Biggeら (Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238)。セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬された、蛍光標識された2-AB化糖鎖が、順相クロマトグラフィーによって解析される。検出されるクロマトグラムのピークを観察することによって、ヒトIgGの天然型Fc領域に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かを判定することが可能である。

[0098] 対照とする同じサブクラスの抗体の天然型Fc領域を含む抗GPC3抗体としては、IgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗GPC3抗体が適宜使用され得る。当該Fc領域の構造として、配列番号：７４（データベース登録番号AAC82527.1のN末にA付加）、７５（データベース登録番号AAB59393.1のN末にA付加）、７６（データベース登録番号CAA27268.1）、および７７（データベース登録番号AAB59394.1のN末にA付加）に記載される定常領域に含まれるFc領域が例示される。また、ある特定のアイソタイプの抗GPC3抗体を被検物質として使用する場合には、当該特定のアイソタイプの抗GPC3抗体を対照として用いることによって、被験Fc領域を含む抗GPC3抗体によるFcγレセプターに対する結合活性の効果が検証される。上記のようにして、Fcγレセプターに対する結合活性が高いことが検証されたFc領域を含む抗GPC3抗体が適宜選択される。

[0099] 活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いFc領域

前記したように、活性型Fcγレセプターとしては、FcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）、 FcγRIIaならびにアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）が好適に挙げられる。また、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）が抑制型Fcγレセプターの好適な例として挙げられる。

[0100] 本発明の非限定な一態様として、活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いFc領域を含む抗GPC3抗体が挙げられる。この場合、活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いとは、Fc領域のFcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、FcγRIIbに対する結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、Fc領域を含む抗原結合分子のFcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、FcγRIIbに対する結合活性の、105%以上、好ましくは110%以上、120%以上、130%以上、140%以上、特に好ましくは150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上、450%以上、500%以上、750%以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍以上の結合活性を示すことをいう。こうしたFc領域を含むIgG抗体は、前述のADCC活性が増強されていることが知られていることから、当該Fc領域を含む抗GPC3抗体は、本発明のGPC3標的治療剤として有用である。

[0101] 本発明の非限定な一態様では、活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い（活性型Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有する）Fc領域の例として、前述されたEUナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、

254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ一つ以上のアミノ酸が天然型Fc領域と異なるアミノ酸に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0102] 本発明の非限定な一態様では、活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い（活性型Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有する）Fc領域の例として、表３－１から３－３に記載される複数のアミノ酸が天然型Fc領域と異なるアミノ酸に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0103] 糖鎖が修飾されたFc領域

本発明が提供する抗GPC3抗体に含まれるFc領域として、Fc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高くなるように、またはバイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加したFc領域の割合が高くなるように修飾されたFc領域も含まれ得る。抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基を除去すると、FcγRIIIaに対する親和性が増強されることが知られている（Satoら（Expert Opin. Biol. Ther. (2006) 6 (11), 1161-1173））。こうしたFc領域を含むIgG1抗体は、上記ADCC活性が増強されていることが知られていることから、当該Fc領域を含む抗原結合分子は、本発明の医薬組成物に含まれる抗原結合分子としても有用である。抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が

除去された抗体としては、例えば、次のような抗体；

－グリコシル化が修飾された抗体（国際公開WO1999/054342等）、

－糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）、

が挙げられる。また、Fc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高くなるように、またはバイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加したFc領域の割合が高くなるように修飾されたFc領域を含む抗GPC3抗体の具体的な例が、WO2006/046751およびWO2009/ 041062に記載されている。

[0104] より具体的には、抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体の異なる非限定の一態様として、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）を作製するために、糖鎖修飾を受けるポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性が改変された結果、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が作製される。当該宿主細胞において所望の抗体遺伝子を発現することによって、当該宿主細胞の培養液からその糖鎖中のフコースが欠損した当該抗体が回収され得る。ポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性として、フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.152）、フコーストランスポーター（SLC35C1）、GMD（GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ）（EC 4.2.1.47）、Fx（GDP-ケト-6-デオキシマンノース3, 5-エピメラーゼ, 4-レダクターゼ）（EC 1.1.1.271）、およびGFPP（GDP-β-L-フコースピロフォスフォリラーゼ）（EC 2.7.7.30）からなる群から選択される酵素またはトランスポーターの活性が非限定の好適な例として挙げられ得る。これらの酵素またはトランスポーターは、その活性を発揮することができれば必ずしもその構造は特定されない。本明細書においては、これらの活性を発揮することが可能なタンパク質を機能性タンパク質という。これらの活性を改変する方法の非限定の一態様として、これらの活性の欠失が挙げられる。これらの活性が欠失した宿主細胞を作製するために、これ

らの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等公知の方法が適宜採用され得る（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）。そのような活性が欠失した宿主細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、HEK293細胞、またはハイブリドーマ細胞等に内在性であるこれらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等によって作製され得る。

[0105] バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体（国際公開WO2002/079255等）が公知である。非限定な一態様では、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体を作製するために、GnTIII（β-1,4-マンノシル-グリコプロテイン，4-β-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.144）活性またはGalT（β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.38）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子を発現する宿主細胞が作製される。別の非限定の好適な一態様では、前記の機能性タンパク質に加えて、ヒトManII（マンノシダーゼII）（3.2.1.114）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTI（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI）（EC 2.4.1.94）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTII（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII）（EC 2.4.1.143）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、ManI（マンノシダーゼ）（EC 3.2.1.113）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、およびα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.68）と共発現する宿主細胞が作製される（国際公開WO2004/065540）。

[0106] 前記のような糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞、およびバイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞に抗体遺伝子を含む発現ベクターを形質導入することによって、抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体、およびバイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体がそれぞれ作製され得る。これらの抗体の製造方法は本発明のFc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合

が高くなるように、またはバイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加したFc領域の割合が高くなるように修飾された改変Fc領域を含む抗原結合分子の製造方法にも適用することが可能である。こうした製造方法によって作製された本発明の抗原結合分子に含まれるFc領域に結合した糖鎖の組成は、前記の「Fcγレセプター（FcγR）結合改変Fc領域」で記載された方法によって確認され得る。

[0107] 等電点が改変された抗GPC3抗体

本発明で使用される抗GPC3抗体の非限定な一態様として、その等電点（pI）が変化するように、抗GPC3抗体のアミノ酸残基が改変されている抗GPC3抗体も例示される。本発明が提供する抗GPC3抗体における「アミノ酸残基の電荷の改変」の好適な例としては以下のものが挙げられる。pI値を増加させる改変としては、例えば、配列番号：５０で表される抗GPC3抗体の重鎖可変領域中のKabatナンバリングで表される43位のQのKへの置換、52位のDのNへの置換、105位のQのRへの置換から選択される少なくとも一つの置換を行うことができ、例えば配列番号：６７で表されるアミノ酸配列に改変される。また、例えば、配列番号：５１または配列番号：６６で表される抗GPC3抗体の軽鎖可変領域中のKabatナンバリングで表される17位のEのQへの置換、27位のQのRへの置換、105位のQのRへの置換から選択される少なくとも一つの置換を行うことができ、例えば配列番号：６８で表されるアミノ酸配列に改変される。一方、pI値を減少させる改変としては、配列番号：５０で表される抗GPC3抗体の重鎖可変領域中のKabatナンバリングで表される19位のKのTへの置換、43位のQのEへの置換、61位のGのEへの置換、62位のKのSへの置換、64位のKのQへの置換、65位のGのDへの置換から選択される少なくとも一つの置換を行うことができ、例えば配列番号：６９、配列番号：７１で表されるアミノ酸配列に改変される。また、例えば、配列番号：５１または配列番号：６６で表される抗GPC3抗体の軽鎖可変領域中のKabatナンバリングで表される24位のRのQへの置換、27位のQのEへの置換、74位のKのTへの置換、77位のRのSへの置換、107位のKのEへの置換から選択される少なくとも一つの置換を行うことが

でき、例えば配列番号：７０、配列番号：７２、配列番号：７３で表されるアミノ酸配列に改変される。更に、pI値を減少させる改変としては、配列番号：７４で表される重鎖定常領域中においてEUナンバリングで表される268位、274位、355位、356位、358位、419位から選択されるアミノ酸の少なくとも一つの置換が挙げられる。これらの置換は、例えば、配列番号３１で表される重鎖定常領域の、EUナンバリングで表される268位のHのQへの置換、274位のKのQへの置換、355位のRのQへの置換、356位のDのEへの置換、358位のLのMへの置換、419位のQのEへの置換、から選択される少なくとも一つの置換が好適な例として挙げられ得る。これらの置換の結果、ヒト抗体のIgG1の定常領域とIgG4の定常領域とのキメラ体が構築される。すなわち、当該置換によって、改変された抗体の免疫原性に影響を及ぼすことなく、所望のpIを有する抗体の作製が可能となる。

[0108] ヘテロジェニティー低減のための改変

配列番号：７４、７５、７６または７７で表されるIgGの定常領域におけるEUナンバリングで表される446位のGlyおよび447位のLysが欠損したIgG定常領域も本発明の抗GPC3抗体に含まれる定常領域として使用され得る。これらのアミノ酸を両方欠損させることにより、抗体の重鎖定常領域の末端に由来するヘテロジェニティーを低減することが可能である。

[0109] 抗体の修飾

ポリペプチドの翻訳後修飾とは、ポリペプチドの生合成において翻訳されたポリペプチドに対する化学修飾をいう。抗体の一次構造はポリペプチドから形成されるため、本発明の抗GPC3抗体には、抗GPC3抗体の一次構造であるポリペプチドの翻訳後修飾を受けた修飾物も含まれる。ポリペプチドの翻訳後修飾には大きく、官能基付加、ポリペプチドまたはペプチドの付加（ISG化、SUMO化、ユビキチン化）、アミノ酸の化学的性質の変換（シリル化または脱アミン、脱アミド）、および構造変換（ジスルフィド化、プロテアーゼ分解）に分類することができる。本発明における翻訳後修飾の非限定な一態様として、ポリペプチドの形成単位であるアミノ酸残基に対するペプチド付加

または官能基付加が挙げられる。かかる修飾として具体的には、リン酸化（セリン、スレオニン、チロシン、アスパラギン酸等）、グルコシル化（セリン、スレオニン、アスパラギン酸等）、アシル化（リシン）、アセチル化（リシン）、ヒドロキシル化（リシン、プロリン）、プレニル化（システイン）、パルミトイル化（システイン）、アルキル化（リシン、アルギニン）、ポリグルタミル化（グルタミン酸）、カルボキシル化（グルタミン酸）、ポリグリシル化（グルタミン酸）、シトルリン化（アルギニン）、スクシンイミド形成（アスパラギン酸）等を挙げることができる。例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾を受けた抗GPC3抗体も当然のことながら本発明の抗GPC3抗体に含まれる。また、例えば、二個の硫黄原子の間に形成される共有結合を意味する「ジスルフィド結合」によって重鎖と軽鎖、または重鎖同士が連結された抗GPC3抗体の翻訳後修飾物も、本発明の抗GPC3抗体に含まれる。アミノ酸のシステインに含まれるチオール基は、第二のチオール基とジスルフィド結合または架橋を形成することができる。一般的にIgG分子では、CH1およびCL領域がジスルフィド結合によって連結され、重鎖を形成する二つのポリペプチドは、EUナンバリングで表される226位および229位のシステイン残基間のジスルフィド結合によって連結される。こうしたジスルフィド結合によって連結された抗GPC3抗体の翻訳後修飾物も、本発明の抗GPC3抗体に含まれる。

[0110] GPC3標的治療剤療法

「GPC3標的治療剤療法」という用語は、GPC3標的治療剤を患者に投与することをいう。

[0111] 「癌に対するGPC3標的治療剤療法の有効性」または「癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効である」という用語は、癌であると診断された患者において、GPC3標的治療剤療法が、所望のまたは有益な効果を生じさせることをいう。所望のまたは有益な効果には、（１）癌細胞のさらなる成長または拡散の阻害、（２）癌細胞の死滅、（３）癌の再発の阻害、（４）癌に関連する症候（痛みなど）の緩和、低減、軽減、阻害、もしくは前記症候の頻度の低

減、または（５）患者の生存率の改善が含まれ得る。癌の再発の阻害には、放射線、化学療法、外科手術、または他の技術によりこれまでに治療されている、癌の原発部位および周辺組織での癌の成長の阻害、ならびに新たな遠位部位での癌の成長の不存在が含まれる。所望のまたは有益な効果は、患者により知覚されるものまたは他覚的なもののいずれかであり得る。例えば、患者がヒトである場合、ヒトは、改善または療法に対する応答の、患者により知覚される兆候として、気力もしくは活力の改善または痛みの減少を認識し得る。あるいは、臨床医は、身体的検査、実験的パラメーター、腫瘍マーカー、またはX線撮影による所見に基づいて、腫瘍サイズまたは腫瘍組織量の減少に気付き得る。治療に対する応答について臨床医が観察し得るいくつかの実験的兆候には、白血球数、赤血球数、血小板数、赤血球沈降速度、および様々な酵素レベルなどの、試験結果の正常化が含まれる。さらに、臨床医は、検出可能な腫瘍マーカーの減少を観察し得る。あるいは、他覚的な改善を評価するために、超音波診断、核磁気共鳴試験、および陽電子放出試験などの他の試験を用いることができる。

[0112] 本発明のGPC3標的治療剤療法の対象となる癌は、標的となるGPC3が高発現している癌であればどのような癌も該当する。そのような癌の一例として、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、子宮体癌、頭頸部癌、肝臓癌、肺癌、悪性カルチノイド（Malignant carcinoid）、悪性神経膠腫（Malignant glioma）、悪性リンパ腫（Malignant lymphoma）、悪性黒色種（Malignant melanoma）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿路上皮癌等から選択される癌が例示される。

[0113] GPC3標的治療剤療法の有効性を決定する方法、またはGPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法

本発明の非限定な一態様では、GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者及び/又はGPC3標的治療剤療法を受けた患者から単離された生物学的試料中の、免疫細胞数及び/又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量を測定し、当該細胞数又は発現量が所定の値である場合に当該GPC3標的治療剤療法が有効

であると決定する方法、または当該療法の継続を決定する方法が提供される。「GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者」とは、癌であると診断された患者であって、上述のGPC標的治療剤を投与された経歴のない患者をいい、更に、当該患者は、上述の組織におけるGPC3の発現量からGPC3標的治療法が有効であると決定されていてもよい。また、「GPC3標的治療剤療法を受けた患者」とは、上述のGPC3標的治療剤を投与された経歴を有する患者をいう。GPC3標的治療剤の投与経路は、投与されるGPC3標的治療剤の性状等に併せて好適な投与経路が適宜選択され得る。例えば、投与経路の例として非経口投与が例示される。非経口投与のさらなる例として、例えば、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与が例示される。例えば、注射投与のさらなる例として、静脈内注射投与、筋肉内注射投与、腹腔内注射投与、皮下注射投与などによる全身または局部的な投与が例示される。

[0114] 本発明の非限定な一態様では、前記患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数を測定することを含み、ここで、当該細胞数が所定の値である場合に、当該患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることが予測、予想または決定され、または当該療法の継続が決定される。本発明で測定される免疫細胞は、特に限定されないが、例えば、白血球、単球、好中球、リンパ球が挙げられる。リンパ球については、CD19+B細胞、CD45+リンパ球、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、並びに、CD4+/CD8+T細胞、CD16+NK細胞、NKp46+NK細胞、CD56強陽性NK細胞、CD56-CD16+NK細胞、CD56弱中陽性CD16-NK細胞、CD56弱中陽性CD16強陽性NK細胞が挙げられる。これらの細胞のいずれか一種類の細胞数を測定し、癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることを予測、予想または決定するための指標とすることも可能であるし、これらの細胞のうち、いくつかを組み合わせて指標としてもよい。

[0115] 所定の値は、例えば、複数の癌患者にGPC3標的治療剤療法を行い、癌に対するGPC3標的治療剤療法の効果が確認できない患者群の免疫細胞数の平均値より高い範囲にある値であれば、当該療法の効果が期待できる所定の値とすることが可能である。また、例えば、複数の癌患者にGPC3標的治療剤療法を

行い、有意なPFSの延長又は有意なOSの延長傾向が認められる患者群の免疫細胞数の平均値に基づき所定の値を決定することができる。また、例えば、複数の癌患者の免疫細胞数を測定し、その中央値より高い値を所定の値とすることでも、GPC3標的治療剤療法による有意なPFSの延長又は有意なOSの延長傾向が認められる患者を高い確率で選択するための所定の値とすることができる。ここで複数の癌患者とは、GPC3標的治療剤療法の有効性又は継続を決定するための基準となる、免疫細胞数に対する所定の値を有意な値として算出できる数であればよく、100人以上が好ましく、150人以上がより好ましい。所定の値として、具体的には例えば、白血球数の場合には、2500個/μL、3000個/μL、3500個/μL、4000個/μL、4350個/μL、4500個/μL、4750個/μL、5000個/μL、5250個/μL、5500個/μL、5750個/μL、6000個/μL、6500個/μL、7000個/μL、7500個/μL、8000個/μL、8500個/μL、9000個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、2500個/μLから9000個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、3000個/μLから8000個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、3500個/μLから7000個/μL、更に好ましい数値範囲として、4000個/μLから6000個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0116] 単球数の場合には、50個/μL、100個/μL、200個/μL、300個/μL、350個/μL、400個/μL、450個/μL、500個/μL、550個/μL、600個/μL、650個/μL、700個/μL、800個/μL、900個/μL、1000個/μL、1100個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、50個/μLから1100個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、100個/μLから1000個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、200個/μLから900個/μL、更に好ましい数値範囲として、400個/μLから800個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0117] 好中球の場合には、500個/μL、1000個/μL、1500個/μL、2000個/μL、25

00個/μL、3000個/μL、3250個/μL、3500個/μL、3750個/μL、4000個/μL、4250個/μL、4500個/μL、5000個/μL、5500個/μL、6000個/μL、6500個/μL、7000個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、500個/μLから7000個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、1000個/μLから6000個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、1500個/μLから5000個/μL、更に好ましい数値範囲として、3000個/μLから4000個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0118] リンパ球の場合には、400個/μL、500個/μL、600個/μL、700個/μL、800個/μL、900個/μL、1000個/μL、1100個/μL、1200個/μL、1250個/μL、1300個/μL、1400個/μL、1500個/μL、1600個/μL、1700個/μL、1800個/μL、1900個/μL、2000個/μL、2100個/μL、2200個/μL、2300個/μL、2400個/μL、2500個/μL、3000個/μL、3500個/μL、4000個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、400個/μLから4000個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、450個/μLから3000個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、500個/μLから2500個/μL、更に好ましい数値範囲として、1000個/μLから2000個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0119] 更にリンパ球の中でも、CD45+リンパ球の場合には、400個/μL、500個/μL、600個/μL、700個/μL、800個/μL、900個/μL、950個/μL、1000個/μL、1050個/μL、1100個/μL、1200個/μL、1300個/μL、1400個/μL、1500個/μL、1600個/μL、1700個/μL、1800個/μL、1900個/μL、2000個/μL、2100個/μL、2200個/μL、2300個/μL、2400個/μL、2500個/μL、2600個/μL、2700個/μL、2800個/μL、2900個/μL、3000個/μL、3500個/μL、4000個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、400個/μLから4000個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲

として、450個/μLから3500個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、500個/μLから3000個/μL、更に好ましい数値範囲として、1000個/μLから1500個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0120] CD3+T細胞の場合には、250個/μL、300個/μL、400個/μL、500個/μL、600個/μL、700個/μL、800個/μL、900個/μL、1000個/μL、1100個/μL、1200個/μL、1250個/μL、1300個/μL、1400個/μL、1500個/μL、1600個/μL、1700個/μL、1800個/μL、1900個/μL、2000個/μL、2100個/μL、2200個/μL、2300個/μL、2400個/μL、2500個/μL、3000個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、250個/μLから3000個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、300個/μLから2500個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、350個/μLから2000個/μL、更に好ましい数値範囲として、400個/μLから1000個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0121] CD4+T細胞の場合には、150個/μL、200個/μL、250個/μL、300個/μL、350個/μL、400個/μL、450個/μL、500個/μL、550個/μL、600個/μL、650個/μL、700個/μL、750個/μL、800個/μL、850個/μL、900個/μL、950個/μL、1000個/μL、1100個/μL、1200個/μL、1300個/μL、1400個/μL、1500個/μL、1600個/μL、1700個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、150個/μLから1700個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、200個/μLから1500個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、250個/μLから700個/μL、更に好ましい数値範囲として、300個/μLから600個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0122] CD8+T細胞の場合には、50個/μL、75個/μL、100個/μL、125個/μL、150個/μL、175個/μL、200個/μL、225個/μL、250個/μL、275個/μL、300個/

μL、325個/μL、350個/μL、400個/μL、500個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、50個/μLから500個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、50個/μLから300個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、75個/μLから275個/μL、更に好ましい数値範囲として、100個/μLから250個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0123] CD16+NK細胞の場合には、25個/μL、50個/μL、150個/μL、175個/μL、200個/μL、225個/μL、250個/μL、300個/μL、350個/μL、400個/μL、450個/μL、500個/μL、550個/μL、600個/μL、700個/μL、800個/μL等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、25個/μLから800個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、50個/μLから700個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、100個/μLから600個/μL、更に好ましい数値範囲として、150個/μLから300個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0124] NKp46+NK細胞の場合には、20個/μL、30個/μL、40個/μL、50個/μL、60個/μL、70個/μL、80個/μL、90個/μL、100個/μL、110個/μL、120個/μL、130個/μL、140個/μL、150個/μL、200個/μL、250個/μL、300個/μL、350個/μL、400個/μL・等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、20個/μLから400個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、30個/μLから300個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、50個/μLから250個/μL、更に好ましい数値範囲として、100個/μLから200個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0125] CD56-CD16+NK細胞の場合には、2個/μL、3個/μL、4個/μL、5個/μL、6個/μL、7個/μL、8個/μL、9個/μL、10個/μL、11個/μL、12個/μL、13個/μL、14個/μL、15個/μL、20個/μL、25個/μL、30個/μL、40個/μL等の特

定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、2個/μLから40個/μLまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、2個/μLから30個/μLが例示される。より好ましい数値範囲として、2個/μLから20個/μL、更に好ましい数値範囲として、3個/μLから10個/μLが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0126] また、本発明の非限定な一態様では、前記患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞上で発現している分子の発現量を測定することを含み、ここで、当該発現量が所定の値である場合に、当該患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることが予測、予想または決定され、または当該療法の継続が決定される。本発明で測定される免疫細胞上で発現している分子は、特に限定されないが、例えば、CD16が挙げられる。これらの分子の発現量を測定し、癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることを予測、予想または決定するための指標とすることも可能であるし、これらの発現量のうち、いくつかを組み合わせて指標としてもよい。所定の値は、例えばCD16の場合は、複数の癌患者にGPC3標的治療剤療法を行い、癌に対するGPC3標的治療剤療法の効果が確認できない患者群の免疫細胞上のCD16の発現量の平均値より高い範囲にある値であれば、当該療法の効果が期待できる所定の値とすることが可能である。また、例えば、複数の癌患者にGPC3標的治療剤療法を行い、有意なPFSの延長又は有意なOSの延長傾向が認められる患者群のCD16の発現量の平均値に基づき所定の値を決定することができる。また、例えば、複数の癌患者のCD16の発現量を測定し、その中央値より高い値を所定の値とすることでも、GPC3標的治療剤療法による有意なPFSの延長又は有意なOSの延長傾向が認められる患者を高い確率で選択するための所定の値とすることができる。ここで複数の癌患者とは、GPC3標的治療剤療法の有効性又は継続を決定するための基準となる、CD16の発現量に対する所定の値を有意な値として算出できる数であればよく、100人以上が好ましく、150人以上がより好ましい。所定の値として、具体的には例えば、NK細胞上のCD16の場合には、

上述のフローサイトメトリーによる蛍光強度測定値が、150000mesf、175000 mesf、200000 mesf、225000 mesf、250000 mesf、275000 mesf、300000 mesf、325000 mesf、350000 mesf、375000 mesf、400000 mesf、425000 mesf、450000 mesf、475000 mesf、500000 mesf、525000 mesf、550000 mesf、575000 mesf、600000 mesf、625000 mesf、650000 mesf、675000 mesf、700000 mesf、750000 mesf、800000 mesf等の特定の値より高い値から決定され得る。当該特定の値は、例えば、150000 mesfから800000 mesfまでの数値範囲から適宜選択され得る。好ましい数値範囲として、200000 mesfから700000 mesf、が例示される。より好ましい数値範囲として、300000 mesfから650000 mesf、更に好ましい数値範囲として、350000 mesfから600000 mesfが例示されるがこれらに限定されない。当該数値範囲より選択される特定の値より高い値を所定の値とすることができる。

[0127] また、本発明の非限定な一態様では、前記患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞を用いGPC3発現細胞に対するADCC活性を測定することを含み、ここで、当該免疫細胞上のCD16及び/又はCD107aの発現量が所定の値である場合に、当該患者におけるADCC活性が高く、癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることが予測、予想または決定され、または当該療法の継続が決定される。本発明において免疫細胞上のCD16、CD107aのいずれか一種類又は両方の発現量を測定し、癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることを予測、予想または決定するための指標とすることも可能である。

[0128] 所定の値は、例えば、複数の癌患者にGPC3標的治療剤療法を行い、癌に対するGPC3標的治療剤療法の効果が確認できない患者群の生物学的試料中の免疫細胞上のCD16又はCD107aの発現量をGPC3標的療法剤存在下と非存在下とで比較して、CD16の場合は、所定の値が、GPC3標的療法剤が非存在下での発現量との差の平均値より低い範囲にある値であれば、当該療法の効果が期待できる所定の値とすることが可能であり、CD107aの場合は、所定の値が、GPC3標的療法剤が非存在下での発現量との差の平均値より高い範囲にある値であれば、当該療法の効果が期待できる所定の値とすることが可能である。また

、例えば、複数の癌患者にGPC3標的治療剤療法を行い、有意なPFSの延長又は有意なOSの延長傾向が認められる患者群の生物学的試料中の免疫細胞上のCD16又はCD107aの発現量をGPC3標的療法剤存在下と非存在下とで比較して、GPC3標的療法剤が非存在下での発現量との差の平均値に基づき所定の値を決定することができる。また、例えば、複数の癌患者の生物学的試料中の免疫細胞上のCD16又はCD107aの発現量をGPC3標的療法剤存在下と非存在下とで比較して、CD16の場合は、所定の値が、GPC3標的療法剤が非存在下での発現量との差の中央値より低い範囲にある値であれば、当該療法の効果が期待できる所定の値とすることが可能であり、CD107aの場合は、所定の値が、GPC3標的療法剤が非存在下での発現量との差の中央値より高い範囲にある値であれば、当該療法の効果が期待できる所定の値とすることが可能である。ここで複数の癌患者とは、GPC3標的治療剤療法の有効性又は継続を決定するための基準となる、CD16又はCD107aの発現量に対する所定の値を有意な値として算出できる数であればよく、100人以上が好ましく、150人以上がより好ましい。

[0129] 所定の値は、具体的には例えば、CD16の場合には、GPC3標的療法剤存在下でのCD16発現量からGPC3標的療法剤非存在下での発現量を差し引いた値が－10%から－95%から選択される特定の値より低い値が例示される。好ましい数値範囲として、－20%から－90%、更に好ましい数値範囲として、－50%から－90%が例示されるがこれらに限定されない。

[0130] CD107aの場合には、GCP標的療法剤存在下でのCD16発現量からGPC3標的療法剤非存在下での発現量を差し引いた値が5%から70%から選択される特定の値より高い値が例示される。好ましい数値範囲として、10%から60%、更に好ましい数値範囲として、25%から60%が例示されるがこれらに限定されない。

[0131] 免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量の所定の値は、多くの因子、例えば、用いられるアッセイ方法、遊離GPC3を測定する試料のタイプ、試料の保存条件（温度および期間等）、患者の民族的アイデンティティー等に依存して、わずかに変化し得る。上記の有効であることを予測、予

想または決定する方法、または当該療法の継続を決定する方法において、免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量は、患者から単離された生物学的試料、特に末梢血において測定される。

[0132] 前記の免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量は、GPC3標的治療剤療法を開始する前及び/又は開始した後に単離された試料において測定され得るが、それらは所定の時間間隔で採取された複数の試料でも測定され得る。所定の時間間隔で採取された複数の試料のうちいずれかひとつにおける免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量が上述の所定の細胞数及び/又は発現量である場合に、当該患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることが予測、予想または決定され、もしくは当該療法の継続が決定される。所定の時間間隔は適宜設定されるが、当該間隔の非限定な一態様としてGPC3標的治療剤の初回投与後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日（すなわち1週）、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日（すなわち2週）、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日（即ち3週）、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日（すなわち4週）、29日、30日、1月、5週、6週、7週、8週、9週、10週、2月、3月、4月、5月、または6月、もしくは１回、２回、３回、４回、もしくはそれ以上の治療サイクル後などの、療法の開始と終結との間のあらゆる時点で採取され得る。投与間隔すなわち治療サイクルは適宜設定され得るが、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日（すなわち1週）、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日（すなわち2週）、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日（即ち3週）、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日（すなわち4週）、29日、30日、1月、5週、6週、7週、8週、9週、10週、2月、3月、4月、5月、6月等が非限定な一例として挙げられる。

[0133] 上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定する際に、当該患者がFcγ受容体のタイプIIA及び/又はタイプIIIAの遺伝子において、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及

び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有するかどうかをも考慮することも可能である。すなわち、対象患者における免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値であって、対象患者が、FcγRIIIAの158位のアミノ酸残基の少なくとも１つがValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定することも含まれる。

[0134] また、上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定する際に、当該患者がFcγ受容体のタイプIIA及び/又はタイプIIIAの遺伝子において、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有するかどうかをも考慮することも可能である。すなわち、対象患者における免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値であって、対象患者が、FcγRIIIAの158位のアミノ酸残基の少なくとも１つがValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定することも含まれる。

[0135] ここで、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型を有するとは、上述のFcγ受容体多型の確認に記載の方法に従って、FcγRIIIAの場合には158位のアミノ酸残基をコードする塩基配列を確認し、Valのホモ型(V/V)又はヘテロ型(V/F)の塩基配列の場合に、これに該当する。また、FcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有するとは、同様に、FcγRIIAのの131位アミノ酸残基をコードする塩基配列をを確認し、Hisのホモ型(H/H)又はヘテロ型(H/R)の塩基配列の場合に、これに該当する。

[0136] 上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定する

際に、さらに、当該患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量をも考慮することも可能である。すなわち、対象患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量が特定の評価スコア以上であって、対象患者における免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定することも含まれる。

[0137] また、上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定する際に、さらに、当該患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量を併せて考慮することも可能である。すなわち、対象患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量が特定の評価スコア以上であって、対象患者における免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定することも含まれる。

[0138] 患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量が特定の評価スコア以上である場合の非限定の一態様として、所定の組織免疫染色スコア以上であることが挙げられる。所定の組織免疫染色スコア以上である場合の非限定の一態様として、WO2009116659に記載された染色法（染色法１）による染色の結果算出される複合評価スコア１が高発現、または低もしくは中発現（各々IHC totalスコアが7以上または7未満）が例示され得る。また複合評価スコア２で用いられる染色法（染色法２）による染色の結果算出されるGPC3-IHCスコア（複合評価スコア２）が1+、2+、3+である場合等もまた所定の組織免疫染色スコア以上である場合の非限定の一態様として例示され得る。

[0139] 治療剤および製剤

本発明において治療剤とは、通常、疾患の治療もしくは予防、あるいは検査・診断のための薬剤をいう。また、本発明において、「GPC3標的治療剤療法を受ける前の癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は

当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者に投与するためのGPC3標的治療剤」との用語は、「GPC3標的治療剤療法を受ける前の癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者にGPC3標的治療剤を投与することを含む癌の治療方法」と言い換えることも可能であるし、「癌を治療するための医薬の製造における、GPC3標的治療剤療法を受ける前の癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者に投与するためのGPC3標的治療剤の使用」と言い換えることも可能である。また、本発明において、「GPC3標的治療剤療法を受けた癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者にさらに投与するためのGPC3標的治療剤」との用語は、「GPC3標的治療剤療法を受けた癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者にGPC3標的治療剤をさらに投与することを含む癌の治療方法」と言い換えることも可能であるし、「癌を治療するための医薬の製造における、GPC3標的治療剤療法を受けた癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者にさらに投与するためのGPC3標的治療剤の使用」と言い換えることも可能である。

[0140] 本発明の治療剤は、当業者に公知の方法を用いて製剤化され得る。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用され得る。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化され得る。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定される。

[0141] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の

製剤実施にしたがって処方され得る。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適切な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80（TM）、HCO-50等）が併用され得る。

[0142] 油性液としてはゴマ油、大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び/またはベンジルアルコールも併用され得る。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコール及びフェノール）、酸化防止剤と配合され得る。調製された注射液は通常、適切なアンプルに充填される。

[0143] 本発明の治療剤は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の治療剤が投与される。例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与され得る。

[0144] 投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択され得る。前記治療剤を含有する医薬用製剤の投与量は、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲に設定され得る。または、例えば、患者あたり0.001～100000 mgの投与量が設定され得るが、本発明はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状などにより変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投与量及び投与方法を設定することが可能である。例えば、本発明の好ましい投与量と投与方法の一例として、患者の血中トラフ値が一定量以上となるように投与することができる。好ましい血中トラフ値としては、例えば、150μg/mL以上、160μg/mL以上、170μg/mL以上、180μg/mL以上、190μg/mL以上、200μg/mL以上、210μg/mL以上、220μg/mL以上、230μg/mL以上、240μg/mL以上、250μg/mL以上、260μg/mL以上、270μg/mL以上、280μg/mL以上、290μg/mL以

上、300μg/mL以上、400μg/mL以上を挙げることができる。より好ましくは、200μg/mL以上を挙げることができる。

[0145] 本発明の製剤には、GPC3標的治療剤療法を受けた癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者にさらに投与する旨の指示書が含まれる。また、別の非限定な一態様ではGPC3標的治療剤療法を受けた癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が、GPC3標的治療剤療法を受けた後に増大している患者にさらに投与する旨の指示書が含まれる。

[0146] 本発明の非限定な一態様では、GPC3標的治療剤療法を受けた患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量を測定することを含み、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定する、または当該療法の継続を決定することが記載される指示書を含む製剤が提供される。

[0147] 本発明の非限定な一態様では、前記患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量を測定することを含み、ここで、当該細胞数及び/又は発現量が所定の値である場合に、当該患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることが予測、予想または決定され、または当該療法の継続が決定されることが記載される指示書を含む製剤が提供される。ここで当該指示書に記載される所定の値は、上述のGPC3標的治療剤療法の有効性を決定する方法、またはGPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法に記載の所定の値が例示される。

[0148] 免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量の所定の値は、多くの因子、例えば、用いられるアッセイ方法、免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量を測定する試料のタイプ、試料の保存条件（温度および期間等）、患者の民族的アイデンティティー等に依存して、わずかに変化し得る。上記の有効であることを予測、予想または決定する方法、

または当該療法の継続を決定する方法において、免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量の所定の値として、患者から単離された生物学的試料、特に末梢血における値が測定される。

[0149] 前記の免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量は、GPC3標的治療剤療法を開始する前及び/又は開始した後に単離された試料において測定され得るが、それらは所定の時間間隔で採取された複数の試料でも測定され得る。所定の時間間隔で採取された複数の試料のうちいずれかひとつにおける免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が上述の所定の値である場合に、当該患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法が有効であることが予測、予想または決定され、もしくは当該療法の継続が決定される。GPC3標的治療剤療法を開始した後の試料採取の所定の時間間隔は適宜設定されるが、当該間隔の非限定な一態様としてGPC3標的治療剤の初回投与後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日（すなわち1週）、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日（すなわち2週）、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日（即ち3週）、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日（すなわち4週）、29日、30日、1月、5週、6週、7週、8週、9週、10週、2月、3月、4月、5月、または6月、もしくは１回、２回、３回、４回、もしくはそれ以上の治療サイクル後などの、療法の開始と終結との間のあらゆる時点で採取され得る。投与間隔すなわち治療サイクルは適宜設定され得るが、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日（すなわち1週）、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日（すなわち2週）、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日（即ち3週）、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日（すなわち4週）、29日、30日、1月、5週、6週、7週、8週、9週、10週、2月、3月、4月、5月、6月等が非限定な一例として挙げられる。

[0150] 上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であることが記載される指示書には、当該患者がFcγ受容体のタイプIIA及び/又はタイプIIIAの遺伝子において、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がVal

である多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有するかどうかをも考慮することも記載され得る。すなわち、対象患者における免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値であって、対象患者が、FcγRIIIAの158位のアミノ酸残基の少なくとも１つがValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定することも記載され得る。

[0151] また、上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定することが記載される指示書には、当該患者がFcγ受容体のタイプIIA及び/又はタイプIIIAの遺伝子において、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有するかどうかをも考慮することも記載され得る。すなわち、対象患者における免疫細胞数及び当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値であって、対象患者が、FcγRIIIAの158位のアミノ酸残基の少なくとも１つがValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定することも記載され得る。

[0152] ここで、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型を有するとは、上述のFcγ受容体多型の確認に記載の方法に従って、FcγRIIIAの場合には158位のアミノ酸残基をコードする塩基配列を確認し、Valのホモ型(V/V)又はヘテロ型(V/F)の塩基配列の場合に、これに該当する。また、FcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有するとは、同様に、FcγRIIAの131位アミノ酸残基をコードする塩基配列をを確認し、Hisのホモ型(H/H)又はヘテロ型(H/R)の塩基配列の場合に、これに該当する。

[0153] 上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定する

ことが記載される指示書には、さらに、当該患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量を併せて考慮することも記載され得る。すなわち、対象患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量が特定の評価スコア以上であって、対象患者における免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定することも記載され得る。

[0154] また、上記の、当該免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定することが記載される指示書には、当該患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量を併せて考慮することも記載され得る。すなわち、対象患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量が特定の評価スコア以上であって、対象患者における免疫細胞数及び/又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定することも記載され得る。

[0155] 患者から単離された組織、特に肝癌組織を含む癌組織におけるGPC3の発現量が特定の評価スコア以上である場合の非限定の一態様として、所定の組織免疫染色スコア以上であることが挙げられる。所定の組織免疫染色スコア以上である場合の非限定の一態様として、WO2009116659に記載された染色法（染色法１）による染色の結果算出される複合評価スコア１が高発現、または低もしくは中発現（各々IHC totalスコアが7以上または7未満）が例示され得る。また複合評価スコア２で用いられる染色法（染色法２）による染色の結果算出されるGPC3-IHCスコア（複合評価スコア２）が1+、2+、3+である場合等もまた所定の組織免疫染色スコア以上である場合の非限定の一態様として例示され得る。

[0156] 以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例 1

[0157] 本実施例で用いられるGC33(一般名: codrituzumab)は、ヒトGPC3に高い親和性をもって結合する遺伝子組換えヒト化IgG1モノクローナル抗体である（WO2006/006693）。GC33の進行および/または再発性肝細胞癌（HCC）患者でかつ少なくとも1剤の全身療法による全治療後に病態進行をきたした、又は有害事象のために薬剤投与が中止された、切除不能な進行性又は転移性肝細胞癌患者における効果を確認するため、第II相無作為化プラセボ対照二重盲検多施設共同試験が実施された（NP-27884試験）。進行性又は転移性HCC患者における無憎悪生存期間による有効性評価を主要目的とし、全生存期間、病勢コントロール率、無憎悪期間を指標とした有効性評価、ならびに安全性および/または忍容性の評価、GC33の薬物動態プロファイル、およびバイオマーカー探索を副次目的とする本試験では、HCC患者にGC33（1,600 mg）が最初の2週は週1回、それ以降は2週に1回の点滴を用いた静脈注射によって投与された。

[0158] 投与が検討されたHCC患者は、組織学的に確認された、治癒的療法（外科切除、肝移植など）および/または局所療法に適していない、もしくは治療後増悪した進行性又は転移性のHCC（fibrolamellar型を除く）を持ち、少なくとも1剤の全身療法による前治療歴を有していた。適格患者は少なくとも18歳であり、GPC3測定用の腫瘍サンプルの提供が可能で、米国東海岸癌臨床試験グループ・パフォーマンスステータスが0もしくは1で、かつChild-Pugh（チャイルドピュー指数） Aクラスであった。また、固形腫瘍の治療効果基準（RECIST）に従い少なくとも1つの評価可能な病変を有していた。他の基準としては、適切な造血機能（絶対好中球数≧1500/μl、血小板≧50000/μl、ヘモグロビン≧8.0g/dl）、肝機能（総ビリルビン≦2mg/dl、アスパルギン酸アミノトランスフェラーゼおよびアラニンアミノトランスフェラーゼ≦正常上限値の5倍）、および腎機能（血清クレアチニン≦正常上限値の2倍）が評価された。閉経前の女性については、治験薬投与開始前10日以内に実施された血清妊娠検査で陰性が確認されている患者、外科的避妊処置を受けた、又は閉経後1年以上経過している妊娠の可能性のない女性、閉経後（12カ月間以上無月経）、又は外科的避妊処置を受けた（卵巣及び／又は子宮の切除）以外の女

性については、2種類の適切な避妊方法を、治験治療中及び治験薬投与終了後少なくとも3カ月以上使用することに同意した患者は登録可能であった。男性の場合は、治験治療中に加え、治験薬投与終了後少なくとも40日間のバリア法に基づく避妊方法を使用することに同意した患者が登録された。一方で、GPC3標的治療剤投与前の2週間以内に主要な外科手術を受けたもしくは重篤な障害から回復していない患者、脳又は軟髄膜への転移が確認されている患者、過去5年以内に悪性腫瘍の既往を有する患者、B型／C型肝炎以外の治療を要する活動性の感染症がある患者、治験薬投与開始前4週間以内にNCI CTCAE v4.0に基づくGrade 3以上の出血の既往を有する患者、肝移植を含む臓器移植の既往を有する患者、本試験で投与される薬剤以外の抗癌剤を投与される予定のある，又は投与中の患者、試験登録前2週間以内に抗癌剤を投与された患者、肝細胞癌に対する前回の局所領域療法又は全身療法に伴う副作用から完全に回復していない患者、インターフェロン療法を施行中の患者、ベースラインにおけるQTcが470 msを上回る、又はベースラインにおいて安静時徐脈（45回／分未満）を呈する患者、治験薬投与開始前2週間以内に，治療を目的とした抗凝血剤又は血栓溶解剤を投与された患者（カテーテルの詰まりを除去する目的，又は予防目的での低用量投与は除く）、妊娠中又は授乳中の患者、HIV陽性患者，又はAIDS関連疾患を発症している患者、類似の薬剤（モノクローナル抗体，蛋白含有製剤，チャイニーズハムスター卵巣由来製剤）に対する過敏症の既往がある患者、重要な併存疾患を有しており，治験薬による悪化の可能性があると治験責任／分担医師が判断した患者は登録の除外対象とされた。

[0159] プロトコルは、医薬品の臨床試験の実施の基準のガイドラインに従って実施され、それぞれの参加する治験倫理審査委員会により認可された。全ての患者は、登録の前に、書面のインフォームドコンセントに署名した。患者は、疾患の進行または許容不可能な毒性が発現しない限り、GC33の投与が継続された。腫瘍の評価はベースラインで実施し、疾患が進行するまで投与開始から4サイクル、7サイクル、10サイクルの時点、その後は4サイクルごとに反

復されて評価された。なお、1サイクルは2週間となっており、疾患の状態は治験責任医師によって評価された。

[0160] 患者は、2:1の比率でGC33群（1600 mg固定用量を1週間隔で2回投与後，隔週投与，n = 121例）あるいはプラセボ群（n = 60例）に無作為化割付及びGPC3-IHC キット（Ventana社製）を用いたIHC染色によりGPC3発現レベル（複合評価スコア２）（0，1+，2+/3+）に基づき3コホートに層別化された。主要解析は、治験実施計画書にて計画されていた128例の無再発生存（PFS）イベントが起きた時点で実施された。

[0161] HCC腫瘍組織におけるGPC3タンパク質の発現はGPC3組織免疫染色（GPC3-IHC）、すなわち複合評価スコア２によって評価された。GPC3-IHCは米国Ventana Medical Systemsにて中央測定が実施された。各病院によって針生検により摘出された後にフォルマリン固定およびパラフィン法埋された腫瘍ブロックより調製されたHCC腫瘍組織の未染色スライドの免疫組織染色が実施された。抗体としてマウスGC33抗体（Ventana社製）が用いられた。

実施例 2

[0162] 上記のとおりGC33が投与された121症例ならびにプラセボが投与された60症例のうち、128症例分のPFSイベントが得られた時点で、GPC3標的治療におけるGC33投与による効果がPFSにより評価された。また、副次評価として全生存（OS）が92イベントに到達した時点でのOSにより評価された。その結果、PFS、OS共にGC33投与による延長効果は認められなかった（図１）。また、各GPC3-IHCスコア（複合評価スコア２）での評価においても、いずれのスコアでも延長効果は見られなかった。

[0163] また、GC33投与群においては、本第II相臨床試験におけるGC33血清濃度値を用い得られた集団PKモデルにより第3サイクル・1日目（初回投与開始から4週目）の投与前の血中GC33トラフ値を推定し、トラフ値の中央値であった230 μg/mlをカットオフとし、GC33の暴露が少なかった群（GC33低暴露群）、もしくはGC33の暴露が多かった群（GC33高暴露群）の2群に分け、それぞれの群、もしくはプラセボ群との間で臨床効果の指標としての無増悪生存期間（PFS

）もしくは全生存期間（OS）をカプランマイヤー法により比較した。その結果、PFS、OS共にGC33高暴露群においてプラセボ群、もしくはGC33低暴露群に対しそれぞれ延長効果が見出された（図２）。

[0164] さらに、GC33の効果と関連するバイオマーカー探索を目的に、末梢血中の免疫細胞の測定、免疫細胞上に発現するFcガンマ受容体のタイプIIAもしくはIIIAの遺伝子多型、ならびにGC33投与前の末梢血を用いた抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）を測定し、それぞれPFS、もしくはOSの比較を同様にカプランマイヤー法により行い、log-rank検定を実施した。

実施例 3

[0165] GC33の効果と関連するバイオマーカーとして、各施設で症例より採血された後、通常の方法(自動血球計数機による方法)にて計測された末梢血免疫細胞数と効果との関連性を検討するため、GC33投与前の患者の末梢血中の各種免疫細胞数の中央値をもとに高値群、低値群にわけ、GC33投与群とプラセボ群との間でPFSならびにOSの比較を行った結果、表４に示すように、白血球数、単球、好中球数が高い群で、GC33投与によりプラセボ群よりPFSの延長が認められたのに対し、それぞれの免疫細胞数の低い群（中央値未満）ではそのような効果が認められなかった。特に、好中球に関しては、細胞数が高い群において有意にPFSの延長が認められた（図３）。

[0166] さらに、上記でプラセボ群に対しPFSならびにOSの延長が認められたGC33高暴露群に限定して検討すると、白血球数、単球数、好中球数が高い群（白血球：≧5,680個/μL、単球：≧503個/μL、好中球数：≧3,607個/μL）ではいずれも有意なPFS延長に加え、OSの延長が認められ、さらにリンパ球数に関しても、リンパ球数が高い群（≧1,246個/μL）においてのみ、PFSの延長傾向に加え、OSの有意な延長が認められた（表４）。

[0167]

[表4]

表4. 末梢血免疫細胞数による患者層別におけるGC33の効果

		プラセボ vs. GC33				プラセボ群 vs. GC33 高暴露群			
		PFS		OS		PFS		OS	
		ハザード比	p値 (log-rank)	ハザード比	p値 (log-rank)	ハザード比	p値 (log-rank)	ハザード比	p値 (log-rank)
白血球数	低値	1.130	0.595	0.954	0.864	0.923	0.756	0.612	0.123
	高値	0.752	0.195	0.862	0.583	0.507	0.014	0.461	0.035
単球数	低値	1.172	0.500	0.795	0.411	0.997	0.992	0.513	0.036
	高値	0.709	0.121	0.988	0.964	0.419	0.003	0.544	0.087
好中球数	低値	1.229	0.369	1.004	0.988	1.082	0.754	0.682	0.222
	高値	0.607	0.030	0.796	0.390	0.311	0.000	0.361	0.008
リンパ球数	低値	0.944	0.802	1.063	0.826	0.738	0.240	0.666	0.196
	高値	0.938	0.773	0.759	0.307	0.658	0.128	0.404	0.017

実施例 4

[0168] さらに詳細に各種免疫細胞の同定を行うため、各種免疫細胞表面抗原に対する抗体を用いたFACSを採取された末梢血を用いCovance社にて中央測定が実施された。表５に示すようにリンパ球のマーカーとして、CD19、CD45、CD3、CD4、CD8についてそれぞれに対する抗体と採取された全血を混合し、リンパ球サブセットはTrucount tubes（Becton Dickinson社製）を用い測定し、測定値の中央値で低値群と高値群に分類した結果、GC33投与群とプラセボ群との比較において、CD4陽性T細胞数の高い群（≧490個/μL）で有意にPFSの延長が認められた（図４）。

さらに、CD45陽性細胞数が高い群（≧1,090個/μL）で、OSの延長傾向、CD3陽性T細胞数が高い群（≧752個/μL）で、PFS及びOSの延長傾向、さらにCD4陽性T細胞数が高い群（≧490個/μL）でOSの延長傾向がそれぞれ認められた（表５）。

[0169] GC33高暴露群に限定して検討すると、CD3陽性、CD4陽性細胞数が高い群（CD3：≧752個/μL、CD4：≧490個/μL）、もしくはCD8陽性細胞が低い群（<251個/μL）でのみ、いずれも有意なPFS、OSの延長が認められた（表５）。なお、それ以外の画分では、一部有意な生存期間の延長、もしくは延長効果が見られているが、必ずしも高値群、低値群で一定の強い傾向が得られていな

い。

[0170] [表5]

表5. 末梢血免疫細胞マーカーによる患者層別におけるGC33の効果

		プラセボ vs. GC33				プラセボ群 vs. GC33 高暴露群			
		PFS		OS		PFS		OS	
		ハザード比	p値 (logrank)	ハザード比	p値 (logrank)	ハザード比	p値 (logrank)	ハザード比	p値 (logrank)
CD19+B細胞	低値	0.798	0.353	1.192	0.579	0.647	0.114	0.621	0.212
	高値	0.984	0.941	0.667	0.125	0.746	0.264	0.508	0.032
CD45+リンパ球数	低値	1.072	0.771	1.520	0.139	0.737	0.279	0.783	0.486
	高値	0.780	0.289	0.537	0.040	0.653	0.121	0.430	0.021
CD8+T細胞数	低値	1.103	0.674	1.161	0.578	0.844	0.526	0.715	0.291
	高値	0.760	0.239	0.642	0.155	0.616	0.076	0.462	0.046
CD4+T細胞数	低値	1.273	0.307	1.465	0.173	1.058	0.836	1.045	0.891
	高値	0.635	0.050	0.476	0.013	0.461	0.004	0.235	0.0002
CD8+T細胞数	低値	0.849	0.490	0.924	0.776	0.586	0.052	0.506	0.041
	高値	0.982	0.762	0.779	0.387	0.815	0.451	0.622	0.176

[0171] 続いて、NK細胞に関してより詳細に解析が実施された。上記と同様に患者から採取された末梢血を用い、Convance社にて中央測定された。CD3、CD16、CD56に対する抗体を用いたFACS解析による分類に加え、NKp46、CD8に対する抗体の反応性を含め分類を行った。CD3に対する反応性が陰性の細胞群に関しては、CD16陽性、NKp46陽性に加え、CD56とCD16に対する抗体の反応性を基に、CD56bright NK細胞各分、CD56-/CD16+ NK細胞各分、CD56dim/CD16- NK細胞各分ならびにCD56dim/CD16bright NK細胞各分に分類した。

[0172] それぞれのNK細胞各分におけるGC33投与によるPFS、OSへの影響は表６に示すように、各NK細胞各分の内、CD56-CD16+のNK細胞各分が高い群（≧6.3個/μL）でのみGC33投与による有意なPFSの延長、ならびにOSの延長傾向が確認された（図５）。さらに、GC33高暴露群とプラセボ群を比較した場合に、生存期間の延長効果は顕著であった。なお、それ以外の各分では、一部有意な生存期間の延長、もしくは延長効果が見られているが、必ずしも高値群、低値群で一定の強い傾向が得られていない。

[0173] 各マーカーによる分画に加え、NK細胞上のCD16もしくはNKp46の発現量を同

様にFACS（FACSCanto II、Beckton Diskinson社製）にて測定し、測定結果の中央値をもとに、高発現群と低発現群に分類し、同様にGC33投与、ならびにGC33高暴露におけるPFS、OSをプラセボ群と比較した。それぞれの発現量（可溶性蛍光色素分子等量：mean equivalent soluble fluorescent level (MESF)）は、キャリブレーションビーズ（Quantum MESF bead standard、Banglaboratories社製）の蛍光量を基にMESF標準曲線を作成し、NK細胞画分の蛍光量より発現量（MESF）を算出した。その結果、表６に示すようにCD16の発現量（CD16 MESF）において、発現が高値の群（≧372,254 mesf）においてのみ、GC33投与により有意なPFSの延長、ならびにOSの延長傾向が認められ（図６）、GC33高暴露群とプラセボ群の比較においては、その生存期間延長効果はより顕著であった。

[0174] [表6]

表6. 末梢血NK細胞各種表面マーカーによる患者層別におけるGC33の効果

		プラセボ vs. GC33				プラセボ群 vs. GC33 高暴露群			
		PFS		OS		PFS		OS	
		ハザード比	p値 (log-rank)	ハザード比	p値 (log-rank)	ハザード比	p値 (log-rank)	ハザード比	p値 (log-rank)
CD16+NK細胞数	低値	0.977	0.919	1.043	0.884	0.697	0.183	0.466	0.043
	高値	0.743	0.244	0.727	0.309	0.618	0.101	0.595	0.148
NKp46+NK細胞数	低値	1.095	0.714	1.027	0.926	0.805	0.443	0.613	0.159
	高値	0.768	0.256	0.781	0.401	0.594	0.062	0.502	0.065
CD56brightNK細胞数	低値	0.913	0.706	1.206	0.527	0.709	0.207	0.686	0.286
	高値	0.901	0.658	0.653	0.150	0.641	0.126	0.462	0.041
CD56-CD16+NK細胞数	低値	1.259	0.344	1.173	0.594	0.991	0.975	0.666	0.269
	高値	0.571	0.022	0.615	0.110	0.405	0.002	0.425	0.020
CD56dimCD16-NK細胞数	低値	0.935	0.780	0.932	0.811	0.684	0.166	0.499	0.053
	高値	0.896	0.641	0.860	0.603	0.722	0.248	0.643	0.211
CD56dimCD16brightNK細胞数	低値	0.982	0.937	0.946	0.845	0.688	0.174	0.431	0.024
	高値	0.768	0.288	0.839	0.579	0.645	0.124	0.682	0.290
CD16MESF	低値	1.130	0.612	1.152	0.631	0.908	0.724	0.758	0.421
	高値	0.668	0.101	0.665	0.170	0.473	0.010	0.348	0.005
NKp46 MESF	低値	0.818	0.419	0.958	0.884	0.668	0.144	0.746	0.374
	高値	1.004	0.987	0.781	0.395	0.642	0.133	0.281	0.004

実施例 5

[0175] GC33の作用メカニズムとしてADCCの誘導が報告されている（Ishiguro T. et al., Cancer Res. 2008; 68: 9832-9838）。そこで、GC33投与前の患者のADCC活性を測定し、GC33の効果との関係が検討された。

[0176] GC33もしくはプラセボ投与前に採取した患者の末梢血を用いADCC活性次のように検討した。採血後に液体窒素にて凍結し、-150度で保存した末梢血を融解した後、IL-2（Pepro Tech社製）を含むRPMI II培地（HyClone社製）を加え、一晩培養した1 x 10^5個の末梢単核球にGC33（0.5 μg/mL）ならびにターゲット細胞を加え、37度で1時間培養し、さらにMonensinを加え2時間培養した後、末梢単核球をハーベストし、CD45、CD3、CD16、CD56ならびにCD107に対する抗体混合液を加え、NK細胞におけるCD16発現量、もしくはCD107a発現量をそれぞれFACS（FACSCantII、Beckton Dickinson社製）にて測定した。また、陰性対象としてターゲット細胞のみを加え培養した際のCD107aもしくはCD16の発現量とし、陰性対象との差をADCC活性の指標とした。ターゲット細胞としては、ADCC活性測定用にはGPC3を発現するヒト肝癌細胞株HepG2細胞（ATCC）を、抗体非依存的なNK活性測定用にヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562細胞（ATCC）を用いた。なお、いずれのサンプル調製並びに測定に関してはCovance社にて中央測定が実施された。

CD107aについては中央値（34.15%）より高値のものをADCC高活性群、低値のものをADCC低活性群とし、またCD16は中央値（-64.33%）より低値のものをADCC高活性群、高値のものをADCC低活性群とした。それぞれに関し、同様に高暴露群、低暴露群、プラセボ群とでPFS、OSの比較を行った。その結果、表７に示すように、CD107a、CD16いずれの指標においてもADCC高活性群でのみPFS、OSの有意な延長が認められた（図７、図８）。

[0177] 一方で、K562細胞に対するCD107aもしくはCD16の発現の変化（CD107a変化量中央値：9.74%、CD16変化量中央値：-15.76%）をNK活性として測定したが、ADCCと異なり、NK活性低値群、高値群間いずれかのみで有意なPFSもしくはOSの延長は認められなかった（表７）。

[0178]

[表7]

表7. 投与前末梢血を用いたNK活性、ADCC活性による患者層別におけるGC33の効果

		プラセボ群 vs. GC33 高暴露群			
		PFS		OS	
ADCC 活性		ハザード比	P 値	ハザード比	P 値
CD107a	低	0.536	0.047	0.538	0.124
	高	0.513	0.038	0.303	0.003
CD16	低	0.340	0.001	0.305	0.003
	高	0.813	0.521	0.575	0.182
NK 活性		ハザード比	P 値	ハザード比	P 値
CD107a	低	0.555	0.085	0.338	0.013
	高	0.601	0.127	0.406	0.048
CD16	低	0.506	0.044	0.295	0.013
	高	0.573	0.117	0.390	0.026

実施例 6

[0179] 抗体のFc領域と結合するFcガンマ受容体の遺伝子多型が抗体のFc領域との結合に影響を与えることが知られている。そこで、Fcガンマ受容体タイプIIAならびにIIIAの遺伝子多型との関連性を検討した。患者より採取した末梢血よりゲノム遺伝子を単離し、Fcガンマ領域のタイプIIAの131位のアミノ酸残基に相当する塩基配列、もしくはタイプIIIAの158位のアミノ酸残基に相当する塩基配列の多形が測定された。すなわち、患者より採血した全血よりMagNa Pure LC DNA Isolation kit 1 (Roche Applied Science社製) を用い単離したゲノムDNAを用い、それぞれのSNPsに対応するようにデザインされたTaqMan (登録商標) probeとReal-Time PCRによりgenotypingを行った。

[0180] その結果、FcγRIIIAの158位のアミノ酸残基がValを持つ多型 (V/Vもしくは V/F) とPheのみを持つ多型 (F/F) との間でPFS、OSを高暴露群、低暴露群とプラセボ群それぞれで比較した結果、表８に示すようにGC33高暴露群において、V/VもしくはV/Fを有する群においてPFS、OS共に有意にプラセボ群に対し延長が認められたのに対し、F/Fではそのような効果が認められなかった。

[0181]

[表8]

表8. Fcガンマ受容体の遺伝子多型による患者層別におけるGC33の効果

プラセボ群 vs. GC33 高暴露群				
FcγRIIIA-158	V/V もしくは V/F		F/F	
	ハザード比	P 値	ハザード比	P 値
PFS	0.524	0.016	0.779	0.447
OS	0.442	0.039	0.628	0.288
FcγRIIA-131	H/H もしくは H/R		R/R	
	ハザード比	P 値	ハザード比	P 値
PFS	0.565	0.011	0.948	0.925
OS	0.436	0.009	0.457	0.350

[0182] また、FcγRIIAの131位の遺伝子多型についても同様に検討した。131位のアミノ酸残基がHisを持つ多型（H/HもしくはH/R）とArgのみを持つ多型（R/R）との間でPFS、OSを高暴露群、低暴露群とプラセボ群それぞれで比較した結果、表８に示すようにGC33高暴露群において、H/HもしくはH/Rを有する群においてPFS、OS共に有意にプラセボ群に対し延長が認められたのに対し、R/Rではそのような効果が認められなかった。

[0183] 以上、患者の免疫状態を、末梢血免疫細胞数、ADCC活性、もしくはFcガンマ受容体の遺伝子多型をそれぞれ測定すること、もしくはそれらの組み合わせでGPC3標的治療法の有効性を向上しうることが示された。

実施例 7

[0184] NK細胞上のCD16の発現量（CD16 MESF）に関しては、さらに比例ハザードモデルに基づいたCox回帰を用いた解析が実施された。当該解析においては、実施例5の測定結果をもとに、異なるカットオフ値によってCD16 MESF高値群とCD16 MESF低値群に分類し、各群についてハザード比、95%信頼区間（95% CI）ならびにlog-rank検定のp値を算出した。なお、解析にあたっては全生存期間をレスポンスの変数として用い、臨床的に意義のある背景因子で調整した。

[0185] CD16 MESF値の33%（33パーセンタイル値）であった279,736.9 mesf、50%（50パーセンタイル値）であった363,594 mesf、もしくは67%（33パーセンタイ

ル値）であった439,468.3をカットオフ値とした。そして、各カットオフ値によってそれぞれ低値群と高値群とに分類し、GC33高暴露群におけるハザード比、95%信頼区間およびp値をプラセボ群と比較した。その結果、表９に示すように、CD16 MESF高値群では、CD16 MESF値のカットオフ値が高くなるに従いハザード比が低くなったことから、GC33の臨床有効性とCD16の発現量が関係することが示唆された（表９）。

一方で、CD16 MESF低値群では、CD16のMESF値のカットオフ値の変化とハザード比との間に有意な関係は認められなかった。

[0186] [表9]

表9. CD16のMESF値のカットオフ値とハザード比との関係

CD16 MESF カットオフ値	CD16 MESF 高値群					CD16 MESF 低値群				
	N	ハザード比	95%CI 下限値	95%CI 上限値	*p*値	N	ハザード比	95%CI 下限値	95%CI 上限値	*p*値
33%値	71	0.44	0.22	0.88	0.020	36	1.55	0.38	6.35	0.543
50%値	54	0.33	0.14	0.77	0.011	53	1.46	0.55	4.11	0.459
67%値	36	0.09	0.02	0.44	0.003	71	1.03	0.50	2.12	0.928

[0187] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0188] 本発明は、G PC3標的治療剤療法の有効性向上と、治療を受ける患者のQOL改善に資するものであり、肝癌をはじめとする癌の治療に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 患者における癌に対するGPC3標的治療剤療法の有効性を決定する、または、患者に対するGPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法であって、GPC3標的治療剤療法を受ける前の患者及び/又はGPC3標的治療剤療法を受けた患者から単離された生物学的試料中の、免疫細胞数又は当該細胞上に発現している分子の発現量を測定することを含み、当該免疫細胞数又は当該細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である場合に当該GPC3標的治療剤療法が有効であると決定する、または、当該GPC3標的治療剤療法の継続を決定する方法。

[請求項2] 前記生物学的試料が、患者から単離された末梢血である、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 前記免疫細胞が、白血球、単球、好中球及びリンパ球から選ばれる少なくとも１つの細胞である、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項4] 前記リンパ球が、CD45+リンパ球、CD3+T細胞、CD4+T細胞、及び、CD8+T細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、請求項3に記載の方法。

[請求項5] 前記リンパ球が、CD16+NK細胞、NKp46+NK細胞、、及び、CD56-CD16+NK細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、請求項3に記載の方法。

[請求項6] 前記免疫細胞上に発現している分子が、CD16又はCD107aである、請求項１又は2に記載の方法。

[請求項7] 前記患者が、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する患者である、請求項１から6のいずれかに記載の方法。

[請求項8] 前記癌が肝癌である請求項1から7のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 前記GPC3標的治療剤が、癌患者の血中トラフ値で200μg/ml以上となるように投与される、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

[請求項10] 前記GPC3標的治療剤が、抗GPC3抗体を有効成分として含む治療剤である、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

[請求項11] 前記抗GPC3抗体が、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗体である、請求項10に記載の方法。

[請求項12] 前記抗GPC3抗体が、以下の（１）から（５）のいずれか；

（１）配列番号：４、配列番号：５、および配列番号：６でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：７、配列番号：８、および配列番号：９でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（２）配列番号：１２、配列番号：１３、および配列番号：１４でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：１５、配列番号：１６、および配列番号：１７でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（３）配列番号：２０、配列番号：２１、および配列番号：２２でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：２３、配列番号：２４、および配列番号：２５でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（４）配列番号：２８、配列番号：２９、および配列番号：３０でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３１、配列番号：３２、および配列番号：３３でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；もしくは

（５）配列番号：３６、配列番号：３７、および配列番号：３８でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３９、配列番号：４０、および配列番号：４１でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体である請求項10または11に記載の方法。

[請求項13] 前記抗GPC3抗体が、以下のいずれか；

（１）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５１で表される軽鎖可変領域；

（２）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６１、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：６５、および配列番号：６６で表される軽鎖可変領域の群から選択される軽鎖可変領域；

（３）配列番号：６７で表される重鎖可変領域、および配列番号：６８で表される軽鎖可変領域；

（４）配列番号：６９で表される重鎖可変領域、および配列番号：７０で表される軽鎖可変領域；

（５）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７２で表される軽鎖可変領域；もしくは

（６）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７３で表される軽鎖可変領域；

を含む抗体である請求項10から12のいずれかに記載の方法。

[請求項14] 前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体に細胞傷害性物質が連結された抗体を含む、請求項10に記載の方法。

[請求項15] 免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が所定の値を有する癌患者に投与するためのGPC3標的治療剤。

[請求項16] 免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が、癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に

発現している分子の発現量である、請求項15に記載のGPC3標的治療剤。

[請求項17] 前記生物学的試料が、癌患者から単離された末梢血である、請求項16に記載の治療剤。

[請求項18] 前記免疫細胞が、白血球、単球、好中球及びリンパ球から選ばれる少なくとも１つの細胞である、請求項15から17のいずれかに記載の治療剤。

[請求項19] 前記リンパ球が、CD45+リンパ球、CD3+T細胞、CD4+T細胞、及び、CD8+T細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、請求項18に記載の治療剤。

[請求項20] 前記リンパ球が、CD16+NK細胞、NKp46+NK細胞、、及び、CD56-CD16+NK細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、請求項18に記載の治療剤。

[請求項21] 前記免疫細胞上に発現している分子が、CD16又はCD107aである、請求項15から17のいずれかに記載の治療剤。

[請求項22] 前記患者が、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する患者である、請求項15から21のいずれかに記載の治療剤。

[請求項23] 前記癌患者が肝癌患者である請求項15から22のいずれかに記載の治療剤。

[請求項24] 前記GPC3標的治療剤が、癌患者の血中トラフ値で200μg/ml以上となるように投与される、請求項15から23のいずれかに記載の治療剤。

[請求項25] 前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体を有効成分として含む治療剤である、請求項15から24のいずれかに記載の治療剤。

[請求項26] 前記抗GPC3抗体が、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗体である、請求項25に記載の治療剤。

[請求項27] 前記抗GPC3抗体が、以下の（１）から（５）のいずれか；

（１）配列番号：４、配列番号：５、および配列番号：６でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：７、配列番号：８、および配列番号：９でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（２）配列番号：１２、配列番号：１３、および配列番号：１４でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：１５、配列番号：１６、および配列番号：１７でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（３）配列番号：２０、配列番号：２１、および配列番号：２２でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：２３、配列番号：２４、および配列番号：２５でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（４）配列番号：２８、配列番号：２９、および配列番号：３０でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３１、配列番号：３２、および配列番号：３３でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；もしくは

（５）配列番号：３６、配列番号：３７、および配列番号：３８でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３９、配列番号：４０、および配列番号：４１でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体である請求項25または26に記載の治療剤。

[請求項28] 前記抗GPC3抗体が、以下のいずれか；

（１）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５１で表される軽鎖可変領域；

（２）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６１、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：６５、および配列番号：６６で表される軽鎖可変領域の群から選択される軽鎖可変領域；

（３）配列番号：６７で表される重鎖可変領域、および配列番号：６８で表される軽鎖可変領域；

（４）配列番号：６９で表される重鎖可変領域、および配列番号：７０で表される軽鎖可変領域；

（５）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７２で表される軽鎖可変領域；もしくは

（６）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７３で表される軽鎖可変領域；

を含む抗体である請求項25から27のいずれかに記載の治療剤。

[請求項29] 前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体に細胞傷害性物質が結合された抗体である、請求項25に記載の治療剤。

[請求項30] GPC3標的治療剤療法を受ける前の癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者に投与する旨の指示書を含むGPC3標的治療のための製剤。

[請求項31] GPC3標的治療剤療法を受けた癌患者から単離された生物学的試料中の免疫細胞数又は当該免疫細胞上に発現している分子の発現量が所定の値である患者にさらに投与する旨の指示書を含むGPC3標的治療のための製剤。

[請求項32] 前記生物学的試料が、癌患者から単離された末梢血である、請求項30

又は31に記載の製剤。

[請求項33] 前記免疫細胞が、白血球、単球、好中球及びリンパ球から選ばれる少なくとも１つの細胞である、請求項30から32のいずれかに記載の製剤。

[請求項34] 前記リンパ球が、CD45+リンパ球、CD3+T細胞、CD4+T細胞、及び、CD8+T細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、請求項33に記載の製剤。

[請求項35] 前記リンパ球が、CD16+NK細胞、NKp46+NK細胞、、及び、CD56-CD16+NK細胞から選ばれる少なくとも１つのリンパ球細胞である、請求項33に記載の製剤。

[請求項36] 前記免疫細胞上に発現している分子が、CD16又はCD107aである、請求項30から32のいずれかに記載の製剤。

[請求項37] 前記患者が、FcγRIIIAの158位の少なくとも１つのアミノ酸残基がValである多型及び/又はFcγRIIAの131位の少なくとも１つのアミノ酸残基がHisである多型を有する患者である、請求項30から36のいずれかに記載の製剤。

[請求項38] 前記癌患者が肝癌患者である請求項30から37のいずれかに記載の製剤。

[請求項39] 前記GPC3標的治療剤が、癌患者の血中トラフ値で200μg/ml以上となるように投与される、請求項30から38のいずれかに記載の製剤。

[請求項40] 前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体を有効成分として含む治療剤である、請求項30から39のいずれかに記載の製剤。

[請求項41] 前記抗GPC3抗体が、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗体である、請求項40に記載の製剤。

[請求項42] 前記抗GPC3抗体が、以下の（１）から（５）のいずれか；

（１）配列番号：４、配列番号：５、および配列番号：６でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：７

、配列番号：８、および配列番号：９でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（２）配列番号：１２、配列番号：１３、および配列番号：１４でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：１５、配列番号：１６、および配列番号：１７でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（３）配列番号：２０、配列番号：２１、および配列番号：２２でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：２３、配列番号：２４、および配列番号：２５でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

（４）配列番号：２８、配列番号：２９、および配列番号：３０でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３１、配列番号：３２、および配列番号：３３でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；もしくは

（５）配列番号：３６、配列番号：３７、および配列番号：３８でそれぞれ表される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに配列番号：３９、配列番号：４０、および配列番号：４１でそれぞれ表される軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3；

を含む抗GPC3キメラ抗体またはヒト化抗GPC3抗体である請求項40または41に記載の製剤。

[請求項43] 前記抗GPC3抗体が、以下のいずれか；

（１）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：５１で表される軽鎖可変領域；

（２）配列番号：４４、配列番号：４５、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８、配列番号：４９、および配列番号：５０で表される重鎖可変領域の群から選択される重鎖可変領域、ならびに配

列番号：５２、配列番号：５３、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６、配列番号：５７、配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６１、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４、配列番号：６５、および配列番号：６６で表される軽鎖可変領域の群から選択される軽鎖可変領域；

（３）配列番号：６７で表される重鎖可変領域、および配列番号：６８で表される軽鎖可変領域；

（４）配列番号：６９で表される重鎖可変領域、および配列番号：７０で表される軽鎖可変領域；

（５）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７２で表される軽鎖可変領域；もしくは

（６）配列番号：７１で表される重鎖可変領域、および配列番号：７３で表される軽鎖可変領域；

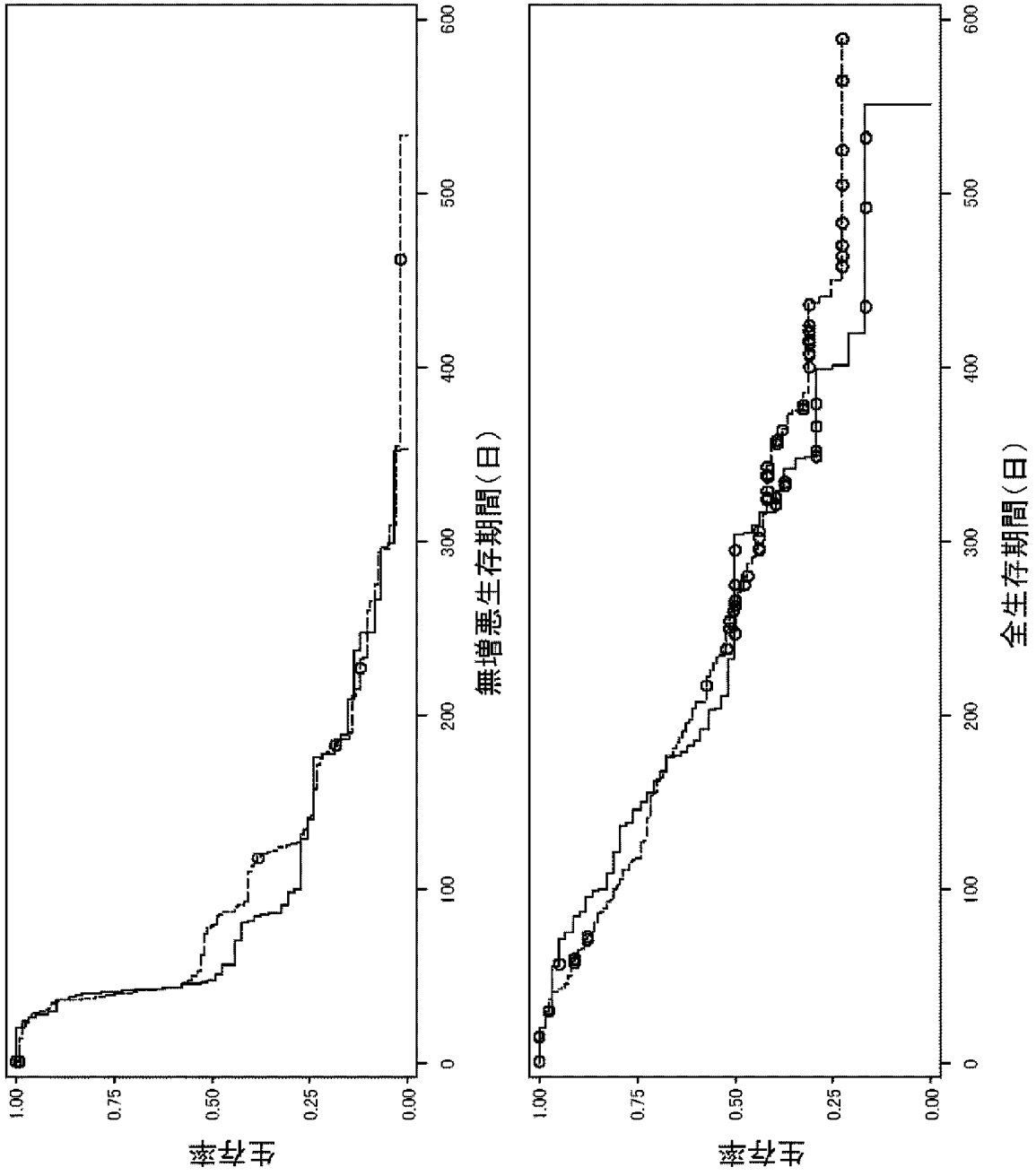
を含む抗体である請求項40から42のいずれかに記載の製剤。

[請求項44] 前記GPC3標的治療剤が抗GPC3抗体に細胞傷害性物質が結合された抗体である、請求項40に記載の製剤。

[請求項45] GPC3標的治療剤を請求項1から請求項14のいずれかに記載の方法によって決定される患者に投与することによる、癌の治療方法。

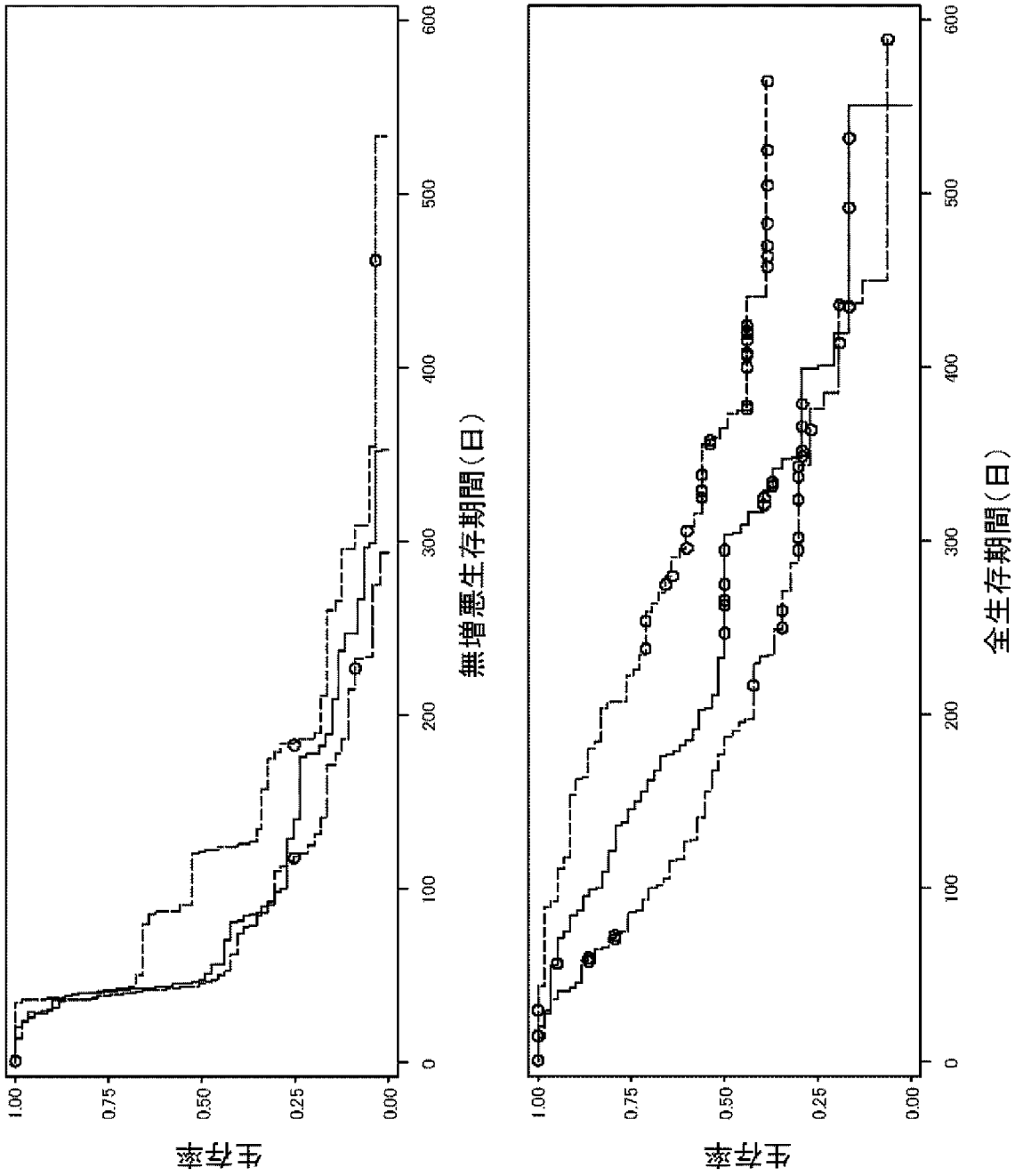
[図1]

図1．カプランマイヤー曲線（PFSならびにOS）



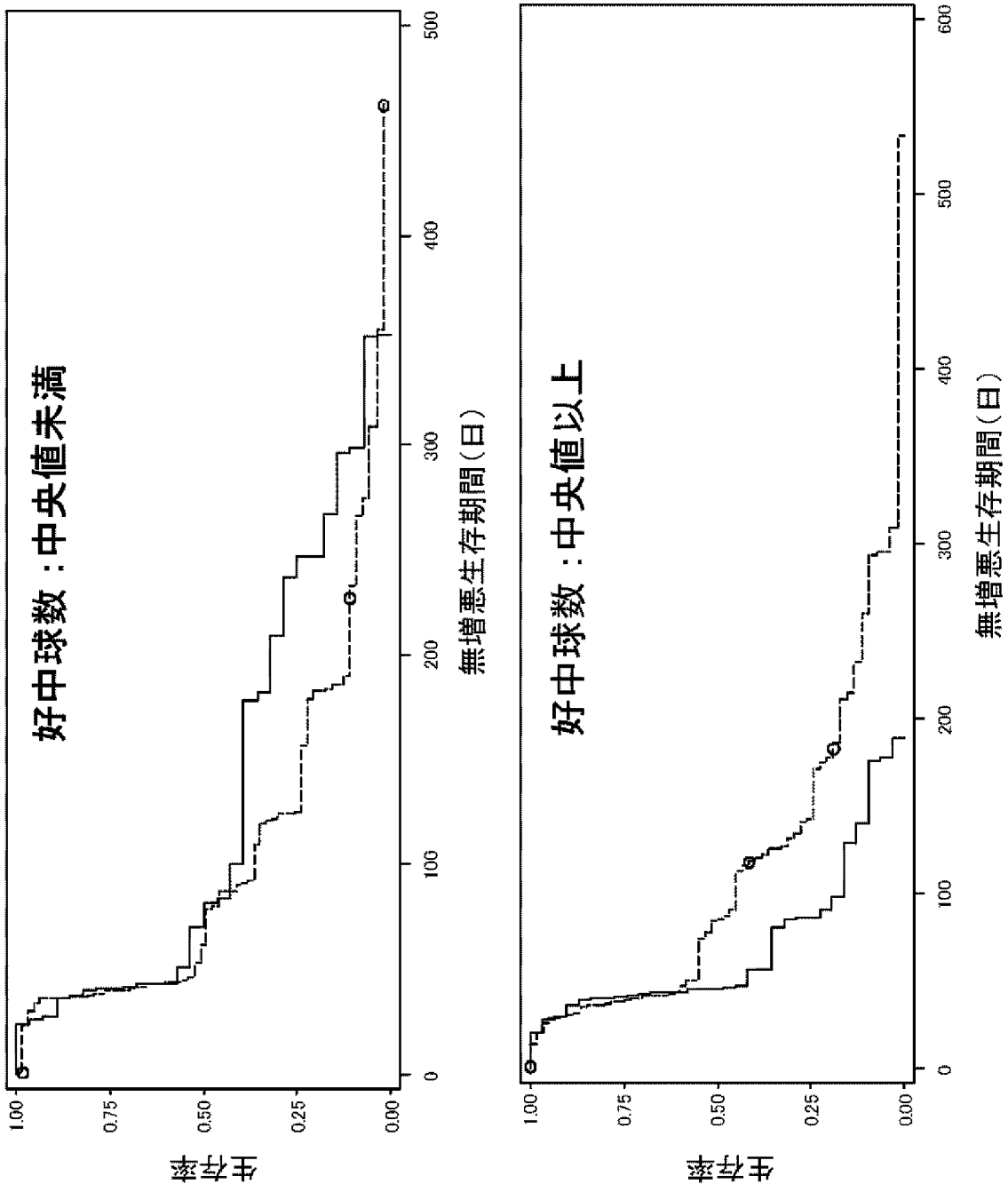
[図2]

図2. GC33暴露による患者層別時のカプランマイヤー曲線（PFSならびにOS）



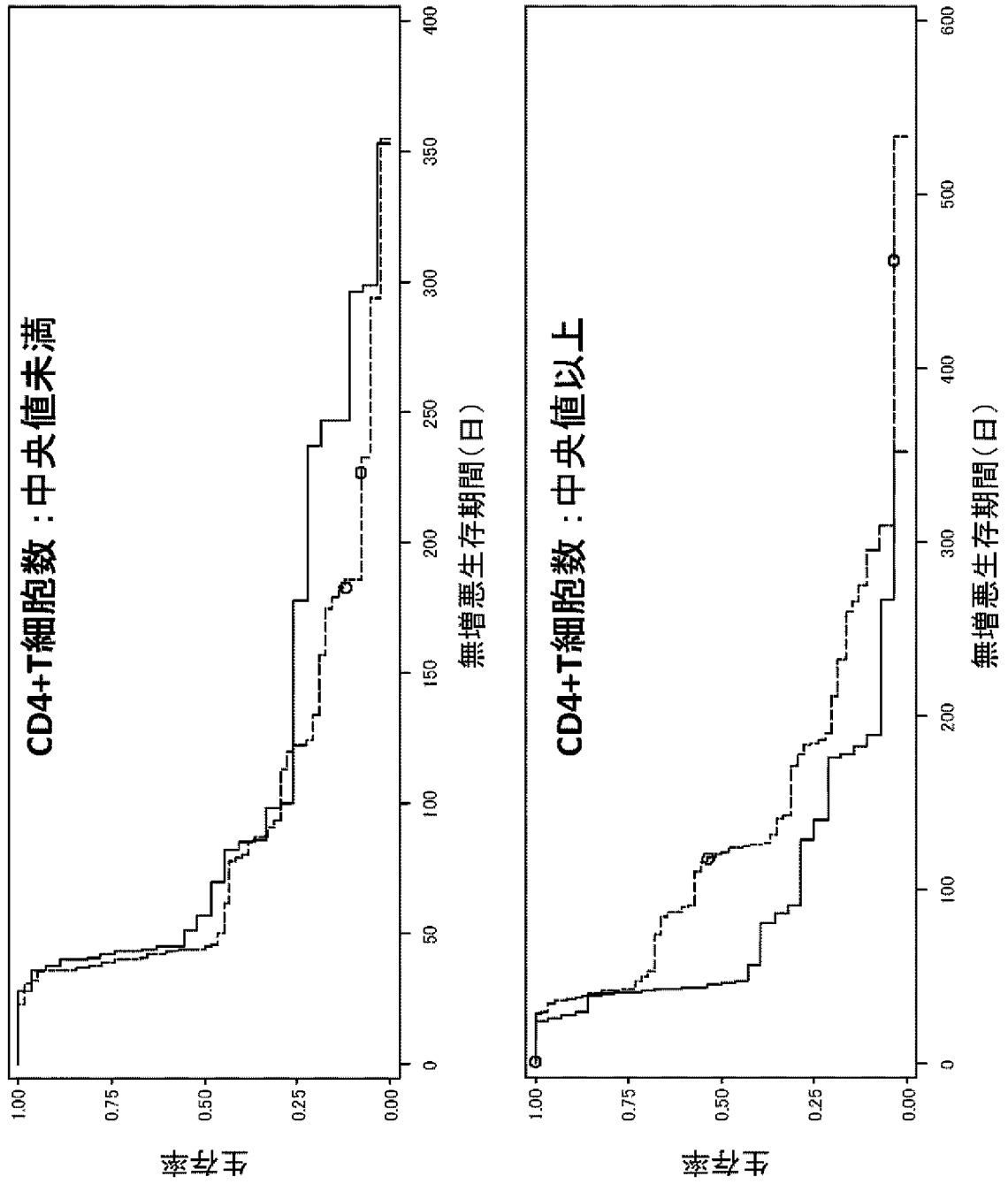
[図3]

図3. 末梢血好中球数による患者層別におけるカプランマイヤー曲線（PFS）



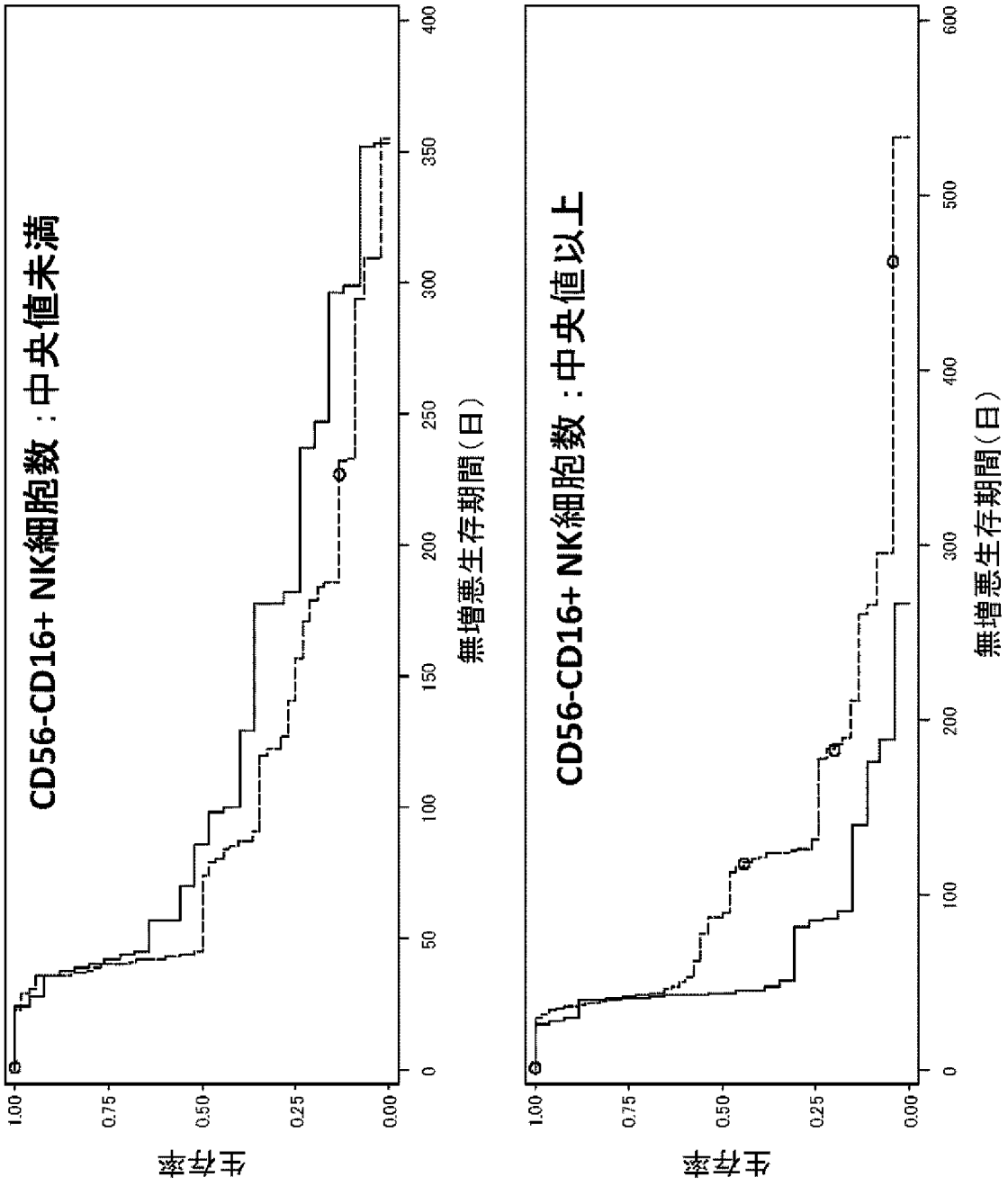
[図4]

図4．未梢血CD4+T細胞数による患者層別におけるカプランマイヤー曲線（PFS）



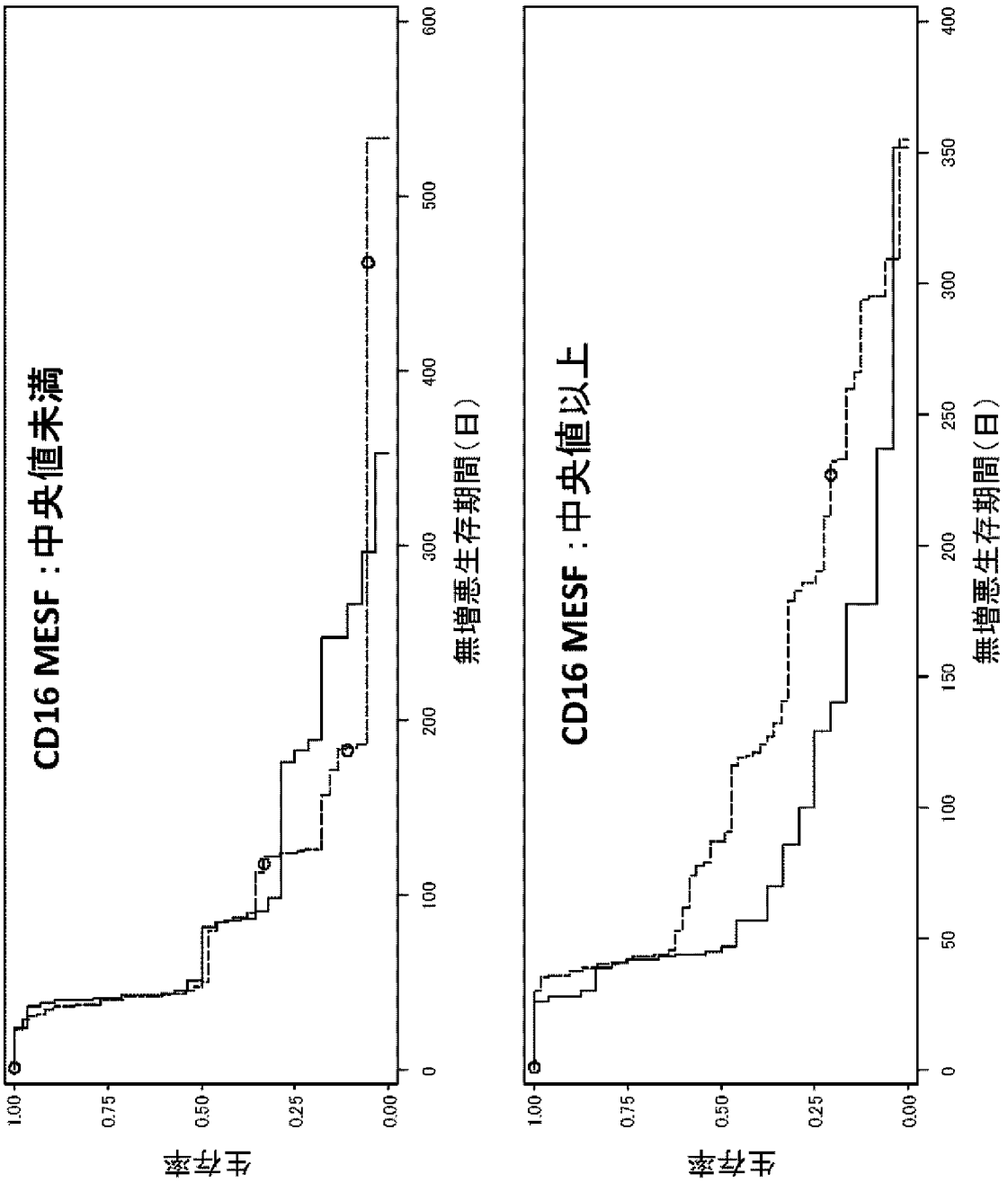
[図5]

図5. 末梢血CD56-CD16+NK細胞数による患者層別におけるカプランマイヤー曲線(PFS)



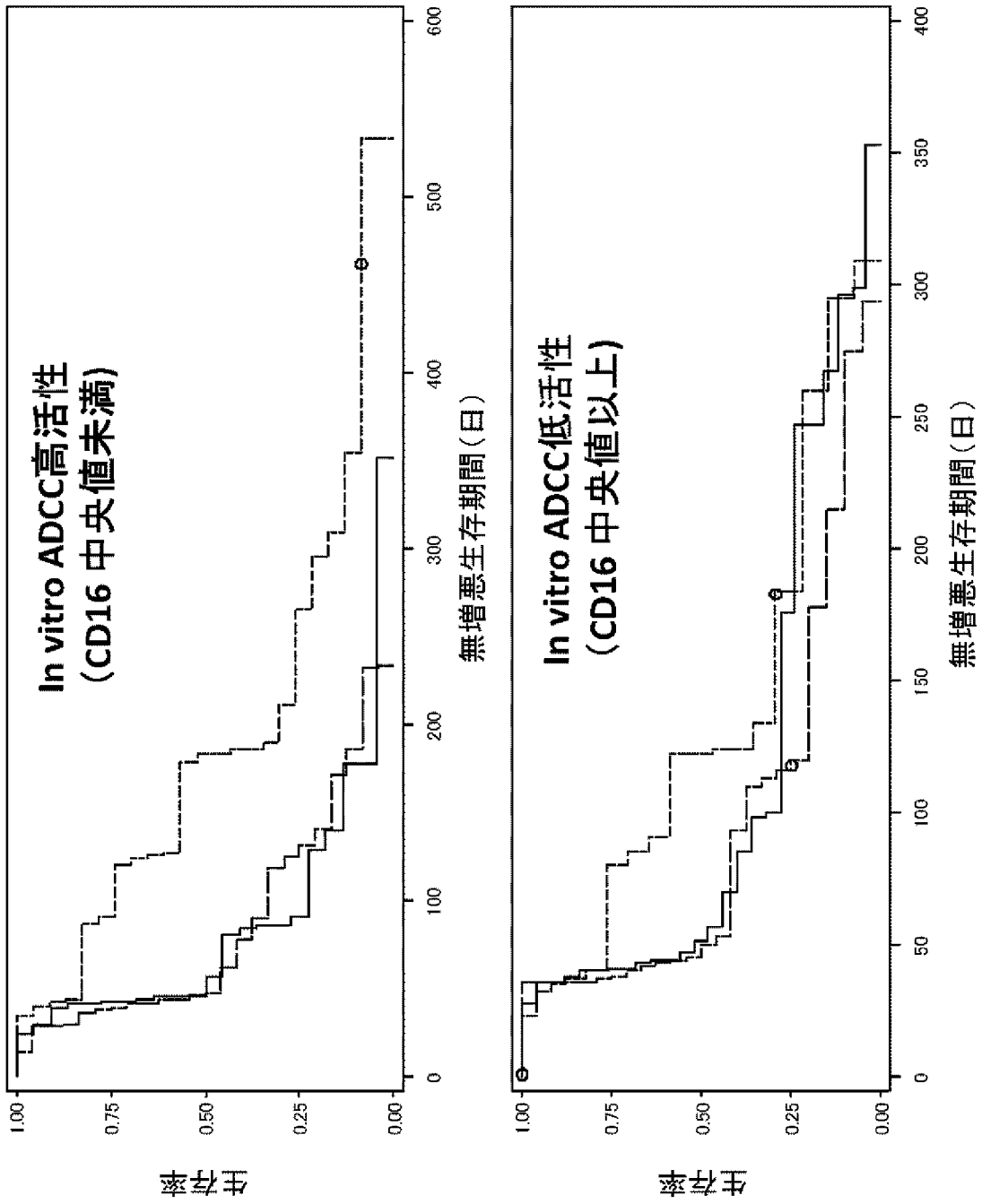
[図6]

図6. 末梢血NK細胞上のCD16発現量(MESF)による患者層別におけるカプラン マイヤー曲線(PFS)



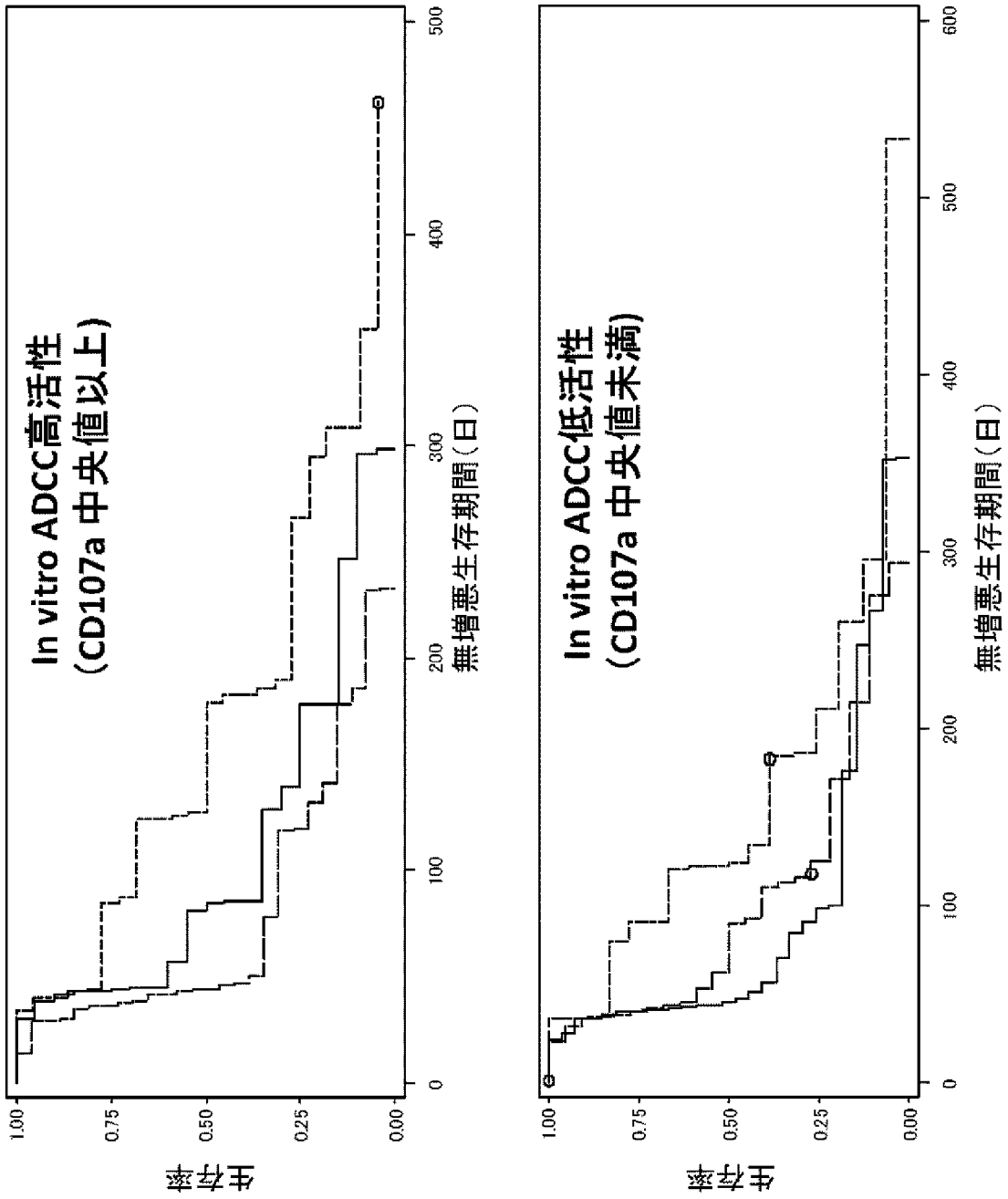
[図7]

図7. ベースライン in vitro ADCC活性（CD16発現）による患者層別におけるカプランマイヤー曲線（PFS）



[図8]

図8. ベースライン in vitro ADCC活性(CD107a発現)による患者層別におけるカプランマイヤー曲線(PFS)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/002352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07K16/28*(2006.01)i, *C12Q1/02*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i

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)
C12N15/00-15/90, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C12Q1/02, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ZHU A.X. et al., First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Clin. Cancer Res., 2013, vol.19, no.4, pp.920-928 (Abstract, Figure, Table)	15-44 1-44
X Y	IKEDA M. et al., Japanese phase I study of GC33, a humanized antibody against glypican-3 for advanced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci., 2014 Apr., vol.105, no.4, pp.455-462 (Abstract, Figure, Table)	15-44 1-44

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 July 2015 (21.07.15)	28 July 2015 (28.07.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/002352

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Mika ENDO, "A novel molecular targeted therapy, humanized anti-glypican 3 antibody (GC33), for the treatment of unresectable hepatocellular cancer", Med. Sci. Digest, 2013, vol.39, no.9, pages 40 to 43 (entire text)	15-44 1-44
Y	WO 2013/127465 A1 (ROCHE GLYCART AG), 06 September 2013 (06.09.2013), claims & JP 2015-511702 A	1-44
Y	WO 2008/032217 A2 (GLYCODE), 20 March 2008 (20.03.2008), claims & US 2010/0167315 A1 & EP 1933137 A1	1-44
Y	FISCHER L. et al., The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. Exp. Hematol., 2006, vol.34, no.6, pp.753-759 (Abstract, Figure)	1-44
Y A	WO 2013/118858 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 August 2013 (15.08.2013), paragraph [0073] & EP 2813568 A1	7,22,37 1-6,8-21, 23-36,38-44
X Y A	Kazuya OFUJI et al., "Kangan no Vaccine Ryoho", Consensus Gan Chiryo, 2013, vol.12, no.2, pages 114 to 116 (page 115)	1-4,8-9, 15-19,23-24, 30-34,38-39 7,22,37 5-6,10-14, 20-21,25-29, 35-36,40-44
A	WO 2006/006693 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 January 2006 (19.01.2006), claims & JP 4011100 B2 & EP 1674111 A1 & US 2007/0190599 A1	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/002352

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.: 45
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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.:

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.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claim 45 pertains to [a method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy] and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／００２３５２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/00-15/90, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C12Q1/02, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	ZHU A.X. et al., First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Clin. Cancer Res., 2013, vol.19, no.4, pp.920-928 (Abstract、Figure、Table)	15-44 1-44

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２１．０７．２０１５	国際調査報告の発送日 ２８．０７．２０１５
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３９６４ 戸来　幸男 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	IKEDA M. et al., Japanese phase I study of GC33, a humanized antibody against glypican-3 for advanced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci., 2014 Apr., vol.105, no.4, pp.455-462 (Abstract、Figure、Table)	15-44 1-44
X Y	遠藤美香, 切除不能肝細胞癌に対する新規分子標的薬としてのヒト化抗グリピカン３抗体（ＧＣ３３）. Med. Sci. Digest, 2013, vol.39, no.9, pp.40-43 (全文)	15-44 1-44
Y	WO 2013/127465 A1 (ROCHE GLYCART AG) 2013.09.06 (Claim) & JP 2015-511702 A	1-44
Y	WO 2008/032217 A2 (GLYCODE) 2008.03.20 (Claim) & US 2010/0167315 A1 & EP 1933137 A1	1-44
Y	FISCHER L. et al., The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. Exp. Hematol., 2006, vol.34, no.6, pp.753-759 (Abstract、Figure)	1-44
Y A	WO 2013/118858 A1 (中外製薬株式会社) 2013.08.15 ([0073]) & EP 2813568 A1	7, 22, 37 1-6, 8-21, 23-36, 38-44
X Y A	大藤和也 外, 肝癌のワクチン療法. コンセンサス癌治療, 2013, vol.12, no.2, pp.114-116 (第 115 頁)	1-4, 8-9, 15-19, 23-24, 30-34, 38-39 7, 22, 37 5-6, 10-14, 20-21, 25-29, 35-36, 40-44
A	WO 2006/006693 A1 (中外製薬株式会社) 2006.01.19 (請求項) & JP 4011100 B2 & EP 1674111 A1 & US 2007/0190599 A1	1-44

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／００２３５２

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　４５　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項４５は［手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法］に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及び［PCT規則39.1(iv)］の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。