



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104871003 B

(45)授权公告日 2019.12.20

(21)申请号 201380067139.1

(22)申请日 2013.12.24

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104871003 A

(43)申请公布日 2015.08.26

(30)优先权数据  
2012-280304 2012.12.21 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.06.19

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2013/007529 2013.12.24

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/097648 JA 2014.06.26

(73)专利权人 中外制药株式会社  
地址 日本东京都

(72)发明人 大友俊彦 天野润 中村己贵子

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

代理人 杨宏军 牛蔚然

(51)Int.Cl.  
G01N 33/574(2006.01)  
A61K 39/395(2006.01)  
A61K 45/00(2006.01)  
A61P 1/16(2006.01)  
A61P 35/00(2006.01)  
G01N 33/48(2006.01)  
G01N 33/53(2006.01)  
C07K 16/30(2006.01)

(56)对比文件  
CN 102046200 A,2011.05.04,权利要求1-116,实施例1.  
WO 2005/106485 A1,2005.11.10,全文.  
CN 101377506 A,2009.03.04,说明书第1页第3-4段,实施例1.

审查员 陈伟潘

权利要求书3页 说明书58页  
序列表47页 附图11页

(54)发明名称  
用于向GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者施  
予的GPC3靶向治疗剂

(57)摘要

本发明公开了一种针对接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者确定GPC3靶向治疗剂疗法对所述患者或患者的癌症的有效性的方法、或确定是否继续对患者实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法,所述方法包括监测生物学试样中的游离GPC3浓度,所述生物学试样是从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者和/或接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的,所述方法中,该游离GPC3浓度为规定值时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的,或者确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。此外,还公开了GPC3靶向治疗剂或制剂,用于向已确定GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者、或已确

定继续实施GPC3靶向治疗剂疗法的患者进一步施予。

1. 用于检测生物学试样中游离GPC3浓度的试剂用于制造在下述方法中使用的试剂的用途,所述方法是确定GPC3靶向治疗剂疗法对人类患者的肝癌的有效性的方法,

其中,监测从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的人类患者分离的人类生物学试样中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度与在开始GPC3靶向治疗剂疗法之前从该人类患者分离的人类生物学试样中的游离GPC3浓度相比有所增大时,确定为该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

2. 如权利要求1所述的用途,其中,所述游离GPC3浓度采用免疫学方法进行测定。

3. 如权利要求1所述的用途,其中,所述人类患者是GPC3的组织免疫染色评分显示高度表达的人类患者。

4. 如权利要求1所述的用途,其中,所述GPC3靶向治疗剂以使人类肝癌患者的所述GPC3靶向治疗剂的血中谷值为 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上的量被施予。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的用途,其中,所述GPC3靶向治疗剂是包含抗GPC3抗体作为有效成分的治疗剂。

6. 如权利要求5所述的用途,其中,所述抗GPC3抗体是具有抗体依赖性细胞损伤(ADCC)活性和/或补体依赖性细胞损伤(CDC)活性的抗体。

7. 如权利要求1所述的用途,其中,所述方法是还进一步确定是否继续对人类患者的肝癌实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法,其中,该游离GPC3浓度与在开始GPC3靶向治疗剂疗法之前从该人类患者分离的人类血浆试样或血清试样中的游离GPC3浓度相比有所增大时,确定为该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的、并进一步确定为对人类患者的肝癌继续实施GPC3靶向治疗剂疗法。

8. 如权利要求5所述的用途,其中,所述抗GPC3抗体为包含下述(1)~(5)中的任一抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体,

(1) 分别如序列号4、序列号5、及序列号6所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号7、序列号8、及序列号9所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;

(2) 分别如序列号12、序列号13、及序列号14所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号15、序列号16、及序列号17所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;

(3) 分别如序列号20、序列号21、及序列号22所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号23、序列号24、及序列号25所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;

(4) 分别如序列号28、序列号29、及序列号30所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号31、序列号32、及序列号33所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;或

(5) 分别如序列号36、序列号37、及序列号38所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号39、序列号40、及序列号41所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。

9. 如权利要求5所述的用途,其中,所述抗GPC3抗体为包含下述下述(1)~(6)中的任一抗体,

(1) 选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区的组中的重链可变区,以及序列号51表示的轻链可变区;

(2) 选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及选自序列号52、序列号53、序列号54、序列号55、序列号56、序列号57、序列号58、序列号59、序列号60、序列号61、序列号62、序列号63、序列号64、序列号65、及序列号66表示的轻链可变区组中的轻链可变区;

- (3) 序列号67表示的重链可变区,及序列号68表示的轻链可变区;
- (4) 序列号69表示的重链可变区,及序列号70表示的轻链可变区;
- (5) 序列号71表示的重链可变区,及序列号72表示的轻链可变区;或
- (6) 序列号71表示的重链可变区,及序列号73表示的轻链可变区。

10. 如权利要求5所述的用途,其中,所述GPC3靶向治疗剂包含在抗GPC3抗体上连接细胞损伤性物质而得的抗体。

11. GPC3靶向治疗剂在用于制造下述医药品中的用途,所述医药品是用于在确定为该GPC3靶向治疗剂疗法对人类肝癌患者有效后再进一步施予的医药品,其中,从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的所述人类患者分离的人类血浆试样或血清试样中的游离GPC3浓度在接受过GPC3靶向治疗剂疗法后增大的情况下,确定为该GPC3靶向治疗剂疗法对所述人类患者有效。

12. 如权利要求11所述的用途,其中,所述游离GPC3浓度采用免疫学方法进行测定。

13. 如权利要求11所述的用途,其中,所述人类患者是GPC3的组织免疫染色评分显示高度表达的人类患者。

14. 如权利要求11所述的用途,其中,所述GPC3靶向治疗剂以使人类肝癌患者的所述GPC3靶向治疗剂的血中谷值为200 $\mu$ g/ml以上的量被施予。

15. 如权利要求11所述的用途,其中,所述GPC3靶向治疗剂是包含抗GPC3抗体作为有效成分的治疗剂。

16. 如权利要求15所述的用途,其中,所述抗GPC3抗体是具有抗体依赖性细胞损伤(ADCC)活性和/或补体依赖性细胞损伤(CDC)活性的抗体。

17. 如权利要求15所述的用途,其中,所述抗GPC3抗体为包含下述(1)~(5)中的任一的抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体,

(1) 分别如序列号4、序列号5、及序列号6所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号7、序列号8、及序列号9所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;

(2) 分别如序列号12、序列号13、及序列号14所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号15、序列号16、及序列号17所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;

(3) 分别如序列号20、序列号21、及序列号22所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号23、序列号24、及序列号25所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;

(4) 分别如序列号28、序列号29、及序列号30所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号31、序列号32、及序列号33所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;或

(5) 分别如序列号36、序列号37、及序列号38所示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及分别如序列号39、序列号40、及序列号41所示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。

18. 如权利要求17所述的用途,其中,所述抗GPC3抗体为包含下述(1)~(6)中的任一的抗体,

(1) 选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及序列号51表示的轻链可变区;

(2) 选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及选自序列号52、序列号53、序列号54、序列号55、序列号56、序列号57、序列号58、序列号59、序列号60、序列号61、序列号62、序列号63、序列号

64、序列号65、及序列号66表示的轻链可变区组中的轻链可变区；

- (3) 序列号67表示的重链可变区,及序列号68表示的轻链可变区；
- (4) 序列号69表示的重链可变区,及序列号70表示的轻链可变区；
- (5) 序列号71表示的重链可变区,及序列号72表示的轻链可变区；或
- (6) 序列号71表示的重链可变区,及序列号73表示的轻链可变区。

19. 如权利要求17所述的用途,其中,所述GPC3靶向治疗剂为在抗GPC3抗体上连接细胞损伤性物质而得的抗体。

## 用于向GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者施予的GPC3靶向治疗剂

### 技术领域

[0001] 本发明提供一种确定GPC3靶向治疗剂疗法对患者的癌症的有效性、或确定是否继续对患者实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法,以及用于向已确定GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者、或已确定继续实施GPC3靶向治疗剂疗法的患者进一步施予的GPC3靶向治疗剂或制剂。

### 背景技术

[0002] 有报道称,由肝细胞癌引起的死亡全年约有60万,在世界由癌症引起的死亡中位居第五位(非专利文献1)。大部分肝细胞癌患者在诊断为该疾病后1年以内死亡。不幸的是,经常出现在能够治愈的疗法不怎么奏效的后期阶段被诊断出肝细胞癌的例子。包括化学疗法、化学栓塞术、烧灼和质子束疗法在内的医疗处置对上述患者的效果依然不充分。大多数患者表现出疾病复发,该情况伴随血管浸润及多部位肝内转移迅速发展至进行阶段,其5年存活率仅为7%(非专利文献2)。可实施局部癌切除手术的肝细胞癌患者的预后较好,但其5年存活率仍停留在15%~39%(非专利文献3)。本技术领域,要求开发出针对上述恶性疾病即肝细胞癌的新型疗法。

[0003] 有报道称,在日本,肝细胞癌占原发性肝癌的90%以上。作为针对如此的肝细胞癌的内科治疗方法,例如可以采用TAE(经导管动脉栓塞术(transcatheter arterial embolization)),即,使用化疗剂,将油性造影剂(Lipiodol)、抗癌剂和栓塞物质(Gelfoam)混和后注入肝动脉(其会成为对肿瘤的营养供给通路),将营养动脉阻塞,由此选择性地导致肝细胞癌坏死的治疗方法,除此以外,也可以采用经皮乙醇注入法、经皮微波凝固疗法、无线电波烧灼疗法等带有侵害的方法。此外,作为将化疗剂单独使用或与IFN(干扰素)合并使用进行治疗的方法,已进行了全身化学疗法的临床试验,所述化疗剂为5-FU(氟尿嘧啶)、UFT(尿嘧啶和替加氟(Tegafur))、MMC(丝裂霉素C)、DHAD(米托蒽醌)、ADR(阿霉素)、EPI(表阿霉素)、CDDP(顺铂)等(非专利文献4)。

[0004] 在上述研究过程中,口服活性型的索拉非尼(Sorafenib)(Nexavar, BAY43-9006)已得到认可,其在Raf激酶的阶段抑制Raf/MEK/ERK信号转导,从而阻断癌细胞的增殖,并且将VEGFR-2、VEGFR-3及PDGFR- $\beta$ 酪氨酸激酶作为靶标,从而发挥抗血管形成效果,与上述化疗剂相比显示出了更有利的效果。针对索拉非尼的有效性,在两个以进行性肝细胞癌为对象的III期多中心共同安慰剂对照比较试验(SHARP试验及亚洲·太平洋地区实施的试验)中进行了研究。在上述任一试验中,均确认到了生存期的延长,且HR为0.68。SHARP试验中,生存期从7.9个月延长至10.7个月。另一方面,在亚洲的试验中,生存期从4.2个月延长至6.5个月。但是,客观奏效率低,虽然到图像上的肿瘤发展之前的期间有所延长(在欧美的试验中从2.8个月延长至5.5个月,在亚洲的试验中从1.4个月延长至2.8个月),但并未确认到到症状恶化之前的期间的延长。亚洲人群组中的生存延长期短,认为其原因是:与欧美相比,亚洲地区在疾病过程的稍晚时期开始治疗(非专利文献5、6)。

[0005] 通常,伴随肝癌的进展,可观察到伴有肝功能障碍的肝癌特有的症状,如食欲不振、体重减少、全身倦怠感、可触知的右季肋部肿瘤、右季肋部痛、腹部膨满感、发热、黄疸等。然而,索拉非尼等化疗剂存在下述必须克服的问题,即,还会并发化疗剂固有的副作用,如腹泻或便秘、贫血、引起(致死性的严重程度的)感染及败血症程度的免疫系统的抑制、出血、心毒性、肝毒性、肾毒性、食欲不振、体重减少等。

[0006] 通常,在初期观察不到肝癌的特别的初期症状,但伴随肝癌的进展,可观察到伴有肝功能障碍的肝癌特有的症状,如食欲不振、体重减少、全身倦怠感、可触知的右季肋部肿瘤、右季肋部痛、腹部膨满感、发热、黄疸等。在临床上观察到这些症状会因使用上述化疗剂而加剧。例如,关于检测出肝癌细胞的患者的食欲不振、及伴随食欲不振或与其相独立地产生的体重减少等症状,通过对该患者施予化疗剂,与不施予化疗剂相比,有时会加剧。出现上述那样的症状时,有时不得不停止使用该化疗剂,上述症状的加剧成为妨碍利用化疗剂进行治疗的主要原因。因此,从治疗效果的提高、接受治疗的患者的QOL改善等观点来看,要求确立更优异的治疗方法。

[0007] 由于磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)在肝癌中频繁地高度表达,所以认为GPC3能用作确定GPC3在肝癌中的作用的靶标、肝癌治疗的靶标或肝癌诊断的靶标。

[0008] 在上述情况下,开展了对将GPC3作为肝癌治疗的靶标的治疗剂的开发。开发出了一种含有抗GPC3抗体作为有效成分的肝癌治疗剂,所述抗GPC3抗体对表达GPC3的细胞具有抗体依赖性细胞损伤(Antibody-dependent cellular cytotoxicity,以下记为“ADCC”)活性和/或补体依赖性细胞损伤(Complement-dependent cytotoxicity,以下记为“CDC”)活性(专利文献1)。此外,开发出了含有人源化抗GPC3抗体作为有效成分的GPC3靶向治疗剂,所述人源化抗GPC3抗体具有ADCC活性及CDC活性(专利文献2)。进而,除含有ADCC活性被增强了的人源化抗GPC3抗体的GPC3靶向治疗剂(专利文献3、4)以外,还开发出了含有具有ADCC活性及CDC活性、且血浆中的动态被改善了的抗GPC3抗体的GPC3靶向治疗剂(专利文献5)。此外,还表达了通过上述抗GPC3抗体与索拉非尼等化疗剂的并用疗法,能够减弱利用索拉非尼等化疗剂的单独疗法所带来的副作用等,并且显示出由两种药剂产生的协同效果(专利文献6),从治疗效果的提高、接受治疗的患者的QOL改善等观点来看,以GPC3靶向治疗剂为核心的更优异的肝癌治疗方法不断确立。

[0009] 另一方面,还开展了对将GPC3作为肝癌诊断的靶标的诊断方法的开发。已知GPC3在向细胞表面表达的过程中或在表达之后,在该特定部位通过转化酶、磷脂酶D、Notum或未确定的机制受到加工(非专利文献7、8)。通过利用上述现象,已开发了含有下述抗体的肝癌的诊断药物或诊断方法,所述抗体是存在于患者的血浆中的、与经加工后被分泌至血浆中的可溶型GPC3的表位相结合的抗体(专利文献7)。此外,已开发了含有下述抗体的肝癌的诊断药物或诊断方法,所述抗体是存在于从患者分离的组织标本等中的、与经加工后仍存在于细胞表面的锚定型GPC3的表位相结合的抗体(专利文献8)。然而,上述诊断药物或诊断方法是检测受试患者中的肝癌的存在的方法,对于确定GPC3靶向治疗剂疗法在接受过该疗法的患者中的有效性的方法、或确定是否继续对该患者实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法,尚未可知。

[0010] 本说明书中引用的参考文献如下所述。这些文献中记载的内容全部通过引用并入本说明书中。需要说明的是,对于本说明书而言,这些文献中的任一篇均不是现有技术。

- [0011] 现有技术文献
- [0012] 专利文献
- [0013] 专利文献1:W02003/000883
- [0014] 专利文献2:W02006/006693
- [0015] 专利文献3:W02006/046751
- [0016] 专利文献4:W02007/047291
- [0017] 专利文献5:W02009/041062
- [0018] 专利文献6:W02009/122667
- [0019] 专利文献7:W02004/038420
- [0020] 专利文献8:W02009/116659
- [0021] 非专利文献
- [0022] 非专利文献1:Llovet JM,Burroughs A,Bruix J;Lancet (2003) ,362,1907-17
- [0023] 非专利文献2:Bosch FX,Ribes J,Cleries R;Gastroenterology (2004) ,127,S5-16
- [0024] 非专利文献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
- [0025] 非专利文献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
- [0026] 非专利文献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
- [0027] 非专利文献6:Cheng AL,Chen Z,Tsao CJ,Qin S,Kim JS,et al.Efficacy and safety of sofebanib 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
- [0028] 非专利文献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
- [0029] 非专利文献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

## 发明内容

[0030] 本发明是鉴于上述情况而完成的,其目的在于提供确定GPC3靶向治疗剂疗法在接受过该疗法的患者中的有效性的方法、或确定是否继续对该患者实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法。本发明的目的还在于,一并提供用于向已确定GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者、或已确定继续实施GPC3靶向治疗剂疗法的患者进一步施予的GPC3靶向治疗剂或制剂。

[0031] 在如上所述的情况下,本申请的发明人进行了锐意研究,结果开发出了下述方法:对从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度进行监测,当该游离GPC3浓度为规定值时,或在接受过GPC3靶向治疗剂疗法后该游离GPC3浓度增大时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的,或者确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法的方法。此外,还开发出了GPC3靶向治疗剂或制剂,用于向已确定GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者、或已确定继续实施GPC3靶向治疗剂疗法的患者进一步施予。基于现有知识,也可推测当GPC3靶向治疗剂疗法反倒有效时,血浆中检测到的游离GPC3的浓度将随着治疗的继续而经时性地减少。然而,令人惊异的是,发明人发现,从表现为稳定(Stable disease)(即,有对GPC3靶向治疗剂疗法作出反应的可能性)的患者分离的血浆中的游离GPC3浓度稳定或有所增加,而非减少。

[0032] 更具体而言,提供下述发明。

[0033] 提供:

[0034] (1)确定GPC3靶向治疗剂疗法对患者的癌症的有效性、或确定是否继续对患者实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法,所述方法包括监测从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者和/或接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度,所述方法中,该游离GPC3浓度为规定值时,确定为该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的,或者确定为继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法;

[0035] (2)如(1)所述的方法,其中,所述游离GPC3浓度是从患者分离的全血试样、血浆试样或血清试样中的浓度;

[0036] (3)如(2)所述的方法,其中,所述从患者分离的生物学试样中的所述游离GPC3浓度是血浆试样或血清试样中的浓度;

[0037] (4)如(1)~(3)中任一项所述的方法,其中,所述游离GPC3的规定值为0.1ng/mL~100ng/mL的范围;

[0038] (5)如(1)~(4)中任一项所述的方法,其中,所述游离GPC3浓度采用免疫学方法进行测定;

[0039] (6)如(1)~(5)中任一项所述的方法,其中,所述游离GPC3浓度与在开始GPC3靶向治疗剂疗法之前从该患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度相比有所增大;

[0040] (7)如(1)~(6)中任一项所述的方法,其中,所述患者是GPC3的组织免疫染色评分显示高度表达的患者;

[0041] (8)如(1)~(7)中任一项所述的方法,其中,所述癌为肝癌;

[0042] (9)如(1)~(8)中任一项所述的方法,其中,所述GPC3靶向治疗剂以使癌患者的血中谷值成为200 $\mu$ g/ml以上的方式被施予;

[0043] (10)如(1)~(9)中任一项所述的方法,其中,所述GPC3靶向治疗剂是包含抗GPC3抗体作为有效成分的治疗剂;

[0044] (11)如(10)所述的方法,其中,所述抗GPC3抗体是具有抗体依赖性细胞损伤(ADCC)活性和/或补体依赖性细胞损伤(CDC)活性的抗体;

[0045] (12)如(10)或(11)所述的方法,其中,所述抗GPC3抗体为抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体,所述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体包含下述(1)~(5)中的任一方,

[0046] (1)序列号4、序列号5、及序列号6各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以

及序列号7、序列号8、及序列号9各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0047] (2) 序列号12、序列号13、及序列号14各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3，以及序列号15、序列号16、及序列号17各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0048] (3) 序列号20、序列号21、及序列号22各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3，以及序列号23、序列号24、及序列号25各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0049] (4) 序列号28、序列号29、及序列号30各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3，以及序列号31、序列号32、及序列号33各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；或

[0050] (5) 序列号36、序列号37、及序列号38各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3，以及序列号39、序列号40、及序列号41各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0051] (13) 如(10)~(12)中任一项所述的方法，其中，所述抗GPC3抗体为包含下述任一方的抗体，

[0052] (1) 选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区，以及序列号51表示的轻链可变区；

[0053] (2) 选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区，以及选自序列号52、序列号53、序列号54、序列号55、序列号56、序列号57、序列号58、序列号59、序列号60、序列号61、序列号62、序列号63、序列号64、序列号65、及序列号66表示的轻链可变区组中的轻链可变区；

[0054] (3) 序列号67表示的重链可变区、及序列号68表示的轻链可变区；

[0055] (4) 序列号69表示的重链可变区、及序列号70表示的轻链可变区；

[0056] (5) 序列号71表示的重链可变区、及序列号72表示的轻链可变区；或

[0057] (6) 序列号71表示的重链可变区、及序列号73表示的轻链可变区；

[0058] (14) 如(10)所述的方法，其中，所述GPC3靶向治疗剂包含在抗GPC3抗体上连接细胞损伤性物质而得的抗体；

[0059] (15) GPC3靶向治疗剂，用于向从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者施予；

[0060] (16) GPC3靶向治疗剂，用于向从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者进一步施予；

[0061] (17) 如(15)或(16)所述的治疗剂，其中，所述游离GPC3浓度是从癌患者分离的全血试样、血浆试样或血清试样中的浓度；

[0062] (18) 如(17)所述的治疗剂，其中，所述从癌患者分离的生物学试样中的所述游离GPC3浓度为血浆试样或血清试样中的浓度；

[0063] (19) 如(15)~(18)中任一项所述的治疗剂，其中，所述游离GPC3的规定值为0.1ng/mL~60ng/mL的范围；

[0064] (20) 如(15)~(19)中任一项所述的治疗剂，其中，所述游离GPC3浓度采用免疫学方法进行测定；

[0065] (21) 如(15)~(20)中任一项所述的治疗剂，其中，在接受过GPC3靶向治疗剂疗法后，所述游离GPC3浓度增大；

[0066] (22) 如(15)~(21)中任一项所述的治疗剂，其中，所述患者是GPC3的组织免疫染色评分显示高度表达的患者；

- [0067] (23)如(15)~(22)中任一项所述的治疗剂,其中,所述癌患者为肝癌患者;
- [0068] (24)如(15)~(23)中任一项所述的治疗剂,其中,所述GPC3靶向治疗剂以使癌患者的血中谷值成为200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上的方式被施予;
- [0069] (25)如(15)~(24)中任一项所述的治疗剂,其中,所述GPC3靶向治疗剂是包含抗GPC3抗体作为有效成分的治疗剂;
- [0070] (26)如(25)所述的治疗剂,其中,所述抗GPC3抗体是具有抗体依赖性细胞损伤(ADCC)活性和/或补体依赖性细胞损伤(CDC)活性的抗体;
- [0071] (27)如(25)或(26)所述的治疗剂,其中,所述抗GPC3抗体为抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体,所述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体包含下述(1)~(5)中的任一方,
- [0072] (1)序列号4、序列号5、及序列号6各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号7、序列号8、及序列号9各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;
- [0073] (2)序列号12、序列号13、及序列号14各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号15、序列号16、及序列号17各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;
- [0074] (3)序列号20、序列号21、及序列号22各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号23、序列号24、及序列号25各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;
- [0075] (4)序列号28、序列号29、及序列号30各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号31、序列号32、及序列号33各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;或
- [0076] (5)序列号36、序列号37、及序列号38各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号39、序列号40、及序列号41各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3;
- [0077] (28)如(25)~(27)中任一项所述的治疗剂,其中,所述抗GPC3抗体为包含下述任一方的抗体,
- [0078] (1)选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及序列号51表示的轻链可变区;
- [0079] (2)选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及选自序列号52、序列号53、序列号54、序列号55、序列号56、序列号57、序列号58、序列号59、序列号60、序列号61、序列号62、序列号63、序列号64、序列号65、及序列号66表示的轻链可变区组中的轻链可变区;
- [0080] (3)序列号67表示的重链可变区、及序列号68表示的轻链可变区;
- [0081] (4)序列号69表示的重链可变区、及序列号70表示的轻链可变区;
- [0082] (5)序列号71表示的重链可变区、及序列号72表示的轻链可变区;或
- [0083] (6)序列号71表示的重链可变区、及序列号73表示的轻链可变区;
- [0084] (29)如(25)所述的治疗剂,其中,所述GPC3靶向治疗剂为在抗GPC3抗体上连接细胞损伤性物质而得的抗体;
- [0085] (30)用于GPC3靶向治疗的制剂,所述制剂包含记载下述内容的指示书,所述内容为:向从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者施予;
- [0086] (31)用于GPC3靶向治疗的制剂,所述制剂包含记载下述内容的指示书,所述内容为:向从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定

值的患者进一步施予；

[0087] (32)如(30)或(31)所述的制剂,其中,所述游离GPC3浓度是从癌患者分离的全血试样、血浆试样或血清试样中的浓度；

[0088] (33)如(32)所述的制剂,其中,所述从癌患者分离的生物学试样中的所述游离GPC3浓度为血浆试样或血清试样中的浓度；

[0089] (34)如(30)~(33)中任一项所述的制剂,其中,所述游离GPC3的规定值为0.1ng/mL~100ng/mL的范围；

[0090] (35)如(30)~(34)中任一项所述的制剂,其中,所述游离GPC3浓度采用免疫学方法进行测定；

[0091] (36)如(30)~(35)中任一项所述的制剂,其中,在接受过GPC3靶向治疗剂疗法后,所述游离GPC3浓度增大；

[0092] (37)如(30)~(36)中任一项所述的制剂,其中,所述患者是GPC3的组织免疫染色评分显示高度表达的患者；

[0093] (38)如(30)~(37)中任一项所述的制剂,其中,所述癌患者为肝癌患者；

[0094] (39)如(30)~(38)中任一项所述的制剂,其中,所述GPC3靶向治疗剂以使癌患者的血中谷值成为200 $\mu$ g/ml以上的方式被施予；

[0095] (40)如(30)~(39)中任一项所述的制剂,其中,所述GPC3靶向治疗剂是包含抗GGPC3抗体作为有效成分的治疗剂；

[0096] (41)如(40)所述的制剂,其中,所述抗GPC3抗体是具有抗体依赖性细胞损伤(ADCC)活性和/或补体依赖性细胞损伤(CDC)活性的抗体；

[0097] (42)如(40)或(41)所述的制剂,其中,所述抗GPC3抗体为抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体,所述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体包含下述(1)~(5)中的任一方,

[0098] (1)序列号4、序列号5、及序列号6各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号7、序列号8、及序列号9各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0099] (2)序列号12、序列号13、及序列号14各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号15、序列号16、及序列号17各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0100] (3)序列号20、序列号21、及序列号22各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号23、序列号24、及序列号25各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0101] (4)序列号28、序列号29、及序列号30各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号31、序列号32、及序列号33各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；或

[0102] (5)序列号36、序列号37、及序列号38各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3,以及序列号39、序列号40、及序列号41各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3；

[0103] (43)如(40)~(42)中任一项所述的制剂,其中,所述抗GPC3抗体为包含下述任一方的抗体,

[0104] (1)选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及序列号51表示的轻链可变区；

[0105] (2)选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及选自序列号52、序列号53、序列号54、序列号55、序列号56、序列号57、序列号58、序列号59、序列号60、序列号61、序列号62、序列号63、序

列号64、序列号65、及序列号66表示的轻链可变区组中的轻链可变区；

[0106] (3) 序列号67表示的重链可变区、及序列号68表示的轻链可变区；

[0107] (4) 序列号69表示的重链可变区、及序列号70表示的轻链可变区；

[0108] (5) 序列号71表示的重链可变区、及序列号72表示的轻链可变区；或

[0109] (6) 序列号71表示的重链可变区、及序列号73表示的轻链可变区；

[0110] (44) 如(40)所述的制剂,其中,所述GPC3靶向治疗剂为在抗GPC3抗体上连接细胞损伤性物质而得的抗体；

[0111] (45) 癌的治疗方法,通过向利用(1)~(14)所述的方法确定的患者施予GPC3靶向治疗剂来进行。

[0112] 根据本发明,能够简便且准确地确定GPC3靶向治疗剂疗法是否有效、或者是否应该继续实施GPC3靶向治疗剂疗法。由此,GPC3靶向治疗剂疗法的效果的提高、和接受治疗的患者的QOL的改善成为可能,能够实现更优异的癌的治疗。

## 附图说明

[0113] [图1A]是表示在利用GPC3-IHC(染色法1)的染色评分中评价为高度表达的组织染色图像的图。各染色图像的上部示出的数字表示患者编号。

[0114] [图1B]是表示在利用GPC3-IHC(染色法1)的染色评分中评价为阴性或低度表达的组织染色图像的图。各染色图像的上部示出的数字表示患者编号。

[0115] [图2]是表示被施予GC33的20个病例的GC33施予期间的图。1个周期表示施予GC33(每周施予1次)4次。

[0116] [图3]是表示分离出根据采用Autoclave法进行抗原修复后的染色法被分成总评分为7以上、总评分低于7的两组的试样的患者组的未恶化生存期的差异的图。实线表示总评分为7以上的组(9例)的未恶化生存期,虚线表示总评分低于7的组(7例)的未恶化生存期。相对于总评分低于7的组而言,总评分为7以上的组的风险比为0.376(95%置信区间:0.116-1.227,  $p=0.0852$ )。

[0117] [图4A]是表示评价为GPC3高度表达的组的、血清中检测到的游离GPC3浓度与肿瘤组织的GPC3-IHC评分的相关关系的图。纵轴表示血清中的游离GPC3浓度(ng/mL),横轴表示接受GPC3靶向治疗剂疗法后的经过日数(日)。

[0118] [图4B]是表示评价为GPC3低度表达或阴性的组的、血清中检测到的游离GPC3浓度与肿瘤组织的GPC3-IHC评分的相关关系的图。纵轴表示血清中的游离GPC3浓度(ng/mL),横轴表示接受GPC3靶向治疗剂疗法后的经过日数(日)。

[0119] [图5A]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。纵轴表示存活率,横轴表示接受GPC3靶向治疗剂疗法后的未恶化生存期(日)。实线表示游离GPC3可测的组(6例)的未恶化生存期,虚线表示GPC3值低于检测限(0.4ng/mL)的组(14例)的未恶化生存期。

[0120] [图5B]是表示从试验期间内(包括GPC3靶向治疗剂疗法的实施前后)的患者采集的血清分离出的血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。纵轴表示存活率,横轴表示接受GPC3靶向治疗剂疗法后的未恶化生存期(日)。实线表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前或在GPC3靶向治疗剂疗法实施中的患者采集的血清分离出的血

清中的游离GPC3可测的组(9例)的未恶化生存期,虚线表示在GPC3靶向治疗剂疗法的实施前后、从接受过该疗法的患者采集的血清分离出的血清中的GPC3值均低于检测限(0.4ng/mL)的组(11例)的未恶化生存期。

[0121] [图6A]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。纵轴表示存活率,横轴表示接受GPC3靶向治疗剂疗法后的未恶化生存期(日)。实线表示游离GPC3可测的组(8例)的未恶化生存期,虚线表示GPC3值低于检测限(0.4ng/mL)的组(19例)的未恶化生存期。相对于低于检测限的组而言,可检测到的组的风险比为0.265(95%置信区间:0.077-0.914,  $p=0.0219$ )。

[0122] [图6B]是表示从试验期间内(包括GPC3靶向治疗剂疗法的实施前后)的患者采集的血清分离出的血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。纵轴表示存活率,横轴表示接受GPC3靶向治疗剂疗法后的未恶化生存期(日)。实线表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前或在GPC3靶向治疗剂疗法实施中的患者采集的血清分离出的血清中的游离GPC3可测的组(13例)的未恶化生存期,虚线表示在GPC3靶向治疗剂疗法的实施前后、从接受过该疗法的患者采集的血清分离出的血清中的GPC3值均低于检测限(0.4ng/mL)的组(14例)的未恶化生存期。相对于低于检测限的组而言,可检测到的组的风险比为0.283(95%置信区间:0.112-0.715,  $p=0.0038$ )。

[0123] [图7A]是表示接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清分离出的血清中的游离GPC3浓度低于中值(1129.7pg/mL)的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(34例)的未恶化生存期,虚线表示GC33的推算谷值低于中值的组(GC33低暴露组:19例)的未恶化生存期,点线表示GC33的推算谷值为中值以上的组(GC33高暴露组:34例)的未恶化生存期。关于未恶化生存期的中值,安慰剂组为83日,GC33低暴露组为43.5日,GC33高暴露组为124日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.803( $p=0.397$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.425( $p=0.010$ )。

[0124] [图7B]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度为中值(1129.7pg/mL)以上的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(24例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(40例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(24例)的未恶化生存期。关于未恶化生存期的中值,安慰剂组为44日,GC33低暴露组为46.5日,GC33高暴露组为87日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.510( $p=0.036$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.572( $p=0.056$ )。

[0125] [图7C]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度低于中值(1129.7pg/mL)的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的总生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(34例)的总生存期,虚线表示GC33低暴露组(19例)的总生存期,点线表示GC33高暴露组(34例)的总生存期。关于总生存期的中值,安慰剂组为203日,GC33低暴露组为86日,GC33高暴露组为295日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.590( $p=0.200$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.329( $p=0.008$ )。

[0126] [图7D]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度为中值(1129.7pg/mL)以上的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的总生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(24例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(40例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(24例)的未恶化生存期。关于总生存期的中值,安慰剂组为121日,GC33低暴露组为177日,GC33高暴露组为308日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.303( $p=0.005$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.280( $p=0.002$ )。

[0127] [图7E]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度显示为高于175pg/mL的值的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(51例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(56例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(47例)的未恶化生存期。关于未恶化生存期的中值,安慰剂组为51日,GC33低暴露组为45日,GC33高暴露组为124日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.597( $p=0.0184$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.439( $p=0.0003$ )。

[0128] [图7F]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度显示为高于175pg/mL的值的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的总生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(51例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(56例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(47例)的未恶化生存期。关于总生存期的中值,安慰剂组为203日,GC33低暴露组为141日,GC33高暴露组为308日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.402( $p=0.0037$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.238( $p<0.0001$ )。

[0129] [图8A]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度低于中值(1161.5pg/mL)的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(31例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(20例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(36例)的未恶化生存期。关于未恶化生存期的中值,安慰剂组为82日,GC33低暴露组为43日,GC33高暴露组为124日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.713( $p=0.197$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.392( $p=0.004$ )。

[0130] [图8B]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度为中值(1161.5pg/mL)以上的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(27例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(39例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(22例)的未恶化生存期。关于未恶化生存期的中值,安慰剂组为45日,GC33低暴露组为47日,GC33高暴露组为87日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.588( $p=0.092$ )相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.626( $p=0.116$ )。

[0131] [图8C]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度低于中值(1161.5pg/mL)的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的总生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(31例)的总生存期,虚线表示GC33低暴露组(20例)的总生存期,点线表示GC33高暴露组(36例)的总生存期。关于总生存期的中值,安慰

剂组为203日,GC33低暴露组为86日,GC33高暴露组为295日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.508 ( $p=0.100$ ) 相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.287 ( $p=0.002$ )。

[0132] [图8D]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度为中值(1161.5pg/mL)以上的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的总生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(27例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(39例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(22例)的未恶化生存期。关于总生存期的中值,安慰剂组为176日,GC33低暴露组为177日,GC33高暴露组为291日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.300 ( $p=0.022$ ) 相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.324 ( $p=0.005$ )。

[0133] [图8E]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度显示为高于259.7pg/mL的值的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的未恶化生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(50例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(55例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(47例)的未恶化生存期。关于未恶化生存期的中值,安慰剂组为46.5日,GC33低暴露组为45.5日,GC33高暴露组为124日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.567 ( $p=0.010$ ) 相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.467 ( $p=0.0009$ )。

[0134] [图8F]是表示从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者采集的血清中分离出的血清中的游离GPC3浓度显示为高于259.7pg/mL的值的组的、血清中的游离GPC3浓度与该患者的总生存期的相关关系的图。实线表示安慰剂组(50例)的未恶化生存期,虚线表示GC33低暴露组(55例)的未恶化生存期,点线表示GC33高暴露组(47例)的未恶化生存期。关于总生存期的中值,安慰剂组为185日,GC33低暴露组为156日,GC33高暴露组为308日。相对于安慰剂组而言,GC33高暴露组的风险比为0.414 ( $p=0.0043$ ) 相对于GC33低暴露组而言,GC33高暴露组的风险比为0.304 ( $p<0.0001$ )。

[0135] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本特愿2012-280304号的说明书中记载的内容。

## 具体实施方式

### [0136] 定义

[0137] 本说明书中,只要没有特别的定义,则认为与本发明关联使用的化学用语及技术用语具有本领域技术人员通常所理解的意思。

### [0138] 不定冠词

[0139] 本发明中,“一个(a)”及“一个(an)”之类的不定冠词,是指一个或两个以上的(即至少一个的)该不定冠词的语法上的对象。例如“一个(a)要素”是指一个要素或两个以上的要素。

### [0140] 氨基酸

[0141] 本说明书中,氨基酸以单字母代码或三字母代码、或这两种方式表述,例如,表示为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。

### [0142] 氨基酸的修饰

[0143] 为了对抗原结合分子的氨基酸序列中的氨基酸进行修饰,可适当地采用位点定向诱变法(Kunkel et.al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1985) 82,488-492)、重叠延伸PCR(Overlap extension PCR)等已知方法。此外,作为取代为天然的氨基酸以外的氨基酸的氨基酸的修饰方法,也可采用多种已知方法(Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct. (2006) 35,225-249、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (2003) 100 (11) ,6353-6357)。例如,也可合适地使用含有tRNA的无细胞翻译系统(Clover Direct (Protein Express))等,所述无细胞翻译系统中,非天然氨基酸结合在UAG密码子(琥珀密码子,其为终止密码子之一)的互补的琥珀抑制基因tRNA上。

[0144] 本说明书中,表示氨基酸的修饰部位时所使用的“和/或”的用语的意义,包括“及”与“或”适当组合而得的所有组合。具体而言,例如所谓“第43位、52位和/或105位的氨基酸被取代”,包括下述氨基酸修饰的变化:

[0145] (a) 43位, (b) 52位, (c) 105位, (d) 43位和52位, (e) 43位和105位, (f) 52位和105位, (g) 43位,52位和105位。

### [0146] EU编号及Kabat编号

[0147] 根据本发明中使用的方法,被分配为抗体的CDR和FR的氨基酸位置按照Kabat进行规定(Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institute of Health,Bethesda,Md.,1987年及1991年)。本说明书中,抗原结合分子为抗体或抗原结合片段的情况下,可变区的氨基酸按照Kabat编号表示,恒定区的氨基酸按照遵循Kabat的氨基酸位置的EU编号来表示。

### [0148] 生物学试样

[0149] 本发明中所谓“生物学试样”的用语,是指从对象分离的组织或流体的试样。作为上述试样的一种非限定性的实施方式,包括例如血浆、血清、脑脊液、淋巴液、皮肤、呼吸道、肠道、及泌尿生殖道的外部切片、眼泪、唾液、痰、乳汁、全血或所有血液组分、血液衍生物、血细胞、肿瘤、神经组织、器官或所有类型的组织、通过清洗得到的所有试样(例如支气管系统的试样)、以及体外的细胞培养物的构成成分的试样。

[0150] 游离GPC3的浓度可在从患者分离的生物学试样中进行测定。例如,可测定全血试样中的游离GPC3的浓度、或者血清或血浆等血液组分的试样(本说明书中,也分别称为全血试样、血清试样或血浆试样)中的游离GPC3的浓度。作为一种非限定性的实施方式,患者的全血试样、血清试样或血浆试样中的游离GPC3的浓度,可例如使用市售的Human Glypican-3ELISA kit(BioMosaic Inc.)、或Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Glypican 3(GPC3)(USCN Life Science Inc.),使用经EDTA处理过的全血试样、血清试样或血浆试样进行测定。

[0151] 所谓“分离的”,是指从其天然状态“人为性”地改变,即,天然产生的情况下,从其本来的环境改变和/或取出。例如,生物中存在的多核苷酸或多肽虽未分离,但在本发明中是指从在天然状态下一同存在的材料分离出的相同的多核苷酸或多肽是分离的。进而,通过转化、遗传学操作或任意的其他重组方法导入至生物中的多核苷酸或多肽,在生物(存活或未存活均可)内仍然存在时,也是分离的。

### [0152] 游离GPC3

[0153] 本发明中所谓“游离GPC3”，是指未锚定于表达GPC3的细胞上的GPC3，包括分泌型GPC3片段（其能够在生物体内或在试管内的特定条件下，从锚定于表达GPC3的细胞上的GPC3容易地解离）。作为“游离GPC3”的一种非限定性的实施方式，可示例包含序列号1规定的多肽的GPC3的第358位至氨基末端侧的多肽、包含序列号1规定的多肽的GPC3的第374位至氨基末端侧的多肽、存在于羧基末端的GPI锚钩（anchor）分解而游离的GPC3多肽及它们的片段等（专利文献7）。为了鉴定游离GPC3的结构，本领域技术人员可适当地选择已知方法。作为非限定性的实施方式，除了利用上述专利文献7中记载的方法等直接检测患者或模型动物的血清或血浆中存在的游离GPC3、对其结构进行分析的方法以外，也可适当地使用下述方法：例如检测能离解游离GPC3的酶（转化酶、磷酸酶D或Notum等）作用于在试管内培养的细胞中表达的GPC3而产生的游离GPC3，对其结构进行分析的方法等（J.Cell.Biol. (2003) 163 (3), 625-635等）。

#### [0154] 游离GPC3浓度的测定方法

[0155] 游离GPC3浓度可利用选自下述方法组成的组中的一种以上的方法，所述方法为：NMR（核磁共振）或质谱分析法（MS）等波谱法；SELDI（-TOF）、MALDI（-TOF）、一维凝胶分析、二维凝胶分析、液相色谱法（例如，高压液相色谱法（HPLC）或低压液相色谱法（LPLC））、薄层色谱法、及基于LC-MS的技术。以适当的LCMS技术为例，可示例ICAT（注册商标）（Applied Biosystems）或iTRAQ（注册商标）（Applied Biosystems）。此外，也可适当地采用检测游离GPC3经适当的酶进一步消化而得的游离GPC3的进一步的片段的方法。

[0156] 游离GPC3的测定可利用直接或间接的检测方法来实施。对于游离GPC3，可介由与酶、键、受体或转运蛋白、抗体、肽、适配体或寡核苷酸、或能够使游离GPC3特异性地结合的任意合成化学上的受体或化合物等、配体或配体类的相互作用，直接或间接地进行检测。该配体可用发光标记、荧光标记或放射性标记、和/或亲和性标签（tag）等可检测的标记进行修饰。

#### [0157] 免疫学方法

[0158] 作为游离GPC3的合适的测定方法，可示例使用与存在于GPC3的表位相结合的抗体的免疫学方法。作为该免疫学方法，可举出例如酶免疫测定法（ELISA、EIA）、荧光免疫测定法（FIA）、放射免疫测定法（RIA）、发光免疫测定法（LIA）、酶抗体法、荧光抗体法、免疫色谱法、免疫比浊法、乳胶比浊法、乳胶凝集反应测定法等。此外，本发明的免疫学方法中的测定，可通过手动操作的手工艺进行，也可使用分析装置等装置进行。

[0159] 本发明中的免疫学方法可按照例如夹心法等已知方法进行。例如，使生物学试样和经标记物质修饰的第二抗体同时或依次与固定于载体上的第一抗体反应。通过上述反应，形成固定于载体上的第一抗体、游离GPC3及经标记物质修饰的第二抗体的复合体，对该复合体所含有的连接在第二抗体上的标记物质进行定量，由此可以测定生物学试样中含有的游离GPC3的量（浓度）。

[0160] 例如，酶免疫测定法的情况下，可合适地使用固定有第一抗体的微孔板、经系列稀释的生物学试样、经HRP等酶修饰的第二抗体、清洗缓冲液、及含有承接利用HRP等酶的反应的基质的溶液。在非限定性的测定的一种实施方式中，在修饰第二抗体的酶的最适条件下使基质与其反应，该酶反应生成物的量可利用光学方法进行测定。此外，荧光免疫测定法的情况下，可合适地使用固定有第一抗体的光波导、经系列稀释的生物学试样、经荧光物质

修饰的第二抗体、清洗缓冲液。在非限定性的测定的一种实施方式,可利用照射至修饰第二抗体的荧光物质的激发光来测定该荧光物质发出的荧光强度。

[0161] 此外,放射免疫测定法的情况下,可测定由放射性物质产生的放射线量。此外,发光免疫测定法的情况下,可测定由发光反应体系产生的发光量。此外,免疫比浊法、乳胶比浊法、乳胶凝集反应测定法等的情况下,可利用终点法或速率法测定透射光、散射光。此外,免疫色谱法等通过目视进行测定的情况下,可目视测定检测线(test line)上出现的标记物质的颜色。需要说明的是,可适当地使用分析装置等设备来代替上述目视测定。

[0162] 本发明的免疫学方法中,可通过物理吸附法、化学结合法或它们的并用等方法使固定于载体上的第一抗体与载体吸附、结合。通过物理吸附法将抗体固定的方法,可适当地采用已知方法。例如,可举出下述方法:使抗体与载体在缓冲液等溶液中混合、接触的方法,使已溶解在缓冲液等中的抗体与载体接触的方法等。此外,通过化学结合法也能够将抗体固定在载体上。例如,可示例下述方法:使抗体和载体与戊二醛、碳二亚胺、亚氨酸酯或马来酰亚胺等二价性的交联试剂混合、接触,使抗体和载体两者的氨基、羧基、巯基、醛基或羟基等发生反应的方法等。进行固定化时,为抑制非特异性反应、使抗体固定化的载体的自然凝集等而需要进行处理的情况下,可利用已知方法进行固定化后的处理。例如,可举出下述方法:使牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、明胶、卵清白蛋白或它们的盐等的蛋白质、表面活性剂或脱脂乳粉等接触、被覆使抗体固定化的载体的表面或内壁面的方法等。

[0163] 本发明的免疫学方法中,可通过物理吸附法、化学结合法或它们的并用等方法使经标记物质修饰的第二抗体与标记物质吸附、结合。通过物理吸附法使标记物质与抗体结合的方法,可适当地采用已知方法。例如,可举出下述方法:使抗体与载体在缓冲液等溶液中混合、接触的方法,使已溶解在缓冲液等中的抗体与载体接触的方法,使已溶解在缓冲液等中的抗体与标记物质接触的方法等。例如,标记物质为胶体金(gold colloid)、乳胶的情况下,物理吸附法是有效的,可通过使抗体与胶体金在缓冲液中混合接触而获得具有胶体金标记的抗体。此外,通过化学结合法也能够将抗体用标记物质修饰。例如,可示例下述方法:使抗体和标记物质与戊二醛、碳二亚胺、亚氨酸酯或马来酰亚胺等二价性的交联试剂混合、接触,使抗体和标记物质两者的氨基、羧基、巯基、醛基或羟基等发生反应的方法等。例如,标记物质为荧光物质、酶、或化学发光物质的情况下,化学结合法是有效的。进行修饰时,为抑制非特异性反应、经标记物质修饰的抗体的自然凝集等而需要进行处理的情况下,可利用已知方法进行标记后的处理。例如,可举出下述方法:使牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、明胶、卵清白蛋白或其盐等蛋白质、表面活性剂或脱脂乳粉等接触、被覆结合有标记物质的抗体的方法等。

[0164] 作为标记物质,酶免疫测定法的情况下,可使用辣根过氧化物酶(POD)、碱性磷酸酶(ALP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、葡糖氧化酶、乳酸脱氢酶或淀粉酶等。此外,发光免疫测定法的情况下,可使用异硫氰酸荧光素、四甲基罗丹明异硫氰酸酯、取代罗丹明异硫氰酸酯、二氯三嗪异硫氰酸酯(dichlorotriazine isothiocyanate)、花青(cyanine)或部花青(merocyanine)等。此外,放射免疫测定法的情况下,可使用氚、碘125或碘131等。发光免疫测定法的情况下,可使用氨基苯二酰肼类、荧光素酶类、吖啶酯(acridinium ester)类或二氧杂环丁烷(dioxetane)化合物类等。此外,免疫色谱法、免疫比浊法、乳胶比浊法、乳胶凝集反应测定法的情况下,可使用由下述材质形成的微粒,所述材质为:聚苯乙烯、苯

乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物、乙酸乙烯酯-丙烯酸共聚物、聚丙烯醛、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-(甲基)丙烯酸缩水甘油酯共聚物、苯乙烯-丁二烯共聚物、甲基丙烯酸聚合物、丙烯酸聚合物、乳胶、明胶、脂质体、微囊、二氧化硅、氧化铝、炭黑、金属化合物、金属、金属胶体、陶瓷或磁性体等。

[0165] 作为本发明的免疫学方法中使用的载体,可适当地使用由聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚乙烯基甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、乳胶、脂质体、明胶、琼脂糖、纤维素、Sepharose、玻璃、金属、陶瓷或磁性体等材质形成的珠粒 (beads)、微孔板、试管、棒、膜 (membrane) 或试验片等形状的固相载体。

[0166] 本发明还提供含有本发明的免疫学方法所使用的成分的测定试剂盒。该测定试剂盒中含有至少一种可与存在于GPC3上的表位结合的抗体。该抗体可以以上文所述的固定于载体上的状态被提供,也可以以与载体分开的方式被提供。此外,该试剂盒中可附加性地含有经系列稀释的游离GPC3的标准液。该测定试剂盒中还可含有至少一种可以与不同于上述存在于GPC3上的表位的表位相结合的抗体。本发明的免疫学测定试剂盒所使用的测定原理等,与上文所述的免疫学方法相同。本发明的免疫学测定试剂盒中,可使用各种水系溶剂作为溶剂。作为该水系溶剂,可举出例如纯化水、生理盐水、或者Tris缓冲液、磷酸缓冲液或磷酸缓冲液生理盐水等各种缓冲液。作为上述缓冲液的pH,可适当地选择合适的pH。pH的值没有特别限定,但通常选择使用pH3~12范围内的pH。

[0167] 此外,本发明的免疫学测定试剂盒中,除上述成分以外,还可适当地含有下述物质中的一种或二种以上,所述物质为:牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、酪蛋白或其盐等的蛋白质、各种盐类、各种糖类、脱脂乳粉、正常兔血清等各种动物血清、叠氮化钠或抗生素等各种防腐剂、活化物质、反应促进物质、聚乙二醇等增加灵敏度的物质、非特异性反应抑制物质、或者非离子性表面活性剂、两性表面活性剂或阴离子性表面活性剂等。并且,使测定试剂中含有上述物质时的浓度没有特别限定,优选为0.001~10% (W/V),尤其是可以在0.01~5% (W/V) 的范围内适当地选择合适的浓度。

[0168] 进而,本发明的免疫学测定试剂盒中,还可在上述成分以外与其他试剂组合。作为其他试剂,可举出例如缓冲液、用于生物学试样的稀释液、试剂稀释液、含有标记物质的试剂、含有可产生显色等信号的物质的试剂、含有与显色等信号的产生有关的物质的试剂、含有用于进行校正 (校准) 的物质的试剂、或含有用于进行精度管理的物质的试剂等。

[0169] 作为本发明的免疫学测定试剂盒的形态,没有特别限定,但为了短时间且简便地进行测定,可以以一体型诊断试剂盒 (其中,本发明的免疫学测定试剂盒的构成成分成为了一体) 的形态提供。作为上述一体型诊断试剂盒,可举出例如ELISA试剂盒、荧光免疫测定试剂盒、免疫色谱试剂盒等。作为例如ELISA试剂盒的形态,包含固定有第一抗体的微孔板、经系列稀释的游离GPC3标准液、经HRP等酶修饰的第二抗体、清洗缓冲液及该酶反应的基质溶液等。此外,荧光免疫测定试剂盒的情况下,包含固定有第一抗体的光波导、经系列稀释的游离GPC3标准液、经荧光物质修饰的第二抗体及清洗缓冲液等。此外,免疫色谱试剂盒的情况下,可举出下述实施方式:膜收纳于反应盒 (cassette) 内,上述第一抗体固相化于该膜上的一端 (下游侧),并且,在膜上的相反的一端 (上游侧),装有展开液,在其附近的下游侧配置有添加了上述标记剂的基质的垫 (pad),在膜中间部配置有添加了第二抗体 (其如上所述进行了标记) 的垫的实施方式等。

[0170] 此外,本发明中,作为可用于检测组织中的GPC3表达量的生物学试样,可优选举出受试体标准样品。优选的受试体标准样品为从受试体获得的组织,进一步优选受试体的肝癌或肝细胞癌组织。作为采集肝癌或肝细胞癌组织的方法,可合适地采用作为已知方法的活检(活体解剖(biopsy))。所谓肝活检,是细长的针从皮肤表面直接刺入肝脏从而采集肝脏组织的方法。通常,针穿刺的部位为右胸下部的肋间。在术前使用超声波检查装置确认过穿刺部的安全性后,对穿刺部进行消毒。进而以从皮肤到肝脏表面的部位作为麻醉的对象,将穿刺部的皮肤切开小口后,穿刺穿刺针。

[0171] 为了可在显微镜下利用透射光线观察组织标准样品,将组织标准样品切成可充分透过显微镜所使用的光线的程度的薄片。作为切成薄片的前阶段,将组织标准样品固定。即,通过使组织·细胞的蛋白质发生脱水、改性而凝固,组织构成的细胞迅速死亡,使其结构稳定且不溶。首先,使用手术用刀等刀具以适于制作石蜡包埋切片的大小及形状的片段的形式切取组织标准样品(其将被作为固定对象)。然后,将该片段浸渍在用于实施固定的试剂即固定液中。作为固定液,可合适地使用福尔马林,进一步优选使用中性缓冲福尔马林。根据组织标准样品的特性或物性适当地选择中性缓冲福尔马林的浓度。浓度可在1~50%、优选5~25%、进一步优选10~15%之间适当地变更使用。使用真空泵对浸渍过组织标准样品的固定液适当地进行脱气。在常压及室温的条件下,将组织标本在固定液中放置数小时,由此实施固定。关于固定所需的时间,可在1小时~7日、优选2小时~3日、还优选3小时~24小时、进一步优选4小时~16小时的范围内适当地选择。进行固定之后,在磷酸缓冲液等中再适当浸渍数小时(该时间可在2小时~48小时、优选3小时~24小时、进一步优选4小时~16小时的范围内适当选择)。

[0172] 接下来,可采用冰冻切片法或石蜡切片法,从实施固定后的组织标准样品合适地制作切片。作为冰冻切片法的优选例子,可举出下述方法:将组织投入OCT冰冻切片包埋剂(O.C.T.compound)(Miles.Inc)中使其冰冻,使用低温恒温器(cryostat,制作冰冻切片的装置)将冰冻的组织切成薄片。在石蜡切片法中,将实施固定后的组织标准样品浸渍在包埋剂中,使其凝固,由此赋予均匀且适当的硬度。作为包埋剂,可合适地使用石蜡。使用乙醇对实施固定后的组织标准样品进行脱水。具体而言,将组织标准样品依次浸渍在70%乙醇、80%乙醇、100%乙醇中,由此对该组织标准样品进行脱水。关于浸渍所需的时间及次数,可在1小时~数日及1次~3次的范围内适当地选择。此外,虽然可以在室温或4℃下进行浸渍,但在4℃下进行浸渍时,浸渍时间越长越优选(如,彻夜等)。然后,将该液相置换为二甲苯后,利用石蜡包埋组织标准样品。关于将该液相置换为二甲苯所需要的时间,可在1小时~数小时的范围内适当地选择。该情况下,可在室温下进行置换,也可在4℃下进行置换,但在4℃下进行置换时,置换的时间越长越优选(如,彻夜等)。关于石蜡包埋所需的时间及次数,可在1小时~数小时及1次~4次的范围内适当地选择。该情况下,可在室温下进行包埋,也可在4℃下进行包埋,但在4℃下进行包埋时,包埋的时间越长越优选(如,彻夜等)。此外,可使用将石蜡包埋反应自动化处理的石蜡包埋装置(EG1160、Leica等)来合适地对组织标准样品进行石蜡包埋。

[0173] 将如上所述进行了石蜡包埋的组织标准样品粘接在台架上,由此制作“块(block)”,利用薄片切片机(microtome)将该块薄薄地切成选自1~20μm的厚度中的所期望的厚度。将切薄片而得的组织切片静置在作为透过性支承体的载玻片上,由此进行粘着。该

情况下,为防止组织切片的剥离,也可合适地使用向载玻片上涂布0.01%聚-L-赖氨酸(Sigma)并进行干燥而得的载玻片。对被粘着的组织切片进行适当的时间(选自数分~1小时之间)的风干。

#### [0174] 抗原修复

[0175] 在优选方式中,对因福尔马林固定而导致与抗体的反应性减弱了的抗原的反应性进行修复。本发明中,可以适用蛋白酶诱导的抗原修复法(PIER法),也可以适用热诱导的抗原修复法(HIER法)。此外,在一种非限定性的实施方式中,对如下所述制备的“可同等看待的两个组织标准样品”中的一个标准样品适用PIER法,对另一个标准样品适用HIER法,将与抗体反应时的、两者之间的染色程度的差异数值化也是可以的。

[0176] 在一种非限定性的实施方式中,准备一组下述的两个组织标准样品,所述组织标准样品是如“生物学试样”项所述进行制备的,且被安装在透过性支承体上。该组织标准样品优选为组织上可同等看待的两个组织标准样品。所谓“可同等看待”,是指相比较的两个组织标准样品是由该组织标准样品所来自的受试体标准样品中的几乎相同的细胞或组织构成的。例如、作为相邻的切片而制备的两个组织标准样品是可同等看待的两个组织标准样品。本发明中,只要没有特别地另作记载,则“可同等看待的两个组织标准样品”是指作为相邻的切片而制备的两个组织标准样品,但除此以外,即使不是作为相邻的切片而制备的,若构成两个组织标准样品的细胞或组织的构成在该两个组织标准样品之间可同等看待,则也相当于“可同等看待的两个组织标准样品”。作为细胞或组织的构成在该两个组织标准样品之间可同等看待的情况,例如可合适地示例下述情况:(1)在组织切片中的平面座标上的同一位置上存在来自同一细胞的细胞的切片的情况;(2)该细胞的切片在该平面座标上的同一位置上的存在比例至少为50%以上、优选为60%以上、还优选为70%以上、进一步优选为80%以上、更优选为90%以上、特别优选为95%以上的情况等。

[0177] 关于热诱导的抗原修复法,可适当地采用利用微波的加热方法、利用高压釜的加热方法、或利用煮沸处理的加热方法等。以780W的功率将液温保持在约98℃进行煮沸处理时,处理等修复所需要的时间可在5分钟~60分钟之间适当地选择,例如10分钟。关于抗原的修复处理,除了可以在10mM柠檬酸钠缓冲液中进行以外,也可以在市售的Target Retrieval Solution(DakoCytomation)等中进行。在下述实施例中,使用Target Retrieval Solution。只要修复处理的结果使得识别抗GPC3抗体的抗原中的表位获得与抗体的结合性,能够进行下文所述的抗原与抗体的复合体的检测,则可合适地使用任意缓冲液、水溶液。

[0178] 对于蛋白酶诱导的抗原修复法中使用的蛋白酶的种类、来源,没有特别限定,可适当选择使用通常可获得的蛋白酶。作为可使用的蛋白酶的例子,可优选举出0.01N盐酸中的0.05%浓度的胃蛋白酶、或pH7.6的Tris缓冲液中还含有0.01%浓度的CaCl<sub>2</sub>的0.1%浓度的胰蛋白酶、含有10mM的EDTA及0.5%的SDS的pH7.8的10mM Tris盐酸缓冲液中的1~50μg/ml浓度的蛋白酶K等。此外,使用蛋白酶K时,其反应液的pH可在6.5~9.5之间适当地选择,也可适当地利用SH试剂、胰蛋白酶抑制剂、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)抑制剂。Histofine HER2试剂盒(MONO)(Nichirei Biosciences)中附带的蛋白酶也可作为上述那样合适的蛋白酶的具体例子举出。蛋白酶抗原修复通常于37℃进行,但反应温度可在25℃~50℃的范围内适当地进行变更。于37℃进行蛋白酶抗原修复时,反应时间可在例如1分钟

~5小时之间适当地选择,例如,为15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时等。修复处理结束后,利用清洗用缓冲液对实施过该处理的组织标准样品进行清洗。清洗用缓冲液可合适地使用PBS (Phosphate buffer saline,磷酸盐缓冲液),除此以外,也可以合适地使用Tris盐酸缓冲液。通常,作为清洗条件,采用于室温实施3次5分钟的清洗的方法,但清洗的时间及温度可适当变更。

#### [0179] 组织标准样品与抗GPC3抗体的反应

[0180] 对于实施过利用热诱导的抗原修复法的抗原修复处理的组织标准样品和/或实施过利用蛋白酶诱导的抗原修复法的抗原修复处理的组织标准样品,将下文所述的抗GPC3抗体作为一级抗体进行反应。该反应在对抗GPC3抗体识别抗原中的表位而形成抗原抗体复合体而言为适当的条件下实施。通常,该反应于4℃彻夜实施,或者于37℃实施1小时,反应条件可在对抗体识别抗原中的表位而形成抗原抗体复合体而言为适当的范围内适当地进行变更。例如,反应温度可在4℃~50℃的范围内进行变更,反应时间可在1分钟~7日之间进行变更。实施低温下的反应时,优选使其长时间反应。一级抗体反应结束后,利用清洗用缓冲液对组织标准样品进行清洗。清洗用缓冲液可合适地使用PBS (磷酸盐缓冲液),除此以外,也可以合适地使用Tris盐酸缓冲液。通常,作为清洗条件,采用于室温实施3次5分钟的清洗的方法,但清洗的时间及温度可适当变更。

[0181] 然后,对于实施过一级抗体反应的组织标准样品,使其与可识别一级抗体的二级抗体进行反应。通常,可使用利用标记物质(其用于将二级抗体可视化)预先标记过的二级抗体。作为标记物质,可优选举出FITC(异硫氰酸荧光素)、Cy2 (Amersham)、Alexa488 (Molecular Probe)等荧光染料,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等的酶,或胶体金等。

[0182] 关于与二级抗体的反应,在对抗GPC3抗体与可识别该抗GPC3抗体的二级抗体形成抗原抗体复合体而言为适当的条件下实施。通常,该反应于室温或37℃实施30分钟至1小时,但可在对抗GPC3抗体与二级抗体形成抗原抗体复合体而言为适当的范围内适当地进行变更。例如,反应温度可在4℃~50℃的范围内进行变更,反应时间可在1分钟~7日之间进行变更。实施低温下的反应时,优选使其长时间反应。二级抗体反应结束后,利用清洗用缓冲液对组织标准样品进行清洗。清洗用缓冲液可合适地使用PBS (磷酸盐缓冲液),除此以外,也可以合适地使用Tris盐酸缓冲液。通常,作为清洗条件,采用于室温实施3次5分钟的清洗的方法,但清洗的时间及温度可适当变更。

[0183] 接下来,对于实施过二级抗体反应的组织标准样品,使其与将标记物质可视化的物质进行反应。使用辣根过氧化物酶作为二级抗体的标记物质时,在马上要进行孵育前将0.02%过氧化氢水溶液与用pH 7.2的0.1M Tris盐酸缓冲液调整为0.1%浓度的DAB(二氨基联苯胺)溶液等量混合,由此得到反应液,在该反应液中对组织标准样品进行孵育。除DAB以外,也可适当地选择DAB-Ni、AEC+(以上,DAKO)等显色基质。在孵育的过程中,时而在显微镜下观察显色的程度,在确认到了适当的显色的阶段将组织标准样品浸渍在PBS中,由此停止可视化反应。

[0184] 使用碱性磷酸酶作为二级抗体的标记物质时,在BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯)/NBT(氮蓝四唑,nitro blue tetrazolium) (Zymed) 基质溶液(向含有10mM浓度的MgCl<sub>2</sub>及28mM浓度的NaCl的pH9.8的50mM碳酸钠缓冲液中,溶解0.4mM浓度的NBT及0.38mM浓度的BCIP而得的溶液)中对组织标准样品进行孵育。此外,除BCIP及NBT以外,也可以适当地使用

永固红 (Permanent Red)、快红 (Fast Red) 或品红+ (Fuchsin+) (以上, DAKO) 等。在进行孵育之前, 也可以在室温下与含有1mM浓度的盐酸左旋咪唑 (levamisole hydrochloride) (Nacalai Tesque) (其为内源性碱性磷酸酶的抑制剂)、0.1M氯化钠及50mM氯化镁的0.1M Tris-盐酸缓冲液 (pH 9.5) 预孵育1分钟~数小时。在孵育的过程中, 时而在显微镜下进行观察, 在观察到作为反应最终产物的紫色的甲贍 (formazan) 的沈着的阶段, 对组织标准样品进行水洗, 或者在利用含有2%聚乙烯醇的TBS使反应停止后使用TBST (含有0.1%的吐温20的TBS) 进行清洗。使用胶体金作为二级抗体的标记时, 通过银敏化使金属银附着于金粒子, 由此使胶体金可视化。银敏化的方法对于本领域技术人员而言是已知的。

[0185] 使用FITC (异硫氰酸荧光素)、Cy2 (Amersham)、Alexa488 (Molecular Probe) 等荧光染料作为二级抗体的标记物质时, 不需要可视化物质的反应工序, 可通过照射该荧光物质的激发波长的光, 使用荧光显微镜适当地检测所发出的光。

#### [0186] 组织免疫染色评分

[0187] 在本发明的一种非限定性的实施方式中, 还提供下述方法, 所述方法为: 根据游离GPC3浓度、以及利用上述方法检测到的组织中的GPC3的表达量, 确定GPC3靶向治疗剂疗法有效, 或者确定是否继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。在一种非限定性的实施方式中, 利用例如下文示例的非限定性的方法将利用上述方法检测到的组织中的GPC3的表达数值化。本发明中, 将如上所述进行了数值化的组织中的GPC3的表达量称为“GPC3的组织免疫染色评分”。

[0188] 按照W02009116659中记载的方法, 将按表1所示的基准算出的、阳性细胞率 (Positive cell rate: PR)、细胞质或细胞膜中的染色强度 (Staining intensity of cytoplasm: SI-cp, Staining intensity of cell membrane: SI-cm) 及细胞膜染色模式 (Staining pattern of cell membrane: Sp-cm) 的各自的评分基于式1及式2的计算式加和而得的评分, 示例为本发明的非限定性的GPC3的组织免疫染色评分 (方便起见, 称为“复合评价分数1”)。

[0189] [表1-1]

[0190]

基准	评价	分数
阳性细胞率 (PR)	0	0
	1%以上且小于 20%	1
	20%以上且小于 50%	2
	50%以上	3
染色强度 (SI) · 细胞质 (SI-cp)	轻微阳性	0
	弱阳性	1

[0191]

· 细胞膜 (SI-cm)	伴有中度阳性和/或强阳性的弱阳性	2
	中度阳性	3
	强阳性	4
细胞膜染色性 (SP-cm)	阴性	0
	细胞膜仅一部分染色	1
	几乎所有细胞的细胞膜的一部分及一部分细胞的细胞膜的圆周状的染色	2
	几乎所有细胞的细胞膜的圆周状的染色	3

[0192] (评价Sp-Cm时,对使用4倍或10倍物镜的镜下的视野中的细胞的染色进行了评价。)

[0193] [式1]

[0194]  $IHC_{\text{总计}} = PR + SI - C_p + SI - C_m + Sp - C_m$ 

[0195] [式2]

[0196]  $IHC_{\text{cm}} = PR + SI - C_m + Sp - C_m$ 

[0197] [表1-2]

[0198]

复合评价分数1	IHC总评分
高度表达	7以上
低度或中度表达	小于7

[0199] 此外,将细胞膜或细胞质内的染色强度分类为0~3、以显示出各染色强度的细胞的比例为基础而算出的H评分(H-score)(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)也为人们所知。

[0200] 另一方面,可示例下述评分算法(scoring algorithm)及基于该算法的评价分数(复合评价分数2),所述评分算法以膜和细胞质的染色强度、染色的比例为基础分类为0~3+。

[0201] [表2]

分数	评价
0	细胞膜未染色
	少于 10%的肿瘤细胞的细胞质内的染色
1+	少于 10%的肿瘤细胞的细胞质内的染色
	和/或
	10%以上的肿瘤细胞的细胞质内的染色（注：存在细胞质内的强染色时，少于肿瘤细胞的 50%）
[0202] 2+	10%以上的肿瘤细胞的弱或中度的细胞膜染色（注：存在细胞膜的强染色时，少于肿瘤细胞的 10%）（其中，与有无 10%以上的肿瘤细胞的细胞质内的染色无关（注：存在细胞质内的染色时，少于肿瘤细胞的 50%））
3+	无论有无细胞质内的染色，10%以上的肿瘤细胞的细胞膜的强染色
	或
	50%以上的肿瘤细胞的细胞质内的强染色

[0203] 本发明中，作为“GPC3的组织免疫染色评分”，例如可以单独使用上述复合评价分数1、H评分、复合评价分数2等，或者将它们组合使用。作为一种非限定性的实施方式，“GPC3的组织免疫染色评分”可使用复合评价分数1，作为另一种非限定性的实施方式，“GPC3的组织免疫染色评分”可使用复合评价分数2。

#### [0204] GPC3靶向治疗剂

[0205] 本发明中所谓“GPC3靶向治疗剂”的用语，是指能带来下述效果的所有分子，所述效果为：阻断、抑制、阻碍或降低GPC3的生物学活性（包括由GPC3介导的信号通路）的效果，或者对表达GPC3的细胞的细胞损伤效果。所谓“靶向治疗”的用语，并不是也显示具有生物学作用的特定的机理，而是包括GPC3的药理学、生理学及生物化学相互作用中的所有可能的作用的概念。GPC3靶向治疗剂的例子包括下述作用物质：(1) 为抑制GPC3向可与GPC3结合的配体结合的拮抗性抑制剂或非拮抗性抑制剂、因而干预GPC3与其配体的结合的作用物质；(2) 虽不干预GPC3与其配体的结合，但取而代之，阻碍或减少由GPC3向其配体结合而产生的活性的作用物质；(3) 减少GPC3的表达的作用物质；(4) 可能诱发对表达GPC3的细胞的细胞损伤活性的作用物质。作为配体的一种非限定性的实施方式，可示例wnt (Cancer Res. (2005) 65, 6245-6254)、IGF-II (Carcinogenesis (2008) 29 (7), 1319-1326) 或成纤维细胞生长因子2 (Fibroblast Growth Factor 2) (Int. J. Cancer (2003) 103 (4), 455-465) 等。作为上述作用物质的一种非限定性的实施方式，可包含抗体（包括其抗原结合结构域）、核酸分子（反义的或RNAi分子等）、肽、非肽类低分子有机物等。

[0206] 作为用作本发明的GPC3靶向治疗剂的非肽性的低分子有机物的一种非限定性的实施方式，可示例作用于甲基化抑制基因的非肽性的低分子喹啉衍生物 (W02008/046085) 等。此外，还可以示例诱发细胞损伤性T细胞的细胞损伤活性的HLA-A2限制性GPC3肽144-152 (序列号2) 或HLA-A24限制性GPC3肽298-306 (序列号3) (Clin. Cancer Res. (2006) 12

(9), 2689-2697) 等。

[0207] 抗GPC3抗体

[0208] 作为用作本发明的GPC3靶向治疗剂的抗GPC3抗体的一种非限定性的实施方式, 可示例在 (BioMosaic公司基于商品目录编号B0134R而销售的) 1G12抗体 (W02003/100429) 上连接有细胞损伤性物质的抗体药物复合体 (Antibody drug conjugate (ADC)) (W02007/137170)。

[0209] 此外, 作为一种与上述实施方式不同的非限定性的实施方式, 可示例W02006/006693或W02009/041062中记载的人源化抗GPC3抗体。即, 可使用下述人源化抗GPC3抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂, 所述人源化抗GPC3抗体包含序列号4、序列号5、及序列号6各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3, 以及序列号7、序列号8、及序列号9各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。制作该人源化抗GPC3抗体时, 与序列号10表示的重链框架序列或序列号11表示的轻链框架序列的序列同一性高的人框架序列, 可在适当选择的基础上被用作人源化时的模板 (template)。

[0210] 作为一种进一步不同的非限定性的实施方式, 可使用下述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂, 所述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体包含: 序列号12、序列号13、及序列号14各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3, 以及序列号15、序列号16、及序列号17各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。制作该人源化抗GPC3抗体时, 与序列号18表示的重链框架序列或序列号19表示的轻链框架序列的序列同一性高的人框架序列, 可在适当选择的基础上被用作人源化时的模板。

[0211] 作为另一种不同的非限定性的实施方式, 可使用下述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂, 所述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体包含: 序列号20、序列号21、及序列号22各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3, 以及序列号23、序列号24、及序列号25各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。制作该人源化抗GPC3抗体时, 与序列号26表示的重链框架序列或序列号27表示的轻链框架序列的序列同一性高的人框架序列, 可在适当选择的基础上被用作人源化时的模板。

[0212] 作为另一种进一步不同的非限定性的实施方式, 可使用下述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂, 所述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体包含: 序列号28、序列号29、及序列号30各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3, 以及序列号31、序列号32、及序列号33各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。制作该人源化抗GPC3抗体时, 与序列号34表示的重链框架序列或序列号35表示的轻链框架序列的序列同一性高的人框架序列, 可在适当选择的基础上被用作人源化时的模板。

[0213] 此外, 作为另一种不同的非限定性的实施方式, 可使用下述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂, 所述抗GPC3嵌合抗体或人源化抗GPC3抗体包含: 序列号36、序列号37、及序列号38各自表示的重链CDR1、重链CDR2及重链CDR3, 以及序列号39、序列号40、及序列号41各自表示的轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。制作该人源化抗GPC3抗体时, 与序列号42表示的重链框架序列或序列号43表示的轻链框架序列的序列同一性高的人框架序列, 可在适当选择的基础上被用作人源化时的模板。

[0214] 此外, 作为另一种进一步不同的非限定性的实施方式, 可使用下述人源化抗GPC3抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂, 所述人源化抗GPC3抗体包含: 选自序列号44、序列号

45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及序列号51表示的轻链可变区。作为一种其他的非限定性的实施方式,可使用下述人源化抗GPC3抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂,所述人源化抗GPC3抗体包含:选自序列号44、序列号45、序列号46、序列号47、序列号48、序列号49、及序列号50表示的重链可变区组中的重链可变区,以及选自序列号52、序列号53、序列号54、序列号55、序列号56、序列号57、序列号58、序列号59、序列号60、序列号61、序列号62、序列号63、序列号64、序列号65、及序列号66表示的轻链可变区组中的轻链可变区。

[0215] 此外,作为另一种不同的非限定性的实施方式,也可以使用下述抗体作为本发明的GPC3靶向治疗剂,所述抗体为:包含序列号67表示的重链可变区及序列号68表示的轻链可变区的人源化抗GPC3抗体,包含序列号69表示的重链可变区及序列号70表示的轻链可变区的人源化抗GPC3抗体,包含序列号71表示的重链可变区及序列号72表示的轻链可变区的人源化抗GPC3抗体,或包含序列号71表示的重链可变区及序列号73表示的轻链可变区的人源化抗GPC3抗体。

#### [0216] 细胞损伤活性

[0217] 作为本发明的抗GPC3抗体,可示例具有细胞损伤活性的抗GPC3抗体。本发明中,作为细胞损伤活性的非限定性的例子,可举出例如抗体依赖性细胞介导的细胞损伤(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity:ADCC)活性、补体依赖性细胞损伤(complement-dependent cytotoxicity:CDC)活性及由T细胞产生的细胞损伤活性等。本发明中,CDC活性是指由补体系统产生的细胞损伤活性。另一方面,所谓ADCC活性,是指下述活性:免疫细胞等介由该免疫细胞上表达的Fc $\gamma$ 受体结合在抗原结合分子(其含有与靶细胞的细胞膜上所表达的膜型分子结合的抗原结合结构域)的Fc区、该免疫细胞使靶细胞受到损伤。关于目标抗原结合分子是否具有ADCC活性、或者是否具有CDC活性,可通过已知方法进行测定(例如,Current protocols in Immunology,Chapter7.Immunologic studies in humans,Coligan等人编著(1993)等)。

[0218] 具体而言,首先制备效应细胞、补体溶液、靶细胞。

#### [0219] (1) 效应细胞的制备

[0220] 在RPMI1640培养基(Invitrogen)中,从摘取自CBA/N小鼠等的脾脏分离脾脏细胞。用含有10%胎牛血清(FBS,HyClone)的上述培养基清洗分离得到的脾脏细胞,将清洗过的该脾脏细胞的浓度调配成 $5 \times 10^6$ 个/mL,由此制得效应细胞。

#### [0221] (2) 补体溶液的制备

[0222] 利用含有10%FBS的培养基(Invitrogen)将幼兔补体(Baby Rabbit Complement)(CEDARLANE)稀释10倍,由此制得补体溶液。

#### [0223] (3) 靶细胞的制备

[0224] 在含有10%FBS的DMEM培养基中,将表达抗原的细胞与0.2mCi的<sup>51</sup>Cr-铬酸钠(GE Healthcare Life Sciences)一起于37°C下培养1小时,由此可对该靶细胞进行放射性标记。进行放射性标记后,用含有10%FBS的RPMI1640培养基清洗3次,将清洗过的细胞的浓度调配成 $2 \times 10^5$ 个/mL,由此制得该靶细胞。

[0225] ADCC活性和CDC活性可通过下述方法进行测定。测定ADCC活性时,向96孔U底培养板(Becton Dickinson)的孔中各添加50 $\mu$ l的靶细胞,使所添加的靶细胞与抗原结合分子在

冰上反应15分钟。然后,将添加了100 $\mu$ l效应细胞的该培养板在二氧化碳孵育器内静置4小时。抗体(抗原结合分子)的终浓度可设定为例如0或10 $\mu$ g/ml等的浓度。静置后,从各孔回收100 $\mu$ l的上清液,使用 $\gamma$ 计数器(COBRAII AUTO-GAMMA,MODEL D5005, Packard Instrument Company)测定该上清液的放射活性。细胞损伤活性(%)可使用测定值基于(A-C)/(B-C)×100的计算式进行计算。A表示各试样的放射活性(cpm),B表示添加了1%NP-40(nacalaitesque)的试样的放射活性(cpm),C表示只含有靶细胞的试样的放射活性(cpm)。

[0226] 另一方面,测定CDC活性时,向96孔平底培养板(Becton Dickinson)的孔中各添加50 $\mu$ l的靶细胞,使所添加的靶细胞与抗原结合分子在冰上反应15分钟。然后,将添加了100 $\mu$ l补体溶液的该培养板在二氧化碳孵育器内静置4小时。抗体抗原结合分子的终浓度可设定为例如0或3 $\mu$ g/mL等的浓度。静置后,从各孔回收100 $\mu$ l的上清液,使用 $\gamma$ 计数器测定该上清液的放射活性。细胞损伤活性可与ADCC活性的测定同样地进行计算。

#### [0227] 细胞损伤性物质

[0228] 此外,作为本发明的抗GPC3抗体的一种非限定性的实施方式,还可示例连接有细胞损伤性物质的抗GPC3抗体。这样的抗GPC3-抗体药物复合体(Antibody drug conjugate (ADC))已在W02007/137170等中具体公开,但并不限于此。即,作为细胞损伤性物质,可以是下文示例的化疗剂,还可以是Alley et al.,Curr.Opin.Chem.Biol.(2010)14,529-537或W02009/140242所公开的化合物,通过适当的接头等将上述化合物结合在抗原结合分子上。

[0229] 可结合在本发明的抗GPC3抗体上的化疗剂可示例如下:阿扎立平(azaribine)、阿纳托唑(anastrozole)、氮胞苷(azacytidine)、博来霉素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、苔藓抑素-1(bryostatin-1)、白消安(busulfan)、喜树碱(camptothecin)、10-羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin)、卡氮芥(carmustine)、西乐葆(celebrex)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)、依立替康(irinotecan)、卡铂(carboplatin)、克拉屈滨(cladribine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、多西他赛(docetaxel)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素葡萄糖苷酸(daunomycin glucuronide)、柔红霉素(daunorubicin)、地塞米松(dexamethasone)、己烯雌酚(diethylstilbestrol)、阿得里亚霉素(doxorubicin)、阿霉素葡萄糖苷酸(doxorubicin glucuronide)、表阿霉素(epirubicin)、乙炔雌二醇(ethinyl estradiol)、雌莫司汀(estramustine)、依托泊苷(etoposide)、依托泊苷葡萄糖苷酸(etoposide glucuronide)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、氟他胺(flutamide)、氟尿嘧啶(flourouracil)、氟甲睾酮(flouxmesterone)、吉西他滨(gemcitabine)、己酸羟孕酮(hydroxyprogesterone caproate)、羟基脲(hydroxyurea)、去甲氧基柔红霉素(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、亚叶酸(leucovorin)、洛莫司汀(lomustine)、美登醇(maytansinoid)、氮芥(mechlorethamine)、乙酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、美法仑(melphalan)、巯基嘌呤(mercaptapurine)、甲氨喋呤(methotrexate)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、丝裂霉素(mitomycin)、米托坦(mitotane)、丁酸苯酯(phenylbutyrate)、泼尼松(prednisone)、甲基苄肼(procarbazine)、紫杉醇(paclitaxel)、喷司他丁(pentostatin)、司莫司汀

(semustine)、链佐星(streptozocin)、他莫昔芬(tamoxifen)、紫杉烷类(taxanes)、紫杉醇(taxol)、丙酸睾丸酮(testosterone propionate)、沙利度胺(thalidomide)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、噻替派(thiotepa)、替尼泊昔(teniposide)、托泊替康(topotecan)、乌拉莫司丁(uracil mustard)、长春碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)、长春新碱(vincristine)。

[0230] 本发明中,优选的化疗剂为低分子化疗剂。低分子化疗剂即使与本发明的抗GPC3-抗体药物复合体结合后,干预抗GPC3抗体的功能的可能性也较低。本发明中,低分子化疗剂通常具有100~2000、优选200~1000的分子量。此处示例的化疗剂均为低分子化疗剂。上述本发明中的化疗剂中包括在生物体内转化为活性化疗剂的前药。对于前药的活化,可以为酶性转化,也可以为非酶性转化。

[0231] 此外,作为可连接在本发明的抗GPC3-抗体药物复合体上的细胞损伤性物质,还可示例假单胞菌外毒素A(Pseudomonas exotoxin A)、肥皂草素(Saporin-s6)、白喉毒素、海葵毒素(Cnidarian toxin)等毒性肽(毒素)、放射性碘(Radioiodine)、光敏剂(Photosensitizer)。作为毒性肽的例子,例如可优选举出下述物质。

[0232] 白喉毒素A链(Diphtheria toxin A Chain)(Langone et al.,Methods in Enzymology(1983)93,307-308);

[0233] 假单胞菌外毒素(Pseudomonas Exotoxin)(Nature Medicine(1996)2,350-353);

[0234] 蓖麻毒素链(Ricin A Chain)(Fulton et al.,J.Biol.Chem.(1986)261,5314-5319;Sivam et al.,Cancer Res.(1987)47,3169-3173;Cumber et al.,J.Immunol.Methods(1990)135,15-24;Wawrzynczak et al.,Cancer Res.(1990)50,7519-7562;及Gheeite et al.,J.Immunol.Methods(1991)142,223-230);

[0235] 无糖链蓖麻毒素A链(Deglycosylated Ricin A Chain)(Thorpe et al.,Cancer Res.(1987)47,5924-5931);

[0236] 相思豆毒素A链(Abrin A Chain)(Wawrzynczak et al.,Br.J.Cancer(1992)66,361-366;Wawrzynczak et al.,Cancer Res.(1990)50,7519-7562;Sivam et al.,Cancer Res.(1987)47,3169-3173;及Thorpe et al.,Cancer Res.(1987)47,5924-5931);

[0237] 白树毒素(Gelonin)(Sivam et al.,Cancer Res.(1987)47,3169-3173;Cumber et al.,J.Immunol.Methods(1990)135,15-24;Wawrzynczak et al.,Cancer Res.,(1990)50,7519-7562;及Bolognesi et al.,Clin.exp.Immunol.(1992)89,341-346);

[0238] 美洲商陆抗病毒蛋白(PAP-s;Pokeweed anti-viral protein from seeds)(Bolognesi et al.,Clin.exp.Immunol.(1992)89,341-346);

[0239] 异株腹泻毒蛋白(Bryodin)(Bolognesi et al.,Clin.exp.Immunol.(1992)89,341-346);

[0240] 皂草毒蛋白(Saporin)(Bolognesi et al.,Clin.exp.Immunol.(1992)89,341-346);

[0241] 苦瓜毒蛋白(Momordin)(Cumber et al.,J.Immunol.Methods(1990)135,15-24;Wawrzynczak et al.,Cancer Res.(1990)50,7519-7562;及Bolognesi et al.,Clin.exp.Immunol.(1992)89,341-346);

[0242] 木鳖毒蛋白(Momorcochin)(Bolognesi et al.,Clin.exp.Immunol.(1992)89,

341-346) ;

[0243] 香石竹毒蛋白32 (Dianthin 32) (Bolognesi et al., Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346) ;

[0244] 香石竹毒蛋白30 (Dianthin 30) (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)) ;

[0245] 蒴莲根毒蛋白II (Modeccin) (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)) ;

[0246] 槲寄生毒蛋白 (Viscumin) (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)) ;

[0247] 蒴莲根毒蛋白I (Volkensin) (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)) ;

[0248] 商陆毒蛋白 (Dodecandrin) (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)) ;

[0249] 小麦毒蛋白 (Tritin) (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)) ;

[0250] 软瓜蛋白 (Luffin) (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)) ; 及

[0251] 括楼种子毒蛋白 (Trichokirin) (Casellas et al., Eur. J. Biochem. (1988) 176, 581-588; 及 Bolognesi et al., Clin. exp. Immunol., (1992) 89, 341-346)。

[0252] 另一方面, 测定由本发明的抗GPC3-抗体药物复合体产生的细胞损伤活性时, 向96孔培养板 (Becton Dickinson) 中, 每孔各添加50 $\mu$ l的靶细胞和该抗GPC3-抗体药物复合体, 在冰上实施15分钟的反应。将该培养板在二氧化碳孵育器内孵育1~4小时。关于抗GPC3-抗体药物复合体的终浓度, 可适当地使用0~3 $\mu$ g/ml的范围内的浓度。培养后, 回收100 $\mu$ l的上清液, 使用 $\gamma$ 计数器测定该上清液具有的放射活性。细胞损伤活性可与ADCC活性的测定同样地进行计算。

[0253] Fc区

[0254] 被包含在本发明的抗GPC3抗体所含有的恒定区中的Fc区, 可从人IgG获得, 并不限定于IgG的特定的亚类。所谓Fc区, 是指EU编号表示的大约第216位的氨基酸中的、从木瓜蛋白酶切断部位的铰链区 (hinge region) 的N末端起、包括该铰链、CH2及CH3结构域在内的抗体的重链恒定区。作为该Fc区的优选例, 可举出如下文所述具有对Fc $\gamma$ 受体的结合活性的Fc区。作为上述Fc区的一种非限定性的实施方式, 可示例人IgG1 (序列号74)、人IgG2 (序列号75)、人IgG3 (序列号76) 或人IgG4 (序列号77) 表示的恒定区中所包含的Fc区。

[0255] Fc $\gamma$ 受体 (Fc $\gamma$ R)

[0256] 所谓Fc $\gamma$ 受体 (也记为Fc $\gamma$ R), 是指可与IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体的Fc区结合的受体, 实质上也表示Fc $\gamma$ 受体基因所编码的蛋白质家族的所有成员。就人而言, 该家族包括: Fc $\gamma$ RI (CD64), 其中包含同种型Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIb和Fc $\gamma$ RIc; Fc $\gamma$ RII (CD32), 其中包含同种型Fc $\gamma$ RIIa (同种异型H131和R131。即, Fc $\gamma$ RIIa (H) 和Fc $\gamma$ RIIa (R))、Fc $\gamma$ RIIb (包含Fc $\gamma$ RIIb-1和Fc $\gamma$ RIIb-2) 和Fc $\gamma$ RIIc; 及Fc $\gamma$ RIII (CD16), 其中包含同种型Fc $\gamma$ RIIIa (包含同种异型V158和F158。即, Fc $\gamma$ RIIIa (V) 和Fc $\gamma$ RIIIa (F)) 和Fc $\gamma$ RIIIb (包含同种异型Fc $\gamma$ RIIIb-NA1和Fc $\gamma$ RIIIb-NA2); 以及所有尚未发现的人Fc $\gamma$ R类或Fc $\gamma$ R同种型或同种异型, 但并不限定于这些。Fc $\gamma$ R的来源包括人、小鼠、大鼠、兔和猴, 但并不限定于这

些,可以来自所有生物。小鼠Fc $\gamma$ R类中包括Fc $\gamma$ RI (CD64)、Fc $\gamma$ RII (CD32)、Fc $\gamma$ RIII (CD16)和Fc $\gamma$ RIII-2 (Fc $\gamma$ RIV、CD16-2)、以及所有尚未发现的小鼠Fc $\gamma$ R类或Fc $\gamma$ R同种型或同种异型,但并不限于这些。作为上述Fc $\gamma$ 受体的优选例,可举出人Fc $\gamma$ RI (CD64)、Fc $\gamma$ RIIa (CD32)、Fc $\gamma$ RIIb (CD32)、Fc $\gamma$ RIIIa (CD16)和/或Fc $\gamma$ RIIIb (CD16)。人Fc $\gamma$ RI的多肽序列记载于序列号78 (NP\_000557.1)中,人Fc $\gamma$ RIIa (同种异型H131)的多肽序列记载于序列号79 (AAH20823.1)中(同种异型R131是序列号79的第166位的氨基酸被Arg取代的序列),Fc $\gamma$ RIIb的多肽序列记载于序列号80 (AAI46679.1)中,Fc $\gamma$ RIIIa的多肽序列记载于序列号81 (AAH33678.1)中,且Fc $\gamma$ RIIIb的多肽序列记载于序列号82 (AAI28563.1)中(括号内表示RefSeq等数据库的注册编号)。关于Fc $\gamma$ 受体是否具有与IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体的Fc区结合的活性,可通过FACS、ELISA方式 (ELISA Format)、以及ALPHA筛选 (ALPHA Screen) (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay,均相光激化学发光免疫分析)、利用表面等离子体共振 (SPR) 现象的BIACORE法等已知方法进行确认 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010)。

[0257] 包含Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIb和Fc $\gamma$ RIc的Fc $\gamma$ RI (CD64)、及包含同种型Fc $\gamma$ RIIIa (包含同种异型V158和F158)和Fc $\gamma$ RIIIb (包含同种异型Fc $\gamma$ RIIIb-NA1和Fc $\gamma$ RIIIb-NA2)的Fc $\gamma$ RIII (CD16)中, $\alpha$ 链(其与IgG的Fc区结合)与共有 $\gamma$ 链(其具有向细胞内传递活化信号的ITAM)缔合。另一方面,包含同种型Fc $\gamma$ RIIa (包含同种异型H131和R131)和Fc $\gamma$ RIIc的Fc $\gamma$ RII (CD32)自身的细胞质结构域中含有ITAM。上述受体表达于巨噬细胞、肥大细胞、抗原呈递细胞等许多免疫细胞中。通过上述受体与IgG的Fc区结合而传递的活化信号,巨噬细胞的吞噬能力、炎性细胞因子的产生、肥大细胞的脱颗粒、抗原呈递细胞的功能亢进被促进。如上所述具有传递活化信号的能力的Fc $\gamma$ 受体,在本说明书中被称为活性型Fc $\gamma$ 受体。

[0258] 另一方面,Fc $\gamma$ RIIb (包含Fc $\gamma$ RIIb-1和Fc $\gamma$ RIIb-2)自身的细胞质内结构域中含有传递抑制型信号的ITIM。在B细胞中,通过Fc $\gamma$ RIIb与B细胞受体 (BCR) 的交联,来自BCR的活化信号被抑制,结果BCR的抗体的产生被抑制。在巨噬细胞中,通过Fc $\gamma$ RIII与Fc $\gamma$ RIIb的交联,吞噬能力、炎性细胞因子的产生能力被抑制。如上所述具有传递抑制信号的能力的Fc $\gamma$ 受体,在本说明书中被称为抑制型Fc $\gamma$ 受体。

[0259] Fc区对Fc $\gamma$ R的结合活性

[0260] 如上文所述,作为本发明的抗GPC3抗体中包含的Fc区,可举出具有对Fc $\gamma$ 受体的结合活性的Fc区。作为这样的Fc区的一种非限定性的实施方式,可示例人IgG1 (序列号74)、人IgG2 (序列号75)、人IgG3 (序列号76) 或人IgG4 (序列号77) 表示的恒定区中所包含的Fc区。关于Fc $\gamma$ 受体是否具有与IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体的Fc区结合的活性,可通过FACS、ELISA方式、以及ALPHA筛选 (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)、利用表面等离子体共振 (SPR) 现象的BIACORE法等已知方法进行确认 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010)。

[0261] 利用使用供体和受体的两个微珠的ALPHA技术,依据下述原理实施ALPHA筛选。结合在供体微珠 (donor beads) 上的分子与结合在受体微珠 (acceptor beads) 上的分子发生生物学相互作用,仅在两个微珠接近的状态时检测到发光信号。经激光激发的供体微珠内的光敏剂转化为单线态氧 (singlet oxygen) (其周边的氧为激发状态)。单线态氧向供体微珠周边扩散,到达接近的受体微珠时,引起微珠内的化学发光反应,最终发出光。结合在供

体微珠上的分子不与结合在受体微珠上的分子相互作用时,供体微珠产生的单线态氧不能到达受体微珠,因此,不发生化学发光反应。

[0262] 例如,包含经生物素标记的Fc区的抗GPC3抗体结合在供体微珠上,用谷胱甘肽S转移酶(GST)标签化的Fc $\gamma$ 受体结合在受体微珠上。不存在包含竞争的Fc区修饰体的抗GPC3抗体时,具有天然型Fc区的抗GPC3抗体与Fc $\gamma$ 受体发生相互作用,产生520-620nm的信号。包含未经标签化的Fc区修饰体的抗GPC3抗体,在具有天然型Fc区的抗GPC3抗体与Fc $\gamma$ 受体之间的相互作用中进行竞争。竞争的结果表现为测到的荧光的量减少,据此可确定相对结合亲和性。使用Sulfo-NHS-生物素等将抗体生物素化是已知的。作为用GST将Fc $\gamma$ 受体标签化的方法,可适当地采用下述方法:将编码Fc $\gamma$ 受体的多核苷酸和编码GST的多核苷酸以符合读码框的方式融合而成的融合基因在保持于以可发挥作用的方式连接的载体上的细胞等中表达,使用谷胱甘肽柱进行纯化的方法等。使用例如GRAPHPAD PRISM(GraphPad公司, San Diego)等软件,使得到的信号符合利用非线性回归分析的单位点竞争性(one-site competition)模型,由此可合适地对该信号进行分析。

[0263] 将用于观察相互作用的物质中的一方(配体)固定在传感器芯片的金薄膜上,照射光,使得从传感器芯片的背面侧起、在金薄膜与玻璃的界面发生全反射时,反射光的一部分中形成反射强度降低的部分(SPR信号)。使用于观察相互作用的物质中的另一方(待分析物)通过传感器芯片的表面,配体与待分析物结合时,被固定化的配体分子的质量增加,传感器芯片表面的溶剂的折射率发生变化。由于该折射率的变化,使得SPR信号的位置移动(反之,结合发生解离时,信号返回原位)。在Biacore系统中,将上述位移量、即传感器芯片表面上的质量变化作为纵轴,将质量的时间变化表示为测定数据(传感图(sensorgram))。根据传感图的曲线求出动力学:结合速度常数( $k_a$ )和解离速度常数( $k_d$ ),根据该常数之比求出亲和性(affinity)(KD)。BIACORE法中,也可以合适地采用阻碍测定法。阻碍测定法的例子记载于Lazor et.al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(2006)103(11),4005-4010中。

#### [0264] Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)结合修饰Fc区

[0265] 作为本发明的抗GPC3抗体包含的Fc区,除了人IgG1(序列号74)、人IgG2(序列号75)、人IgG3(序列号76)或人IgG4(序列号77)表示的恒定区中所包含的Fc区以外,也可以适当地使用Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区(其对Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于天然型人IgG的Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性)。本说明书中,所谓“天然型人IgG的Fc区”,是指结合在序列号74、75、76或77示例的人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区中所包含的Fc区的EU编号第297位的糖链为含岩藻糖的糖链的Fc区。上述Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区可通过对天然型人IgG的Fc区的氨基酸进行修饰来制作。关于Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区对Fc $\gamma$ R的结合活性是否高于天然型人IgG的Fc区对Fc $\gamma$ R的结合活性,可采用上述FACS、ELISA方式、以及ALPHA筛选(AMPLIFIED LUMINESCENT PROXIMITY HOMOGENEOUS ASSAY)、利用表面等离子体共振(SPR)现象的BIACORE法等已知方法适当地进行确认。

[0266] 本发明中,所谓Fc区的“氨基酸的修饰”或“氨基酸修饰”,包括修饰成为与起始Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。起始Fc区的修饰体只要能在pH中性区域中与人Fc $\gamma$ 受体结合即可,任意Fc区均可作为起始Fc区使用。此外,将已加以修饰的Fc区作为起始Fc区、进行了进一步修饰的Fc区,也可合适地作为本发明的Fc区使用。所谓起始Fc区,可表示多肽自身、包含起始Fc区的组合物、或编码起始Fc区的氨基酸序列。起始Fc区中可包含在抗

体的项目中概述过的、通过重组而产生的已知的Fc区。起始Fc区的来源没有限定,可从非人类动物中的任意生物或从人获得。优选地,作为任意生物,可优选举出选自小鼠、大鼠、土拨鼠、仓鼠、沙鼠、猫、兔、狗、山羊、绵羊、牛、马、骆驼及非人灵长类中的生物。其他形式中,起始Fc区还可从食蟹猴、狨、猕猴、黑猩猩或人获得。虽然起始Fc区优选从人IgG1获得,但并不限于IgG的特定类别。这表示可适当地使用人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区作为起始Fc区。同样地,在本说明书中意味着,可以将来自所述任意生物的IgG的任意类别或亚类的Fc区优选地用作起始Fc区。天然存在的IgG的变体或经处置的形式的例子被记载于已知的文献(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;国际公开W02009/086320、W02008/092117、W02007/041635及W02006/105338)中,但并不限于那些。

[0267] 作为修饰的例子,包括一个以上的突变,例如,被取代为与起始Fc区的氨基酸不同的氨基酸残基的突变,或者向起始Fc区的氨基酸中插入一个以上的氨基酸残基、或从起始Fc区的氨基酸中缺失一个以上的氨基酸等。优选地,修饰后的Fc区的氨基酸序列中包含含有天然不产生的Fc区的至少一部分的氨基酸序列。这类变体必然与起始Fc区具有低于100%的序列同一性或相似性。在优选的实施方式中,变体与起始Fc区的氨基酸序列具有约75%~低于100%的氨基酸序列同一性或相似性,更优选具有约80%~低于100%、更优选约85%~低于100%、更优选约90%~低于100%、最优选约95%~低于100%的氨基酸序列同一性或相似性。在本发明的一种非限定性的实施方式中,起始Fc区与本发明的Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区之间存在至少1个氨基酸的差异。起始Fc区与本发明的Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区的氨基酸的区别,还可合适地通过特别是由上文所述EU编号规定的氨基酸残基位置上的特定的氨基酸的区别来确定。

[0268] 为了对Fc区的氨基酸进行修饰,可适当地采用位点定向诱变法(Kunkel et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1985) 82,488-492)、重叠延伸PCR(Overlap extension PCR)等已知方法。此外,作为取代为天然的氨基酸以外的氨基酸的氨基酸的修饰方法,可采用多种已知方法(Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.(2006) 35,225-249; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (2003) 100 (11) ,6353-6357)。例如,还可合适地使用含有tRNA的无细胞翻译系统(Clover Direct (Protein Express))等,所述无细胞翻译系统中,非天然氨基酸结合在UAG密码子(琥珀密码子,其为终止密码子之一)的互补的琥珀抑制基因tRNA上。

[0269] 本发明的抗原结合分子所包含的、对Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于天然型人IgG的Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性的Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区,可通过任意方法获得,具体而言,可通过对用作起始Fc区的人IgG型免疫球蛋白的氨基酸进行修饰来获得该Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区。作为用于进行修饰的优选的IgG型免疫球蛋白的Fc区,可举出例如序列号74、75、76或77示例的人IgG(IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4、及它们的修饰体)的恒定区中所包含的Fc区。

[0270] 关于对其他氨基酸的修饰,只要对Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于天然型人IgG的Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性,则可对任意位置的氨基酸进行修饰。抗原结合分子包含人IgG1的Fc区作为人Fc区时,优选包含带来下述效果的修饰,所述效果为:与结合在EU编号第297位上的糖链为含岩藻糖的糖链的天然型人IgG的Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性相比,修饰后的Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性更高。作为如上所述进行的氨基酸修饰,在例如国际公开

W02007/024249、W02007/021841、W02006/031370、W02000/042072、W02004/029207、W02004/099249、W02006/105338、W02007/041635、W02008/092117、W02005/070963、W02006/020114、W02006/116260及W02006/023403等中已有报道。

[0271] 作为可进行上述修饰的氨基酸,例如可举出选自EU编号表示的第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位及440位中的至少一个以上的氨基酸。通过上述氨基酸的修饰,能够获得对Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于天然型人IgG的Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性的Fc区(Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区)。

[0272] 为了用于本发明,作为特别优选的修饰,例如可举出Fc区的由EU编号表示的下述氨基酸组中的至少一个以上的氨基酸的修饰,所述氨基酸组包括:

[0273] 第221位的氨基酸为Lys或Tyr中的任一个,

[0274] 第222位的氨基酸为Phe、Trp、Glu或Tyr中的任一个,

[0275] 第223位的氨基酸为Phe、Trp、Glu或Lys中的任一个,

[0276] 第224位的氨基酸为Phe、Trp、Glu或Tyr中的任一个,

[0277] 第225位的氨基酸为Glu、Lys或Trp中的任一个,

[0278] 第227位的氨基酸为Glu、Gly、Lys或Tyr中的任一个,

[0279] 第228位的氨基酸为Glu、Gly、Lys或Tyr中的任一个,

[0280] 第230位的氨基酸为Ala、Glu、Gly或Tyr中的任一个,

[0281] 第231位的氨基酸为Glu、Gly、Lys、Pro或Tyr中的任一个,

[0282] 第232位的氨基酸为Glu、Gly、Lys或Tyr中的任一个,

[0283] 第233位的氨基酸为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个,

[0284] 第234位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个,

[0285] 第235位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个,

[0286] 第236位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个,

[0287] 第237位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个,

[0288] 第238位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个,

- [0289] 第239位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0290] 第240位的氨基酸为Ala、Ile、Met或Thr中的任一个，
- [0291] 第241位的氨基酸为Asp、Glu、Leu、Arg、Trp或Tyr中的任一个，
- [0292] 第243位的氨基酸为Leu、Glu、Leu、Gln、Arg、Trp或Tyr中的任一个，
- [0293] 第244位的氨基酸为His，
- [0294] 第245位的氨基酸为Ala，
- [0295] 第246位的氨基酸为Asp、Glu、His或Tyr中的任一个，
- [0296] 第247位的氨基酸为Ala、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、Val或Tyr中的任一个，
- [0297] 第249位的氨基酸为Glu、His、Gln或Tyr中的任一个，
- [0298] 第250位的氨基酸为Glu或Gln中的任一个，
- [0299] 第251位的氨基酸为Phe，
- [0300] 第254位的氨基酸为Phe、Met或Tyr中的任一个，
- [0301] 第255位的氨基酸为Glu、Leu或Tyr中的任一个，
- [0302] 第256位的氨基酸为Ala、Met或Pro中的任一个，
- [0303] 第258位的氨基酸为Asp、Glu、His、Ser或Tyr中的任一个，
- [0304] 第260位的氨基酸为Asp、Glu、His或Tyr中的任一个，
- [0305] 第262位的氨基酸为Ala、Glu、Phe、Ile或Thr中的任一个，
- [0306] 第263位的氨基酸为Ala、Ile、Met或Thr中的任一个，
- [0307] 第264位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp或Tyr中的任一个，
- [0308] 第265位的氨基酸为Ala、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0309] 第266位的氨基酸为Ala、Ile、Met或Thr中的任一个，
- [0310] 第267位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0311] 第268位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、Val或Trp中的任一个，
- [0312] 第269位的氨基酸为Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0313] 第270位的氨基酸为Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp或Tyr中的任一个，
- [0314] 第271位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0315] 第272位的氨基酸为Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0316] 第273位的氨基酸为Phe或Ile中的任一个，
- [0317] 第274位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，

- [0318] 第275位的氨基酸为Leu或Trp中的任一个，
- [0319] 第276位的氨基酸为、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0320] 第278位的氨基酸为Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Trp中的任一个，
- [0321] 第279位的氨基酸为Ala，
- [0322] 第280位的氨基酸为Ala、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、Trp或Tyr中的任一个，
- [0323] 第281位的氨基酸为Asp、Lys、Pro或Tyr中的任一个，
- [0324] 第282位的氨基酸为Glu、Gly、Lys、Pro或Tyr中的任一个，
- [0325] 第283位的氨基酸为Ala、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg或Tyr中的任一个，
- [0326] 第284位的氨基酸为Asp、Glu、Leu、Asn、Thr或Tyr中的任一个，
- [0327] 第285位的氨基酸为Asp、Glu、Lys、Gln、Trp或Tyr中的任一个，
- [0328] 第286位的氨基酸为Glu、Gly、Pro或Tyr中的任一个，
- [0329] 第288位的氨基酸为Asn、Asp、Glu或Tyr中的任一个，
- [0330] 第290位的氨基酸为Asp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、Trp或Tyr中的任一个，
- [0331] 第291位的氨基酸为Asp、Glu、Gly、His、Ile、Gln或Thr中的任一个，
- [0332] 第292位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Pro、Thr或Tyr中的任一个，
- [0333] 第293位的氨基酸为Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0334] 第294位的氨基酸为Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0335] 第295位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0336] 第296位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr或Val中的任一个，
- [0337] 第297位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0338] 第298位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0339] 第299位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0340] 第300位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Trp中的任一个，
- [0341] 第301位的氨基酸为Asp、Glu、His或Tyr中的任一个，
- [0342] 第302位的氨基酸为Ile，
- [0343] 第303位的氨基酸为Asp、Gly或Tyr中的任一个，
- [0344] 第304位的氨基酸为Asp、His、Leu、Asn或Thr中的任一个，
- [0345] 第305位的氨基酸为Glu、Ile、Thr或Tyr中的任一个，
- [0346] 第311位的氨基酸为Ala、Asp、Asn、Thr、Val或Tyr中的任一个，

- [0347] 第313位的氨基酸为Phe，
- [0348] 第315位的氨基酸为Leu，
- [0349] 第317位的氨基酸为Glu或Gln，
- [0350] 第318位的氨基酸为His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val或Tyr中的任一个，
- [0351] 第320位的氨基酸为Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0352] 第322位的氨基酸为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0353] 第323位的氨基酸为Ile，
- [0354] 第324位的氨基酸为Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0355] 第325位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0356] 第326位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0357] 第327位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0358] 第328位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0359] 第329位的氨基酸为Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0360] 第330位的氨基酸为Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0361] 第331位的氨基酸为Asp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0362] 第332位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0363] 第333位的氨基酸为Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Val或Tyr中的任一个，
- [0364] 第334位的氨基酸为Ala、Glu、Phe、Ile、Leu、Pro或Thr中的任一个，
- [0365] 第335位的氨基酸为Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr中的任一个，
- [0366] 第336位的氨基酸为Glu、Lys或Tyr中的任一个，
- [0367] 第337位的氨基酸为Glu、His或Asn中的任一个，
- [0368] 第339位的氨基酸为Asp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser或Thr中的任一个，
- [0369] 第376位的氨基酸为Ala或Val中的任一个，
- [0370] 第377位的氨基酸为Gly或Lys中的任一个，
- [0371] 第378位的氨基酸为Asp，

- [0372] 第379位的氨基酸为Asn，
- [0373] 第380位的氨基酸为Ala、Asn或Ser中的任一个，
- [0374] 第382位的氨基酸为Ala或Ile中的任一个，
- [0375] 第385位的氨基酸为Glu，
- [0376] 第392位的氨基酸为Thr，
- [0377] 第396位的氨基酸为Leu，
- [0378] 第421位的氨基酸为Lys，
- [0379] 第427位的氨基酸为Asn，
- [0380] 第428位的氨基酸为Phe或Leu中的任一个，
- [0381] 第429位的氨基酸为Met，
- [0382] 第434位的氨基酸为Trp，
- [0383] 第436位的氨基酸为Ile，或
- [0384] 第440位的氨基酸为Gly、His、Ile、Leu或Tyr中的任一个。
- [0385] 此外，被修饰的氨基酸数量没有特别限定，可以仅修饰一个位置的氨基酸，也可以修饰两个位置以上的氨基酸。作为两个位置以上的氨基酸的修饰的组合，例如可举出表3（表3-1～表3-3）所示那样的组合。此外，包含对Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于天然型人IgG的Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性的Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区（Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区）的抗GPC3抗体的具体例子，记载于W02007/047291中。

[0386] [表3-1]

[0387]

氨基酸的组合	氨基酸的组合
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/P363L/D270E	S304T/I332E
R255L/P396L/D270E/Y300L	S324G/I332D
F243L/D270E/K392N/P396L	S324G/I332E
F243L/R255L/D270E/P396L	S324I/I332D
F243L/R292P/Y300L/V3051/P396L	S324I/I332E
F243L/R292P/Y300L/P396L	T260H/I332E
F243L/R292P/Y300L	T335D/I332E
F243L/R292P/P396L	V240I/V266I
F243L/R292P/V3051	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/I332B	N297D/T299I/I332E
A330Y/I332E	N297D/T299L/I332E
E258H/I332E	N297D/I299V/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/V2621	S239D/I332E/A327A
F241W/F243W	S239D/I332E/A330I

[0388] [表3-2]

[0389]

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	I332B/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

[0390] [表3-3]

[0391]

I328Y/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/B233D	S239D/D265I/N297D/I332E
Q295E/I332B	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/V262B/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	

[0392] 测定本发明的抗GPC3抗体所包含的Fc $\gamma$ 受体结合结构域与Fc $\gamma$ 受体的结合活性的pH条件,可适当地使用pH酸性区域至pH中性区域的条件。作为测定本发明的抗原结合分子所包含的Fc $\gamma$ 受体结合结构域与Fc $\gamma$ 受体的结合活性的条件的pH酸性区域至pH中性区域,通常是指pH5.8~pH8.0。优选为pH6.0~pH7.4中的任意pH值所表示的范围,优选从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及7.4中选择,特别优选为与癌组织的pH相近的pH6.15~7.4(Vaupel et al., Cancer Res. (1989) 49, 6449-6665)。作为测定条件中使用的温度,可在10℃~50℃中的任意温度下评价Fc区与人Fc $\gamma$ 受体的结合亲和性。优选地,为了确定Fc区与人Fc $\gamma$ 受体的结合亲和性,使用15℃~40℃的温度。更优选地,20℃~35℃中的任意温度(如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34及35℃中的任一温度)也同样可用于确定Fc区与Fc $\gamma$ 受体的结合亲和性。25℃的温度是本发明实施方式的一个非限定性的例子。

[0393] 本说明书中,所谓Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于天然型Fc区对Fc $\gamma$ 受体的结合活性,是指Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区对Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIa和/或Fc $\gamma$ RIIIb中的任一种人Fc $\gamma$ 受体的结合活性均高于天然型Fc区对这些人Fc $\gamma$ 受体的结合活性。例如,是指基于上述分析方法,与作为对照的包含人IgG的天然型Fc区的抗GPC3抗体的结合活性相比较而言,包含Fc $\gamma$ R结合修饰Fc区的抗GPC3抗体的结合活性显示为105%以上、优选110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特别优选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倍以上的结合活性。作为天然型Fc区,可以使用起始Fc区,也可以使用相同亚类的抗体的天然型Fc区。

[0394] 本发明中,作为用作对照的人IgG的天然型Fc区,可合适地使用结合在EU编号表示的第297位的氨基酸上的糖链为含岩藻糖的糖链的天然型人IgG的Fc区。可采用已知方法来确认结合在EU编号表示的第297位的氨基酸上的糖链是否为含岩藻糖的糖链。例如,可通过下述方法判定结合在天然型人IgG的Fc区的糖链是否为含岩藻糖的糖链。使N-糖苷酶F(N-Glycosidase F)(Roche diagnostics)与被检测的天然型人IgG反应,由此使糖链从被检测的天然型人IgG游离出来(Weitzhandler et al., J. Pharma. Sciences (1994) 83, 12, 1670-1675)。然后,使其与乙醇反应从而除去蛋白质,将所得的反应液(Schenk et al., J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695)的浓缩干固体物用2-氨基苯甲酰胺进行荧光标记(Bigge et al., Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238)。对于通过使用纤维素固相萃取柱(Cellulose Cartridge)的固相萃取进行过脱试剂的、经荧光标记的2-AB化糖链,采用正相色谱法进行分析。通过对测得的色谱图中的峰进行观察,能够判定结合在人IgG的天然型Fc区的糖链是否为含岩藻糖的糖链。

[0395] 作为用作对照的包含相同亚类的抗体的天然型Fc区的抗GPC3抗体,可适当地使用具有IgG单克隆抗体的Fc区的抗GPC3抗体。作为该Fc区的结构,可示例序列号74(在数据库

注册编号AAC82527.1的N末端加成A)、75(在数据库注册编号AAB59393.1的N末端加成A)、76(数据库注册编号CAA27268.1)及77(在数据库注册编号AAB59394.1的N末端加成A)中记载的恒定区中所包含的Fc区。此外,将某特定的同种型的抗GPC3抗体用作被检物质时,通过将该特定的同种型的抗GPC3抗体用作对照,能够验证由包含受试Fc区的抗GPC3抗体产生的对Fc $\gamma$ 受体的结合活性的效果。如上所述,可适当地选择包含已证实对Fc $\gamma$ 受体的结合活性高的Fc区的抗GPC3抗体。

[0396] 对活性型Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于对抑制型Fc $\gamma$ 受体的结合活性的Fc区

[0397] 如上文所述,作为活性型Fc $\gamma$ 受体,可优选出包含Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIb和Fc $\gamma$ RIc的Fc $\gamma$ RI(CD64),包含Fc $\gamma$ RIIa及同种型Fc $\gamma$ RIIIa(包含同种异型V158和F158)和Fc $\gamma$ RIIIb(包含同种异型Fc $\gamma$ RIIIb-NA1和Fc $\gamma$ RIIIb-NA2)的Fc $\gamma$ RIII(CD16)。此外,Fc $\gamma$ RIIb(包含Fc $\gamma$ RIIb-1和Fc $\gamma$ RIIb-2)可列举为抑制型Fc $\gamma$ 受体的优选例。

[0398] 作为本发明的一种非限定性的实施方式,可举出包含下述Fc区的抗GPC3抗体,所述Fc区对活性型Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于其对抑制型Fc $\gamma$ 受体的结合活性。该情况下,所谓对活性型Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于对抑制型Fc $\gamma$ 受体的结合活性,是指Fc区对Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIIa和/或Fc $\gamma$ RIIIb中的任一种人Fc $\gamma$ 受体的结合活性均高于对Fc $\gamma$ RIIb的结合活性。例如,是指基于上述分析方法,包含Fc区的抗原结合分子对Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIIa和/或Fc $\gamma$ RIIIb中的任一种人Fc $\gamma$ 受体的结合活性,均显示为对Fc $\gamma$ RIIb的结合活性的105%以上、优选110%以上、120%以上、130%以上、140%以上、特别优选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倍以上的结合活性。包含这样的Fc区的IgG抗体的上述ADCC活性增强是已知的,因此,包含该Fc区的抗GPC3抗体可用作为本发明的GPC3靶向治疗剂。

[0399] 在本发明的一种非限定性的实施方式中,作为对活性型Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于对抑制型Fc $\gamma$ 受体的结合活性的(对活性型Fc $\gamma$ 受体具有选择性结合活性的)Fc区的例子,可优选出上述选自EU编号表示的第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位及440位中的至少一个以上的氨基酸被修饰为与天然型Fc区不同的氨基酸的Fc区。

[0400] 在本发明的一种非限定性的实施方式中,作为对活性型Fc $\gamma$ 受体的结合活性高于对抑制型Fc $\gamma$ 受体的结合活性的(对活性型Fc $\gamma$ 受体具有选择性结合活性的)Fc区的例子,可优选出表3-1~3-3中记载的复数个氨基酸被修饰为与天然型Fc区不同的氨基酸的Fc

区。

[0401] 糖链经修饰的Fc区

[0402] 作为本发明提供的抗GPC3抗体所包含的Fc区,还可包括以下述方式进行了修饰的Fc区,所述方式为:结合在Fc区的糖链的组成中的结合有岩藻糖缺陷的糖链的Fc区的比例增高、或者添加有截开型N-乙酰氨基葡萄糖的Fc区的比例增高的方式。已知从结合在抗体Fc区的N-糖苷键复合型糖链还原末端的N-乙酰氨基葡萄糖中除去岩藻糖残基时,该Fc区对Fc $\gamma$ RIIIa的亲性增强(Sato et al.,Expert Opin.Biol.Ther.(2006)6(11),1161-1173)。包含这样的Fc区的IgG1抗体的上述ADCC活性增强是已知的,因此,包含该Fc区的抗原结合分子也可用作为本发明的医药组合物中包含的抗原结合分子。作为从结合在抗体Fc区的N-糖苷键复合型糖链还原末端的N-乙酰氨基葡萄糖中除去了岩藻糖残基的抗体,例如可举出下述抗体:

[0403] -糖基化被修饰的抗体(国际公开W01999/054342等),

[0404] -添加至糖链上的岩藻糖缺陷的抗体(国际公开W02000/061739、W02002/031140、W02006/067913等)。

[0405] 此外,包含以结合在Fc区的糖链的组成中的结合有岩藻糖缺陷的糖链的Fc区的比例增高、或添加有截开型N-乙酰氨基葡萄糖的Fc区的比例增高的方式进行了修饰的Fc区的抗GPC3抗体的具体例子,记载于W02006/046751及W02009/041062中。

[0406] 更具体而言,作为从结合在抗体Fc区的N-糖苷键复合型糖链还原末端的N-乙酰氨基葡萄糖中除去了岩藻糖残基的抗体的一种不同的非限定性的实施方式,为了制作添加在糖链上的岩藻糖缺陷的抗体(国际公开W02000/061739、W02002/031140、W02006/067913等),制作向糖链上添加岩藻糖的能力低(其为改变了接受糖链修饰的多肽的形成糖链结构的活性的结果)的宿主细胞。通过在该宿主细胞中表达所期望的抗体基因,可以从该宿主细胞的培养液中回收其糖链中的岩藻糖缺陷的该抗体。作为形成多肽的糖链结构的活性,可举出选自自由岩藻糖基转移酶(EC 2.4.1.152)、岩藻糖转运蛋白(SLC35C1)、GMD(GDP-甘露糖-4,6-脱水酶)(EC 4.2.1.47)、Fx(GDP-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-表异构酶,4-还原酶)(EC 1.1.1.271)、及GFPP(GDP- $\beta$ -L-岩藻糖焦磷酸化酶)(EC 2.7.7.30)组成的组中的酶或转运蛋白的活性作为非限定性的优选例。上述酶或转运蛋白只要能发挥其活性,则无需规定其结构。本说明书中,将能够发挥上述活性的蛋白质称为功能性蛋白质。作为改变上述活性的方法的一种非限定性的实施方式,可举出上述活性的缺失。为了制作缺失了上述活性的宿主细胞,可适当地采用破坏上述功能性蛋白质的基因从而使其不能发挥功能的方法等已知方法(国际公开W02000/061739、W02002/031140、W02006/067913等)。上述那样缺失了活性的宿主细胞,可通过下述方法制作,所述方法为:破坏CHO细胞、BHK细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、Y0骨髓瘤细胞、P3X63小鼠骨髓瘤细胞、PER细胞、PER.C6细胞、HEK293细胞或杂交瘤细胞等中的内源性的上述功能性蛋白质的基因从而使其不能发挥功能的方法等。

[0407] 具有含有截开型G1cNAc的糖链的抗体(国际公开W02002/079255等)是已知的。在一种非限定性的实施方式中,为了制作具有含有截开型G1cNAc的糖链的抗体,制作表达编码下述功能性蛋白质的基因的宿主细胞,所述功能性蛋白质具有GnTIII( $\beta$ -1,4-甘露糖基-糖蛋白,4- $\beta$ -N-乙酰葡糖胺转移酶)(EC 2.4.1.144)活性或GalT( $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶)(EC 2.4.1.38)活性。在另一种非限定性的合适的实施方式中,制作除表达编码上述功能性

蛋白质的基因之外还共表达下述基因的宿主细胞,所述基因为:编码具有人ManII(甘露糖苷酶II)(3.2.1.114)活性的功能性蛋白质的基因,编码具有GnTI( $\beta$ -1,2-乙酰葡萄糖胺转移酶I)(EC 2.4.1.94)活性的功能性蛋白质的基因,编码具有GnTII( $\beta$ -1,2-乙酰葡萄糖胺转移酶II)(EC 2.4.1.143)活性的功能性蛋白质的基因,编码具有ManI(甘露糖苷酶)(EC 3.2.1.113)活性的功能性蛋白质的基因,及 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶(EC 2.4.1.68)(国际公开W02004/065540)。

[0408] 通过向上文所述向糖链上添加岩藻糖的能力低的宿主细胞、及具有形成包含截开型G1cNAc结构的糖链的活性的宿主细胞中转导包含抗体基因的表达载体,能够分别制作从结合在抗体Fc区的N-糖苷键复合型糖链还原末端的N-乙酰氨基葡萄糖中除去了岩藻糖残基的抗体、及具有含有截开型G1cNAc的糖链的抗体。上述抗体的制造方法也可适用本发明的包含以结合在Fc区的糖链的组成中的结合有岩藻糖缺陷的糖链的Fc区的比例增高、或添加有截开型N-乙酰氨基葡萄糖的Fc区的比例增高的方式进行了修饰的修饰Fc区的抗原结合分子的制造方法。结合在通过上述制造方法制作的本发明的抗原结合分子所包含的Fc区的糖链的组成,可通过上述“Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)结合修饰Fc区”中记载的方法进行确认。

#### [0409] 等电点被改变的抗GPC3抗体

[0410] 作为本发明中使用的抗GPC3抗体的一种非限定性的实施方式,还可示例以其等电点(pI)变化的方式对抗GPC3抗体的氨基酸残基进行了修饰的抗GPC3抗体。作为本发明提供的抗GPC3抗体中的“氨基酸残基的电荷的改变”的优选例,可举出以下改变。作为使pI值增大的改变,可以进行例如选自序列号50表示的抗GPC3抗体的重链可变区中的Kabat编号表示的第43位的Q向K的取代、第52位的D向N的取代、第105位的Q向R的取代中的至少一种取代,改变为例如序列号67表示的氨基酸序列。此外,可以进行例如选自序列号51或序列号66表示的抗GPC3抗体的轻链可变区中的Kabat编号表示的第17位的E向Q的取代、第27位的Q向R的取代、第105位的Q向R的取代中的至少一种取代,改变为例如序列号68表示的氨基酸序列。另一方面,作为使pI值减小的改变,可以进行选自序列号50表示的抗GPC3抗体的重链可变区中的Kabat编号表示的第19位的K向T的取代、第43位的Q向E的取代、第61位的G向E的取代、第62位的K向S的取代、第64位的K向Q的取代、第65位的G向D的取代中的至少一种取代,改变为例如序列号69、序列号71表示的氨基酸序列。此外,可以进行例如选自序列号51或序列号66表示的抗GPC3抗体的轻链可变区中的Kabat编号表示的第24位的R向Q的取代、第27位的Q向E的取代、第74位的K向T的取代、第77位的R向S的取代、第107位的K向E的取代中的至少一种取代,改变为例如序列号70、序列号72、序列号73表示的氨基酸序列。此外,作为使pI值减小的改变,可举出序列号74表示的重链恒定区中的选自EU编号表示的第268位、274位、355位、356位、358位、419位中的至少一个氨基酸的取代。关于上述取代的优选例,可举出例如序列号31表示的重链恒定区的、选自EU编号表示的第268位的H向Q的取代、第274位的K向Q的取代、第355位的R向Q的取代、第356位的D向E的取代、第358位的L向M的取代、第419位的Q向E的取代中的至少一种取代。上述取代的结果,能够构建人抗体的IgG1的恒定区与IgG4的恒定区的嵌合体。即,通过上述取代,能够以不影响经修饰的抗体的免疫原性的方式制作具有所期望的pI的抗体。

#### [0411] 用于降低异质性的修饰

[0412] 序列号74、75、76或77表示的IgG的恒定区中的EU编号表示的第446位的Gly及第

447位的Lys缺陷的IgG恒定区,也可作为本发明的抗GPC3抗体所包含的的恒定区使用。通过同时缺失上述两个氨基酸,能够降低由抗体的重链恒定区的末端导致的异质性。

#### [0413] 抗体的修饰

[0414] 所谓多肽的翻译后修饰,是指针对在多肽的生合成过程中翻译而成的多肽进行的化学修饰。由于抗体的一级结构由多肽形成,因此本发明的抗GPC3抗体中也包括作为抗GPC3抗体的一级结构的多肽接受翻译后修饰的修饰物。多肽的翻译后修饰可大体分类为官能团的加成、多肽或肽的加成(ISG化、SUMO化、泛素化)、氨基酸的化学性质的改变(甲硅烷化或脱胺、脱酰胺)、及结构转化(二硫化、蛋白酶分解)。作为本发明中的翻译后修饰的一种非限定性的实施方式,可举出针对作为多肽形成单位的氨基酸残基的肽加成或官能团加成。作为所述修饰,具体可举出磷酸化(丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬氨酸等)、糖基化(丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸等)、酰基化(赖氨酸)、乙酰化(赖氨酸)、羟基化(赖氨酸、脯氨酸)、异戊烯化(半胱氨酸)、棕榈酰化(半胱氨酸)、烷基化(赖氨酸、精氨酸)、多聚谷氨酰化(polyglutamylation)(谷氨酸)、羧基化(谷氨酸)、多聚甘氨酰化(polyglycylation)(谷氨酸)、瓜氨酸化(精氨酸)、琥珀酰亚胺的形成(天冬氨酸)等。例如,接受了通过N末端的谷氨酰胺的焦谷氨酰化对焦谷氨酸进行的修饰的抗GPC3抗体也当然包括在本发明的抗GPC3抗体中。此外,例如,重链和轻链、或重链彼此之间通过“二硫键”(其是指形成于两个硫原子之间的共价键)相连接的、抗GPC3抗体的翻译后修饰物,也包括在本发明的抗GPC3抗体中。氨基酸中的半胱氨酸所包含的巯基可与第二个巯基形成二硫键或桥联。通常,在IgG分子中,CH1和CL区域通过二硫键连接而形成重链的两个多肽,通过EU编号表示的第226位及229位的半胱氨酸残基之间的二硫键相连接。通过上述那样的二硫键连接的抗GPC3抗体的翻译后修饰物也包括在本发明的抗GPC3抗体中。

#### [0415] GPC3靶向治疗剂疗法

[0416] 所谓“GPC3靶向治疗剂疗法”的用语,是指向患者施予GPC3靶向治疗剂。

[0417] 所谓“GPC3靶向治疗剂疗法对癌症的有效性”或“GPC3靶向治疗剂疗法对癌症有效”的用语,是指对于被诊断为癌症的患者而言,GPC3靶向治疗剂疗法使其产生所期望的或有益的效果。所期望的或有益的效果中可包括下述效果:(1)阻碍癌细胞的进一步生长或扩散;(2)癌细胞的死亡;(3)阻碍癌症的复发;(4)缓和、减少、减轻、阻碍与癌症相关的症状(疼痛等),或降低所述症状的频率;或(5)患者存活率的改善。阻碍癌症的复发中包括,阻碍通过放射线、化学疗法、外科手术或其他技术治疗至今的、癌症的原发部位及周边组织中的癌的生长,以及不存在新的远端部位中的癌的生长。所期望的或有益的效果可以是由患者知觉的效果或他觉性效果中的任一种。例如,患者是人时,人会认识到力气或活力的改善、或疼痛的减少(它们是由患者知觉的改善的征候或对疗法的反应的征候)。或者,基于身体检查、实验参数、肿瘤标志物、或通过X射线拍照的观察结果,临床医生能够发现肿瘤尺寸或肿瘤组织量的减少。临床医生能够观察到的关于对治疗的反应的一些实验征候包括白细胞数、红细胞数、血小板数、红细胞沉降速度及各种酶水平等的试验结果的正常化。进而,临床医生能够观察到可检测到的肿瘤标志物减少。或者,为了对他觉性改善进行评价,可以利用超声波诊断、核磁共振试验及阳电子释放试验等其他试验。

[0418] 作为本发明的GPC3靶向治疗剂疗法的对象的癌,只要是成为靶标的GPC3高度表达的癌,则任何癌均符合。作为上述癌的一个例子,可示例选自乳腺癌、宫颈癌、大肠癌、子宫

体癌、头颈癌、肝癌、肺癌、恶性类癌 (Malignant carcinoid)、恶性神经胶质瘤 (Malignant glioma)、恶性淋巴瘤 (Malignant lymphoma)、恶性黑色素瘤 (Malignant melanoma)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、皮肤癌、胃癌、精巢癌、甲状腺癌、尿路上皮癌等中的癌。

[0419] 确定GPC3靶向治疗剂疗法的有效性的方法、或确定是否继续实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法

[0420] 在本发明的一种非限定性的实施方式中,提供下述方法:对从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者和/或接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度进行监测,当该游离GPC3浓度为规定值时,确定为该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的方法,或者确定为继续实施该疗法的方法。所谓“接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者”,是指被诊断为癌症、且没有被施予上述GPC3靶向治疗剂的经历的患者,进而,对于该患者,可根据上述组织中的GPC3的表达量确定GPC3靶向疗法是有效的。此外,所谓“接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者”,是指具有被施予上述GPC3靶向治疗剂的经历的患者。关于GPC3靶向治疗剂的施予途径,可根据被施予的GPC3靶向治疗剂的性状等适当地选择合适的施予途径。例如,作为施予途径的例子,可示例非经口施予。作为非经口施予的进一步的例子,例如可示例注射施予、经鼻施予、经肺施予、经皮施予。作为例如注射施予的进一步的例子,可示例通过静脉内注射施予、肌肉内注射施予、腹腔内注射施予、皮下注射施予等实施的全身或局部性的施予。

[0421] 在完成本发明以前,下述结果已作为现有技术为人们所知,所述结果为:在从肝癌患者分离的血浆中可检测到游离GPC3,另一方面,在从健康人分离的血浆中则检测不到游离GPC3,所述游离GPC3是在GPC3的多肽序列中的特定部位受到转化酶、磷脂酶D或Notum等的加工后、被分泌至血浆中的(专利文献7等)。依据上述结果,假定GPC3靶向治疗剂疗法有效时,也可推测血清中或血浆中检测到的游离GPC3的浓度将随着治疗的继续而经时性地减少。然而,令人惊异的是,本申请的发明人在上述情况下进行锐意研究的结果表明,从表现为稳定(Stable disease)(即,有对GPC3靶向治疗剂疗法作出反应的可能性)的患者分离的血清中或血浆中的游离GPC3浓度稳定或有所增加,而非减少。此外,还表明,在实施GPC3靶向治疗剂疗法前在血清中或血浆中检测到的游离GPC3的浓度为规定的浓度以上时,GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

[0422] 本发明的一种非限定性的实施方式中,包括监测从上述患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度,这里,该浓度为规定值时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌症是有效的,或者确定继续实施该疗法。规定值可以从0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.3ng/mL、0.4ng/mL、0.5ng/mL、0.6ng/mL、0.7ng/mL、0.8ng/mL、0.9ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、3.0ng/mL、4.0ng/mL、5.0ng/mL、6.0ng/mL、7.0ng/mL、8.0ng/mL、9.0ng/mL、10.0ng/mL、15.0ng/mL、20.0ng/mL、25.0ng/mL、30.0ng/mL、35.0ng/mL、40.0ng/mL、45.0ng/mL、50.0ng/mL、55.0ng/mL、60.0ng/mL、65.0ng/mL、70.0ng/mL、75.0ng/mL、80.0ng/mL、85.0ng/mL、90.0ng/mL、100.0ng/mL等特定值中确定,也可以以数值范围(其将从上述特定值的组中任意选择的特定值作为上限和下限)的形式进行确定。作为那样的数值范围的例子,可从0.1ng/mL至100ng/mL的数值范围中适当地选择。例如,可示例0.1~100ng/mL、0.5~80ng/mL、1.0~60ng/mL、2.0~55ng/mL、3.0~50ng/mL、4.0~45ng/mL、5.0~40ng/mL、6.0~35ng/mL、7.0~30ng/mL、8.0~25ng/mL、9.0~20ng/mL、10~20ng/mL。作为优选的数值范

围,可示例0.1~0.35ng/mL,作为进一步优选的数值范围,可示例0.15~0.3ng/mL,但并不限于这些。游离GPC3浓度的规定值依赖于许多因素、例如、所采用的分析方法、测定游离GPC3的试样类型、试样的保存条件(温度和时间等)、患者的民族特征(identity)等,会略微变化。在上述预测、预想或确定有效的方法、或确定继续实施该疗法的方法中,作为游离GPC3的浓度,测定从患者分离的血液、血浆或血清试样中的浓度。

[0423] 对于上述游离GPC3的浓度,可以在于开始GPC3靶向治疗剂疗法之前和/或开始之后分离的试样中进行测定,但上述浓度也可以使用以规定的时间间隔采集的复数个试样进行测定。以规定的时间间隔采集的复数个试样中的任一个中的游离GPC3浓度为上述规定浓度时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌症是有效的,或者确定继续实施该疗法。规定的时间间隔可适当地进行设定,作为该间隔的一种非限定性的实施方式,可在疗法的开始与终结之间的所有时间点进行采集,所述时间点为:GPC3靶向治疗剂的初次施予后1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日(即1周)、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日(即2周)、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日(即3周)、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日(即4周)、29日、30日、1月、5周、6周、7周、8周、9周、10周、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月后,或者施予1次、2次、3次、4次后,或者施予更长的治疗周期后等。施予间隔即治疗周期可适当地进行设定,例如,可举出1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日(即1周)、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日(即2周)、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日(即3周)、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日(即4周)、29日、30日、1月、5周、6周、7周、8周、9周、10周、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月等作为一个非限定性的例子。

[0424] 在一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。在另一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

[0425] 在一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。在另一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。

[0426] 此外,在本发明的另一种非限定性的实施方式中,可将上述测得的游离GPC3浓度与在开始GPC3靶向治疗剂疗法之前从患者分离的血液、血浆或血清的试样中测定的游离GPC3的浓度(“本底浓度(baseline concentrations)”)进行比较。本实施方式中所谓的游离GPC3浓度的“规定值”,是指从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为该本底浓度以上的情形。即,同一患者中的游离GPC3浓度在接受GPC3靶向治疗剂疗法前后相同或有所增加时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌

症是有效的,或者确定继续实施该疗法。对于接受GPC3靶向治疗剂疗法前后的游离GPC3浓度相同或增加的比例,本领域技术人员可适当地进行选择,并不限于特定的值。作为上述比例,可从1倍至 $10^6$ 倍的数值范围内适当地选择。例如,为1倍以上、1.05倍以上、1.1倍以上、1.2倍以上、1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上、2倍以上、2.1倍以上、2.2倍以上、2.3倍以上、2.4倍以上、2.5倍以上、2.6倍以上、2.7倍以上、2.8倍以上、2.9倍以上、3倍以上、3.1倍以上、3.2倍以上、3.3倍以上、3.4倍以上、3.5倍以上、3.6倍以上、3.7倍以上、3.8倍以上、3.9倍以上、4倍以上、4.1倍以上、4.2倍以上、4.3倍以上、4.4倍以上、4.5倍以上、4.6倍以上、4.7倍以上、4.8倍以上、4.9倍以上、5倍以上、5.1倍以上、5.2倍以上、5.3倍以上、5.4倍以上、5.5倍以上、5.6倍以上、5.7倍以上、5.8倍以上、5.9倍以上、6倍以上、6.1倍以上、6.2倍以上、6.3倍以上、6.4倍以上、6.5倍以上、6.6倍以上、6.7倍以上、6.8倍以上、6.9倍以上、7倍以上、7.1倍以上、7.2倍以上、7.3倍以上、7.4倍以上、7.5倍以上、7.6倍以上、7.7倍以上、7.8倍以上、7.9倍以上、8倍以上、8.1倍以上、8.2倍以上、8.3倍以上、8.4倍以上、8.5倍以上、8.6倍以上、8.7倍以上、8.8倍以上、8.9倍以上、9倍以上、9.1倍以上、9.2倍以上、9.3倍以上、9.4倍以上、9.5倍以上、9.6倍以上、9.7倍以上、9.8倍以上、9.9倍以上、10倍以上、11倍以上、12倍以上、13倍以上、14倍以上、15倍以上、16倍以上、17倍以上、18倍以上、19倍以上、20倍以上、21倍以上、22倍以上、23倍以上、24倍以上、25倍以上、26倍以上、27倍以上、28倍以上、29倍以上、30倍以上、31倍以上、32倍以上、33倍以上、34倍以上、35倍以上、36倍以上、37倍以上、38倍以上、39倍以上、40倍以上、41倍以上、42倍以上、43倍以上、44倍以上、45倍以上、46倍以上、47倍以上、48倍以上、49倍以上、50倍以上、55倍以上、60倍以上、65倍以上、70倍以上、75倍以上、80倍以上、85倍以上、90倍以上、95倍以上、100倍以上、105倍以上、110倍以上、120倍以上、130倍以上、140倍以上、150倍以上、160倍以上、170倍以上、180倍以上、190倍以上、200倍以上、220倍以上、240倍以上、260倍以上、280倍以上、300倍以上、320倍以上、340倍以上、360倍以上、380倍以上、400倍以上、420倍以上、440倍以上、460倍以上、480倍以上、500倍以上、550倍以上、600倍以上、650倍以上、700倍以上、750倍以上、800倍以上、850倍以上、900倍以上、950倍以上、1000倍以上、2000倍以上、3000倍以上、4000倍以上、5000倍以上、6000倍以上、7000倍以上、8000倍以上、9000倍以上、 $10^4$ 倍以上、 $2 \times 10^4$ 倍以上、 $4 \times 10^4$ 倍以上、 $6 \times 10^4$ 倍以上、 $8 \times 10^4$ 倍以上、 $10^5$ 倍以上、 $2 \times 10^5$ 倍以上、 $4 \times 10^5$ 倍以上、 $6 \times 10^5$ 倍以上、 $8 \times 10^5$ 倍以上、或 $10^6$ 倍以上时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌症是有效的,或者确定继续实施该疗法。

[0427] 在一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1个月从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度以上时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。在另一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上~ $10^6$ 倍以上时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

[0428] 在上述的、该游离GPC3浓度为本底浓度以上时、确定该GPC3靶向治疗剂疗法有效的情况下,也可以考虑从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量。即,还包括:对象患者中的游离GPC3浓度为本底浓度以上、且从对象患者分离的

组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为特定的评价分数以上时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。在另一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上~ $10^6$ 倍以上、且从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上时,表明可确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

[0429] 作为从患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式,可示例利用染色法1的染色的结果算出的复合评价分数为高度表达、或低度或中度表达(各IHC总评分为7以上或低于7)。此外,利用染色法2的染色的结果算出的GPC3-IHC分数为1+、2+、3+的情形等,也可以示例为GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式。

[0430] 在一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度以上时,表明可确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。在另一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上~ $10^6$ 倍以上时,表明可确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。

[0431] 在上述的、该游离GPC3浓度为本底浓度以上时、确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法的情况下,也可以考虑从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量。即,还包括:对象患者中的游离GPC3浓度为本底浓度以上、且从对象患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为特定的评价分数以上时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。在另一种非限定性的实施方式中,本方法包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上~ $10^6$ 倍以上、且从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上时,表明可确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。

[0432] 作为从患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式,可示例利用染色法1的染色的结果算出的复合评价分数为高度表达、或低度或中度表达(各IHC总评分为7以上或低于7)。此外,利用染色法2的染色的结果算出的GPC3-IHC分数为1+、2+、3+的情形等,也可以示例为GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式。

#### [0433] 治疗剂及制剂

[0434] 本发明中所谓治疗剂,通常是指用于治疗或预防、或检查·诊断疾病的药剂。此外,本发明中,所谓“用于向从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者施予的GPC3靶向治疗剂”的用语,可以改述为“包括向从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患

者施予GPC3靶向治疗剂的癌症治疗方法”，也可以改述为“用于向从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者施予的GPC3靶向治疗剂在用于治疗癌症的医药的制造中的应用”。此外，本发明中，所谓“用于向从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者进一步施予的GPC3靶向治疗剂”的用语，可以改述为“包括向从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者进一步施予GPC3靶向治疗剂的癌症治疗方法”，也可以改述为“用于向从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者进一步施予的GPC3靶向治疗剂在用于治疗癌症的医药的制造中的应用”。此外，也可以将所谓“从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值”用语改述为“从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的上述游离GPC3浓度，在接受过GPC3靶向治疗剂疗法后有所增大”。

[0435] 可采用本领域技术人员已知的方法将本发明的治疗剂制剂化。例如，可以以与水或其他药学上可容许的液体的无菌性溶液、或悬浮液剂的注射剂的形态非经口性地使用。例如，可以与药理学上容许的载体或介质（具体而言，灭菌水、生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、媒介物(vehicle)、防腐剂、粘合剂等）适当地组合，以通常所允许的制药实施方式中要求的单位用量形态进行混和，由此进行制剂化。上述制剂中的有效分量以能够获得指示范围内的适当的容量的方式进行设定。

[0436] 用于注射的无菌组合物，可使用注射用蒸馏水之类的媒介物按照通常的制剂实施方式进行配合。作为注射用的水溶液，可举出例如包含生理盐水、葡萄糖、其他辅助试剂（例如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇、氯化钠）的等渗溶液。可以并用适当的助溶剂，例如醇（乙醇等）、多元醇（丙二醇、聚乙二醇等）、非离子性表面活性剂（聚山梨醇酯80(TM)、HCO-50等）。

[0437] 作为油性液体，可举出芝麻油、大豆油，也可并用苯甲酸苄酯和/或苄醇作为助溶剂。此外，可以与缓冲剂（例如磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液）、镇痛剂（例如盐酸普鲁卡因）、稳定剂（例如苄醇及苯酚）、抗氧化剂配合。通常将制得的注射液填充至适当的安瓿中。

[0438] 本发明的治疗剂优选通过非经口施予进行施用。例如，可施予注射剂型、经鼻施予剂型、经肺施予剂型、经皮施予型的治疗剂。例如，可通过静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等进行全身或局部性的施予。

[0439] 施予方法可根据患者的年龄、症状适当选择。含有上述治疗剂的医药用制剂的施予量，可设定为例如每一次每1kg体重0.0001mg~1000mg的范围。或者，可设定为例如每位患者0.001~100000mg的施予量，但本发明不一定限定为上述数值。施予量及施予方法根据患者的体重、年龄、症状等的不同而变动，若为本领域技术人员，则能够对上述条件加以考虑而设定适当的施予量及施予方法。例如，作为本发明优选的施予量和施予方法的一个例子，可以以患者的血中谷值成为一定量以上的方式进行施予。作为优选的血中谷值，例如可举出150 $\mu$ g/mL以上、160 $\mu$ g/mL以上、170 $\mu$ g/mL以上、180 $\mu$ g/mL以上、190 $\mu$ g/mL以上、200 $\mu$ g/mL以上、210 $\mu$ g/mL以上、220 $\mu$ g/mL以上、230 $\mu$ g/mL以上、240 $\mu$ g/mL以上、250 $\mu$ g/mL以上、260 $\mu$ g/mL以上、270 $\mu$ g/mL以上、280 $\mu$ g/mL以上、290 $\mu$ g/mL以上、300 $\mu$ g/mL以上、400 $\mu$ g/mL以上。可更优选举出200 $\mu$ g/mL以上。

[0440] 本发明的制剂中包含下述内容的指示书,所述内容为:向从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为规定值的患者进一步施予。此外,在另一种非限定性的实施方式中,包含下述内容的指示书,所述内容为:向从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的癌患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度在在接受过GPC3靶向治疗剂疗法后有所增大的患者进一步施予。

[0441] 在本发明的一种非限定性的实施方式中,提供包含记载有下述内容的指示书的制剂,所述内容为:包括监测从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为规定值时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的,或者确定继续实施该疗法。

[0442] 本发明的一种非限定性的实施方式中,提供包含记载有下述内容的指示书的制剂,所述内容为:包括监测从上述患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度,这里,该浓度为规定值时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌症是有效的,或者确定继续实施该疗法。规定值可以从0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.3ng/mL、0.4ng/mL、0.5ng/mL、0.6ng/mL、0.7ng/mL、0.8ng/mL、0.9ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、3.0ng/mL、4.0ng/mL、5.0ng/mL、6.0ng/mL、7.0ng/mL、8.0ng/mL、9.0ng/mL、10.0ng/mL、15.0ng/mL、20.0ng/mL、25.0ng/mL、30.0ng/mL、35.0ng/mL、40.0ng/mL、45.0ng/mL、50.0ng/mL、55.0ng/mL、60.0ng/mL、65.0ng/mL、70.0ng/mL、75.0ng/mL、80.0ng/mL、85.0ng/mL、90.0ng/mL、100.0ng/mL等特定值中确定,也可以以数值范围(其将从上述特定值的组中任意选择的特定值作为上限和下限)的形式进行确定。作为那样的数值范围的例子,可从0.1ng/mL至100ng/mL的数值范围中适当地选择。例如,可示例0.1~100ng/mL、0.5~80ng/mL、1.0~60ng/mL、2.0~55ng/mL、3.0~50ng/mL、4.0~45ng/mL、5.0~40ng/mL、6.0~35ng/mL、7.0~30ng/mL、8.0~25ng/mL、9.0~20ng/mL、10~20ng/mL。作为优选的数值范围,可示例0.1~0.35ng/mL,作为进一步优选的数值范围,可示例0.15~0.3ng/mL,但并不限于这些。游离GPC3浓度的规定值依赖于许多因素、例如、所采用的分析方法、测定游离GPC3的试样类型、试样的保存条件(温度和时间等)、患者的民族特征(identity)等,会略微变化。在上述预测、预想或确定有效的方法、或确定继续实施该疗法的方法中,作为游离GPC3的浓度,测定从患者分离的血液、血浆或血清试样中的浓度。

[0443] 对于上述游离GPC3的浓度,可以在于开始GPC3靶向治疗剂疗法之前和/或开始之后分离的试样中进行测定,但上述浓度也可以使用以规定的时间间隔采集的复数个试样进行测定。以规定的时间间隔采集的复数个试样中的任一个中的游离GPC3浓度为上述规定浓度时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌症是有效的,或者确定继续实施该疗法。开始GPC3靶向治疗剂疗法之后的试样采集的规定的的时间间隔可适当地进行设定,作为该间隔的一种非限定性的实施方式,可在疗法的开始与终结之间的所有时间点进行采集,所述时间点为:GPC3靶向治疗剂的初次施予后1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日(即1周)、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日(即2周)、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日(即3周)、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日(即4周)、29日、30日、1月、5周、6周、7周、8周、9周、10周、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月后,或者施予1次、2次、3次、4次后,或者施予更长的治疗周期后等。施予间隔即治疗周期可适当地进行设定,例如,可举出1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日(即1周)、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日(即2周)、15日、16日、17

日、18日、19日、20日、21日(即3周)、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日(即4周)、29日、30日、1月、5周、6周、7周、8周、9周、10周、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月等作为一个非限定性的例子。

[0444] 在一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。在另一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

[0445] 在一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。在另一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度在0.1ng/mL至100ng/mL的范围内时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。

[0446] 此外,在本发明的另一种非限定性的实施方式中,可将上述测得的游离GPC3浓度与在开始GPC3靶向治疗剂疗法之前从患者分离的血液、血浆或血清的试样中测定的游离GPC3的浓度(“本底浓度”)进行比较。本实施方式中所谓的游离GPC3浓度的“规定值”,是指从接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的生物学试样中的游离GPC3浓度为该本底浓度以上的情形。即,同一患者中的游离GPC3浓度在接受GPC3靶向治疗剂疗法前后相同或有所增加时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌症是有效的,或者确定继续实施该疗法。对于接受GPC3靶向治疗剂疗法前后的游离GPC3浓度相同或增加的比例,本领域技术人员可适当地进行选择,并不限定于特定的值。作为上述比例,可从1倍至 $10^6$ 倍的数值范围内适当地选择。例如,为1倍以上、1.05倍以上、1.1倍以上、1.2倍以上、1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上、2倍以上、2.1倍以上、2.2倍以上、2.3倍以上、2.4倍以上、2.5倍以上、2.6倍以上、2.7倍以上、2.8倍以上、2.9倍以上、3倍以上、3.1倍以上、3.2倍以上、3.3倍以上、3.4倍以上、3.5倍以上、3.6倍以上、3.7倍以上、3.8倍以上、3.9倍以上、4倍以上、4.1倍以上、4.2倍以上、4.3倍以上、4.4倍以上、4.5倍以上、4.6倍以上、4.7倍以上、4.8倍以上、4.9倍以上、5倍以上、5.1倍以上、5.2倍以上、5.3倍以上、5.4倍以上、5.5倍以上、5.6倍以上、5.7倍以上、5.8倍以上、5.9倍以上、6倍以上、6.1倍以上、6.2倍以上、6.3倍以上、6.4倍以上、6.5倍以上、6.6倍以上、6.7倍以上、6.8倍以上、6.9倍以上、7倍以上、7.1倍以上、7.2倍以上、7.3倍以上、7.4倍以上、7.5倍以上、7.6倍以上、7.7倍以上、7.8倍以上、7.9倍以上、8倍以上、8.1倍以上、8.2倍以上、8.3倍以上、8.4倍以上、8.5倍以上、8.6倍以上、8.7倍以上、8.8倍以上、8.9倍以上、9倍以上、9.1倍以上、9.2倍以上、9.3倍以上、9.4倍以上、9.5倍以上、9.6倍以上、9.7倍以上、9.8倍以上、9.9倍以上、10倍以上、11倍以上、12倍以上、13倍以上、14倍以上、15倍以上、16倍以上、17倍以上、18倍以上、19倍以上、20倍以上、21倍以上、22倍以上、23倍以上、24倍以上、25倍以上、

26倍以上、27倍以上、28倍以上、29倍以上、30倍以上、31倍以上、32倍以上、33倍以上、34倍以上、35倍以上、36倍以上、37倍以上、38倍以上、39倍以上、40倍以上、41倍以上、42倍以上、43倍以上、44倍以上、45倍以上、46倍以上、47倍以上、48倍以上、49倍以上、50倍以上、55倍以上、60倍以上、65倍以上、70倍以上、75倍以上、80倍以上、85倍以上、90倍以上、95倍以上、100倍以上、105倍以上、110倍以上、120倍以上、130倍以上、140倍以上、150倍以上、160倍以上、170倍以上、180倍以上、190倍以上、200倍以上、220倍以上、240倍以上、260倍以上、280倍以上、300倍以上、320倍以上、340倍以上、360倍以上、380倍以上、400倍以上、420倍以上、440倍以上、460倍以上、480倍以上、500倍以上、550倍以上、600倍以上、650倍以上、700倍以上、750倍以上、800倍以上、850倍以上、900倍以上、950倍以上、1000倍以上、2000倍以上、3000倍以上、4000倍以上、5000倍以上、6000倍以上、7000倍以上、8000倍以上、9000倍以上、 $10^4$ 倍以上、 $2 \times 10^4$ 倍以上、 $4 \times 10^4$ 倍以上、 $6 \times 10^4$ 倍以上、 $8 \times 10^4$ 倍以上、 $10^5$ 倍以上、 $2 \times 10^5$ 倍以上、 $4 \times 10^5$ 倍以上、 $6 \times 10^5$ 倍以上、 $8 \times 10^5$ 倍以上、或 $10^6$ 倍以上时,预测、预想或确定GPC3靶向治疗剂疗法对该患者的癌症是有效的,或者确定继续实施该疗法。

[0447] 在一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度以上时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。在另一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上 $\sim 10^6$ 倍以上时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

[0448] 在上述记载有该游离GPC3浓度为本底浓度以上时、确定该GPC3靶向治疗剂疗法有效的内容的指示书中,也可以记载同时考虑从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量。即,也可以记载下述内容:对象患者中的游离GPC3浓度为本底浓度以上、且从对象患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为特定的评价分数以上时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。在另一种非限定性的实施方式中,可以记载下述内容:包括检测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上 $\sim 10^6$ 倍以上、且从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上时,确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的。

[0449] 作为从患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式,可示例利用染色法1的染色的结果算出的复合评价分数为高度表达、或低度或中度表达(各IHC总评分为7以上或低于7)。此外,利用染色法2的染色的结果算出的GPC3-IHC分数为1+、2+、3+的情形等,也可以示例为GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式。

[0450] 在一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法30日后或1月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度以上时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。在

另一种非限定性的实施方式中,上述指示书中记载了下述内容:包括监测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上~ $10^6$ 倍以上时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。

[0451] 在上述记载有该游离GPC3浓度为本底浓度以上时、确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法的内容的指示书中,也可以记载同时考虑从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量。即,也可以记载下述内容:对象患者中的游离GPC3浓度为本底浓度以上、且从对象患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为特定的评价分数以上时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。在另一种非限定性的实施方式中,上述指示书可以记载下述内容:包括检测在开始GPC3靶向治疗剂疗法2个月后、3个月后、4个月后、5个月后或6个月后从接受该疗法的患者分离的血液、血浆或血清中的游离GPC3浓度,该游离GPC3浓度为本底浓度的1倍以上~ $10^6$ 倍以上、且从该患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上时,确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。

[0452] 作为从患者分离的组织、特别是包括肝癌组织在内的癌组织中的GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式,可示例利用染色法1的染色的结果算出的复合评价分数为高度表达、或低度或中度表达(各IHC总评分为7以上或低于7)。此外,利用染色法2的染色的结果算出的GPC3-IHC分数为1+、2+、3+的情形等,也可以示例为GPC3的表达量为规定的组织免疫染色评分以上的情形的一种非限定性的实施方式。

[0453] 以下通过实施例更具体地说明本发明,但本发明并不限于这些实施例。

[0454] 实施例

[0455] [实施例1]

[0456] GC33是能够以高亲和力与人GPC3结合的基因重组人源化IgG1单克隆抗体(WO2006/006693)。为了确认GC33在进行性和/或复发性肝细胞癌(HCC)患者中的剂量限制性毒性(Dose Limiting Toxicity)(DLT),在多中心实施了I期临床试验(GC-001US试验)。在以确认在进行性和/或复发性HCC患者中的安全性和/或耐受性的、探索GC33的药物动力学特性(pharmacokinetics profile)、抗肿瘤效果及生物标志物(biomarker)为目的的本试验中,通过静脉注射(采用每周1次的滴注)向HCC患者施予GC33(2.5mg/kg~20mg/kg)。

[0457] 进行上述施予研究的HCC患者患有经组织学或细胞学确认的、不适用外科手术和/或治愈性治疗的进行性或转移性的HCC。合格患者至少为18岁,美国东海岸癌症临床试验组织·体能状态评分(Performance Status)为0或1,且Child-Pugh分级为A或B级。此外,具有至少1种可依据实体肿瘤的治疗效果基准(RECIST)进行评价的病变。作为其他基准,评价了可用于GPC3免疫组织染色(GPC3-IHC)的HCC肿瘤组织(针活检标本)的提供、适当的造血功能(嗜中性粒细胞绝对数 $\geq 1500$ 个/ $\mu\text{l}$ ,血小板 $\geq 50000$ 个/ $\mu\text{l}$ )、肝功能(总胆红素 $\leq$ 正常的3倍,天冬氨酸氨基转移酶及谷丙转氨酶 $\leq$ 正常的5倍,PT-INR $\leq 2.0$ )、及肾功能(血清肌酐 $\leq$ 正常的2倍)。下述患者为登记的排除对象,所述患者为:孕妇、哺乳期的妇女或妊娠检查呈阳性(妊娠检查以自登记日起12个月以内有过月经的女性为对象)的患者、无意采用适当的避孕法的患者、HIV抗体阳性患者、患有HBV或HCV以外的需要治疗的活动性感染症的患

者、患有无病期间不满5年的其他活动性恶性肿瘤的患者、具有移植的既往使的患者、可观察到伴有症状的脑转移的患者、具有给同意或理解临床试验的实施带来障碍的中枢神经系统障碍或其他精神障碍的患者、表现出由肝性脑病引起的中枢神经系统的症状的患者、已知对其他抗体药品或利用CHO细胞制造的药品具有过敏性的患者。此外,在GPC3靶向治疗剂施予前的4周以内接受过包括主要的外科手术、放射线疗法、其他化学疗法在内的治疗的患者、在2周以内接受过利用索拉非尼的治疗的患者或在1周以内接受过针活检的患者,虽然为GPC3靶向治疗剂疗法登记的排除对象,但在规定期间的清洗期(wash-out)以后实施了GPC3靶向治疗。试验规程按照药品临床试验实施基准指南实施,并获得了各自加入的临床试验伦理审查委员会的批准。所有患者均在登记前签署了书面的知情同意书。将4次施予GC33作为1个周期,只要未表现出疾病的发展或不能容许的毒性,则继续向患者施予GC33。以基线水平(baseline)对肿瘤实施评价,到疾病发展为止每2个周期进行反复评价。疾病的状态由临床试验负责医生进行评价。

[0458] HCC肿瘤组织中的GPC3蛋白质的表达,通过GPC3组织免疫染色(GPC3-IHC)进行评价。在美国Charles River Laboratory实施GPC3-IHC的中央检测。对HCC肿瘤组织的未染色切片(slide)(其是利用由各医院通过针活检摘出后、经福尔马林固定及石蜡法包埋的肿瘤块制备的)实施了免疫组织染色。在美国Charles River Laboratory进行测定时的抗原修复法等组织染色的方法以W02009/116659中记载的方法为准。作为抗体,使用了小鼠GC33抗体,作为阴性对照抗体,使用了小鼠IgG2a抗体(W02006/006693)。

[0459] 关于在Charles River Laboratory实施的GPC3-IHC(染色法1),将按表4所示的基准算出的、阳性细胞率(Positive cell rate:PR)、细胞质或细胞膜中的染色强度(Staining intensity of cytoplasm:SI-cp, Staining intensity of cell membrane:SI-cm)及细胞膜染色模式(Staining pattern of cell membrane:Sp-cm)的各自的评分基于式1及式2的计算式加和,对染色后的各标准样品进行评价。各染色标准样品的评价通过3名病理医生进行同行评审会议(Peer review meeting)而最终确定。

[0460] [表4]

[0461]

基准	评价	分数
阳性细胞率 (PR)	0	0
	1%以上且小于 20%	1
	20%以上且小于 50%	2
	50%以上	3
染色强度 (SI) · 细胞质 (SI-cp) · 细胞膜 (SI-cm)	轻微阳性	0
	弱阳性	1
	伴有中度阳性和/或强阳性的弱阳性	2
	中度阳性	3
	强阳性	4
细胞膜染色性 (SP-cm)	阴性	0
	细胞膜仅一部分染色	1
	几乎所有细胞的细胞膜的一部分及一部分细胞的细胞膜的圆周状的染色	2
	几乎所有细胞的细胞膜的圆周状的染色	3

[0462] (评价Sp-Cm时,对使用4倍或10倍物镜的镜下的视野中的细胞的染色进行了评价。)

[0463] [式3]

[0464]  $IHC\text{总计} = PR + SI - Cp + SI - Cm + Sp - Cm$ 

[0465] 在本试验中登记并实施了施予的20个病例中,有1个病例无法获得标本,有3个病例未含有对进行评价而言足够的肿瘤细胞,因此,最终有16个病例能够进行评价。将通过采用高压釜法的抗原修复法进行的染色中的IHC总评分以最大值(14)的二分之一即7的上下分为两组,此时的各病例的评价结果示于表5及图1。

[0466] [表5]

[0467]

通过GPC-IHC进行的评价 (IHC总评分)	患者人数 (在总数20中所占的比例)
高度表达 (7以上)	9 (45%)
低度或中度表达 (低于7)	7 (35%)
无法评价	4 (20%)

[0468] [实施例2]

[0469] 对GPC3靶向治疗中由GC33的施予产生的抗肿瘤效果进行了评价。如上所述施予了GC33的20个病例的施予期间示于图2。对病情进行了评价,结果在4个病例中观察到了5个月以上的病情稳定状态(Stable disease:SD)。

[0470] 调查了肿瘤组织中的GPC3的表达与GC33的抗肿瘤效果的相关性。示出了GPC3-IHC的评价得以进行的16个病例的IHC总评分与施予期间的相关性,结果,获得了下述结果:按IHC总评分为7以上、或小于7分成两组时,观察到了5个月以上的长期SD的病例全部包含在高值组中,且长期SD病例在高值组中占有的比例也较高(表6)。

[0471] [表6]

[0472]

IHC 总评分	高值组		低值组	
6 以上	36%	( 4/11 )	0%	( 0/5 )
7 以上	44%	( 4/9 )	0%	( 0/7 )
8 以上	50%	( 3/6 )	10%	( 1/10 )
9 以上	50%	( 2/4 )	17%	( 2/12 )

[0473]

10 以上	50%	( 1/2 )	21%	( 3/14 )
-------	-----	---------	-----	----------

[0474] 然后,比较了IHC总评分为7以上的组与总评分低于7的组的未恶化生存期(PFS: Progression-free survival),结果在总评分为7以上的组中明显地确认到了PFS较长(图3)。

[0475] 此外,使用在上述中进行了评价的肿瘤检体的一部分,补充评价了GPC3-IHC。使用BenchMark自动染色装置(Ventana Medical Systems Inc.制),按照抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3小鼠GC33一级单克隆抗体(anti-glypican 3Mouse GC33Monoclonal Primary Antibody)(Ventana Medical System Inc.)所附的指示书,由美国Ventana Medical System对得到的14例标本实施了染色的中央测定。在由Ventana Medical System实施的GPC3-IHC(染色法2)中,按照所附的指示书进行染色后,根据肿瘤细胞的染色比例、强度等采用0~3+的4个级别进行评分分化,得到了表7所示的分布。

[0476] [表7]

[0477]

GPC3-IHC评分	患者人数(在14个可评价例中所占的比例)
3+	3(21.4%)
2+	1(7.1%)
1+	7(50%)
0	3(21.4%)

[0478] 此外,在染色法2中,分成0和1+与2+和3+两组时,2+/3+组中以高比率且没有遗漏地包含了显示出长期SD的病例(表8)。

[0479] [表8]

[0480]

GPC3-IHC 评分	高值组		低值组	
1+/2+/3+	18%	( 2/11 )	0%	( 0/3 )
2+/3+	50%	( 2/4 )	0%	( 0/10 )
3+	33%	( 1/3 )	9%	( 1/11 )

[0481] [实施例3]

[0482] 测定了在GPC3靶向治疗中施予了GC33的患者的血清中的游离GPC3的浓度。向培养板的各孔中分别注入100 $\mu$ L用固相化缓冲液(0.05mol/L碳酸氢钠,pH 9.6)稀释成为7.5 $\mu$ g/mL的小鼠抗GPC3单克隆抗体M3C11及L9G11抗体(W02004/022739),然后于室温下静置1小时,用清洗缓冲液(0.05mol/L的Tris缓冲生理盐水,pH8.0,0.05%的吐温20)清洗静置后的培养板的各孔3次。然后,向各孔中注入200 $\mu$ L的封闭缓冲液(25mmol/L的Tris-HCl缓冲液,pH 8.1,0.5mmol/L的氯化镁,72mmol/L的氯化钠,0.05%的ProClin150,5mg/mL的牛血清白蛋白,0.025%的吐温20,1%的Block Ace),于室温下静置2小时,制作固定有上述抗体的培养板。该培养板不立即使用时,于4 $^{\circ}$ C进行保存,然后用于测定。

[0483] 将上述临床试验中采集的患者血清用稀释缓冲液(25mmol/L的Tris-HCl缓冲液,pH 8.1,0.5mmol/L的氯化镁,72mmol/L的氯化钠,0.05%的ProClin 150,5mg/mL的牛血清白蛋白,0.025%的吐温20,0.4%的Block Ace)稀释4倍,然后向培养板的各孔中添加100 $\mu$ L,将该培养板于4 $^{\circ}$ C下彻夜静置。需要说明的是,作为GPC3标准物质,使用了以不结合硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)糖链的方式将第495位及509位的丝氨酸残基取代为了丙氨酸残基的重组GPC3(Recombinant GPC3)(Hippo et al.,Cancer Res.(2004)64,2418-2423)。

[0484] 然后,用清洗缓冲液清洗该培养板的各孔3次后,向各孔中分别加入100 $\mu$ L用稀释缓冲液稀释成为0.3 $\mu$ g/mL的生物素标记抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3多克隆抗体(R&D system Inc.制)。进而,于25 $^{\circ}$ C下静置1小时后,用清洗缓冲液清洗该培养板的各孔3次。然后,向上述培养板的各孔中加入100 $\mu$ L按照指示书用稀释缓冲液稀释后的HRP标记链霉亲和素(Streptavidin-Poly HRP80)(Streptspecific Detection Technologies Inc.制),将该培养板于25 $^{\circ}$ C下静置1小时。然后,用清洗缓冲液清洗上述培养板的各孔3次后,按照试剂盒所附的指示书使用TMB Microwell Peroxidase Substrate System(Kirkegaard&Perry Laboratories Inc.制)使上述各孔中的反应液显色,测定该反应液在450nm及650nm处的吸光度。利用基于含有上述重组GPC3的标准样品绘成的标准曲线,由得到的各孔的吸光度算出各患者的血清中的GPC3抗原。

[0485] [实施例4]

[0486] 将实施例3中算出的在血清中检测到的游离GPC浓度的推移分成实施例2中确定的肿瘤组织GPC3-IHC评分的高值组和低值组这两组,示于图4。在基于GPC3-IHC评分被评价为GPC3高度表达的组(图4A)中,测定了游离GPC3的病例数较多。此外,在显示出长期SD的病例中,观察到了游离GPC3浓度的升高或稳定化。而与之相对,在基于GPC3-IHC评分被评价为GPC3低度表达或阴性的组(图4B)中,测定了游离GPC3的病例数较少。

[0487] 此外,比较了在筛查时或在初次施予前采集的血清中测定了GPC3的组(GPC3阳性组)与GPC3为检测限以下的组中的未恶化生存期(Progression free survival:PFS)。确认到了实施GPC3靶向治疗前的血清GPC3阳性组的PFS长于阴性组的PFS(图5A)。此外,血清GPC3的阳性组包含在开始施予GPC3靶向治疗剂后测定了血清GPC3的血清时,Log-Rank检验的结果表明,与阴性组(无论是否施予GPC3靶向治疗剂、GPC3均为检测限以下的病例)的PFS相比,阳性组的PFS明显地更长(图5B)。

[0488] [实施例5]

[0489] 此外,由表9及表10表明,为采用染色法1及染色法2评价得到的GPC3-IHC评分的高

值组且血清GPC3值为阳性时的长期SD的比例,变得高于GPC3-IHC评分为高值组时的长期SD的比例(表6、8~10)。

[0490] [表9]

[0491]

GPC3-IHC (染色法 1)	IHC 高值 (7 以上) 血清 GPC3 阳性		其他	
施予前血清 GPC3	60%	( 3/5 )	9%	( 1/11 )
施予后血清 GPC3	80%	( 4/5 )	0%	( 0/11 )

[0492] [表10]

[0493]

GPC3-IHC (染色法 2)	IHC (2-3+) 血清 GPC3 阳性		其他	
施予前血清 GPC3	100%	( 2/2 )	0%	( 0/12 )
施予后血清 GPC3	67%	( 2/3 )	0%	( 0/11 )

[0494] [实施例6]

[0495] 在该临床试验中,还追加登记了7个基于染色法1的结果的GPC3-IHC的IHC总评分为7以上、且Child-Pugh分数为A的病例(其中,1个病例的IHC总评分(最终评价结果的IHC总评分)被判定为6)。按照实施例3的方法,测定了血清中的GPC3值。此外,评价了与实施例4同样地施予了GPC3靶向治疗剂的总计27个病例的PFS。采用Log-Rank检验研究了上述病例的血清中的GPC3值与PFS的相关性,结果表明,与血清中的GPC3为检测限以下的组的PFS相比,在施予前能测定血清中的GPC3的组的PFS(图6A)、及在施予前及施予后均能测定血清中的GPC3的组(图6B)的任一PFS,均显著地增长。

[0496] [实施例7]

[0497] 为了确认GC33在进行性和/或复发性肝细胞癌(HCC)患者中的有效性、安全性,以有前治疗经历的无法切除的进行性或转移性肝细胞癌成人患者为对象,实施了隔周施予1600mg的GC33的多中心共同随机双盲试验安慰剂对照II期临床试验(NP27884试验)。将患者以2:1的比率随机分配成GC33组(以1周的间隔施予1600mg固定用量2次后,隔周施予,n=121例)和安慰剂组(n=60例),并根据使用GPC3-IHC试剂盒(Ventana公司制)的IHC染色,基于GPC3表达水平(0,1+,2+/3+)分级为3个群组。在发生试验实施计划书中计划的、128例的无复发生存(PFS)事件的时候,实施主要分析。

[0498] 进行上述施予研究的HCC患者患有经组织学确认的、不适用治愈性疗法(外科切除、肝移植等)和/或局部疗法、或在治疗后发生恶化的进行性或转移性的HCC(不包括纤维板层(fibrolamellar)型),且具有利用至少1种药剂的全身疗法的前治疗经历。合格患者至少为18岁,能够提供用于测定GPC3的肿瘤样品,美国东海岸癌症临床试验组织·体能状态评分为0或1,且Child-Pugh分级为A级。此外,具有至少1种可依据实体肿瘤的治疗效果基准(RECIST)进行评价的病变。作为其他基准,评价了适当的造血功能(嗜中性粒细胞绝对数 $\geq 1500$ 个/ $\mu\text{l}$ ,血小板 $\geq 50000$ 个/ $\mu\text{l}$ ,血红蛋白 $\geq 8.0\text{g/dl}$ )、肝功能(总胆红素 $\leq 2\text{mg/dl}$ ,天冬氨酸氨基转移酶和谷丙转氨酶 $\leq$ 正常上限值的5倍)、及肾功能(血清肌酐 $\leq$ 正常上限值

的2倍)。下述患者可登记,所述患者为:就闭经前的女性而言,在开始施予试验药物前的10日以内实施的血清妊娠检查中被确认为阴性的患者;就接受过外科性的避孕处置的、或闭经后经过1年以上的无妊娠可能的女性、除闭经后(12个月以上无月经)或接受过外科性的避孕处置(卵巢和/或子宫的切除)的女性以外的女性而言,同意在试验治疗中及试验药物施予结束后至少3个月以上的期间内使用2种适当的避孕方法的患者。为男性时,登记了同意不仅在试验治疗中、还在试验药物施予结束后至少40日的期间内使用基于屏障法(barrier method)的避孕方法的患者。另一方面,将下述患者作为登记的排除对象,所述患者为:在GPC3靶向治疗剂施予前的2周以内接受过主要的外科手术的、或尚未从危重的障碍中恢复的患者;已确认到向脑或软脑膜的转移的患者;在过去的5年内具有恶性肿瘤的既往的患者;患有B型/C型肝炎以外的需要进行治疗的活动性感染症的患者;在试验药物施予开始前4周以内具有基于NCI CTCAE v4.0的3级以上的出血既往的患者;具有包括肝移植在内的器官移植的既往的患者;有施予除本试验中施予的药剂以外的抗癌剂打算、或在施予中的患者;在试验登记前2周以内施用过抗癌剂的患者;尚未从前次的针对肝细胞癌的局部区域疗法或全身疗法带来的副作用中完全恢复的患者;在施行干扰素疗法过程中的患者;基线中的QTc超过470ms的、或基线中呈现出安静时的心动过缓(少于45次/分钟)的患者;在开始施予试验药物前的2周以内、施用过以治疗为目的的抗凝剂或溶栓剂的患者(不包括以除去导管的堵塞为目的或以预防为目的的低剂量施用);妊娠中或哺乳中的患者;HIV阳性患者、或AIDS相关疾病发病的患者;对类似的药剂(单克隆抗体、含有蛋白质的制剂、来源于中国仓鼠卵巢的制剂)有过敏症既往的患者;具有重要的并存疾病、被临床试验负责/承担医生判定存在由试验药物导致恶化的可能性的患者。

[0499] 试验规程按照药品临床试验实施基准指南实施,并获得了各自加入的临床试验伦理审查委员会的批准。所有患者均在登记前签署了书面的知情同意书。只要未表现出疾病的发展或不能容许的毒性,则继续向患者施予GC33。以基线水平对肿瘤实施评价,在施予开始起4个周期、7个周期、10个周期的时候进行反复评价,其后每4个周期进行反复评价,直至疾病发展为止。需要说明的是,1个周期为两周,疾病的状态由临床试验负责医生进行评价。

[0500] HCC肿瘤组织中的GPC3蛋白质的表达,通过GPC3组织免疫染色(GPC3-IHC)进行评价。在美国Ventana Medical Systems实施GPC3-IHC的中央检测。对HCC肿瘤组织的未染色切片(其是利用由各医院通过针活检摘出后、经福尔马林固定及石蜡法包埋的肿瘤块制备的)实施了免疫组织染色。作为抗体,使用了小鼠GC33抗体。

[0501] [实施例8]

[0502] 对于在GPC3靶向治疗中施予GC33或安慰剂的病例的初次施予前的血清中的游离GPC3的浓度,利用2种不同的可与游离GPC3结合的抗体的组合(包含GT30抗体和GT607抗体的组合、或包含GT114和GT165的组合)进行测定。GT30、GT607、GT114及GT165按照W02004/022739中记载的方法进行制作,选择可与游离GPC3结合的抗体。将GT30的H链及L链分别示于序列号83及84,将GT607的H链及L链分别示于序列号85及86,将GT114的H链及L链分别示于序列号87及88,将GT165的H链及L链分别示于序列号89及90。

[0503] 向96穴微孔板中各添加使GT30或GT114结合在磁粒珠(JSR公司制)上的抗体结合粒子液25 $\mu$ L,然后各添加25 $\mu$ L的标准曲线用标准样品溶液(使用上述实施例3中的GPC3标准物质)、或经适当稀释的血清试样,进而再各添加25 $\mu$ L标记了碱性磷酸酶的GT607或GT165。

于25℃振荡20分钟后,使用Dyna-Mag-96Side Skirted (Veritas公司制),在集磁的状态下用清洗液清洗5次,各添加预先加热至37℃的发光基质液50μL。于室温下振荡1分钟后,静置4分钟,由此使其发光。使用照度计 (luminometer) (Veritas公司制) 测定了化学发光强度。

[0504] 利用基于含有重组GPC3的标准样品绘成的标准曲线,由得到的各孔的化学发光强度算出各患者的血清中的GPC3抗原。

[0505] [实施例9]

[0506] 在如上所述施予了GC33的125个病例及施予了安慰剂的60个病例中、有128个病例获得了PFS事件的时候,利用PFS评价了GPC3靶向治疗中由GC33的施予产生的效果。此外,作为次要评价,利用总生存(OS)达到78个事件时的OS进行了评价。

[0507] 此外,对于GC33施予组,利用使用本II期临床试验中的GC33血清浓度值获得的群体PK模型,推算第3周期·第1日(自初次施予开始起第4周)的施予前的血中GC33谷值,以作为谷值中值的230μg/ml为临界(cut-off),分成GC33的暴露少的组(GC33低暴露组)和GC33的暴露多的组(GC33高暴露组)这两组,在各组之间、或各组与安慰剂组之间,利用乘积极限法(Kaplan-Meier method)比较作为临床效果的指标的未恶化生存期(PFS)或总生存期(OS)。

[0508] [实施例10]

[0509] 关于实施例8中算出的在血清中检测到的各游离GPC3浓度,根据GT30与GT607的组合体系中的测定值的中值分类为低值组、高值组这两组,如实施例9所述将GC33低暴露、高暴露或安慰剂组的PFS曲线或OS曲线示于图7A~D。此外,同样地,根据GT114与GT165的组合体系中的中值分类为两组,将此时的PFS曲线或OS曲线示于图8A~D。

[0510] 在任意情况下,在游离GPC3浓度低的组中PFS期间及OS期间的延长效果较小,而与之相对,在血清中的游离GPC3浓度高的组中,相对于低暴露组或安慰剂组,GC33高暴露组的PFS期间及OS期间显示出了显著低的风险比。

[0511] 此外,对显著性差异最小的游离GPC3的临界值进行了研究,结果就GT30-GT607而言为175pg/mL,就GT114-GT165而言为259.7pg/mL,将显示出了高于各个临界值的游离GPC3值的患者组中的PFS曲线及OS曲线分别示于图7E和F、及图8E和F。同样地,在GC33高暴露组中确认到了显著低的风险比、即各生存期的延长。

[0512] 将本说明书中引用的全部刊物、专利及专利申请直接作为参考引入本说明书中。

[0513] 产业上的可利用性

[0514] 本发明有利于GPC3靶向治疗剂疗法有效性的提高、以及接受治疗的患者的QOL的改善,对以肝癌为代表的癌症的治疗是有用的。

[0515] 序列列表自由文本

[0516] 序列号44:经修饰的抗体片段

[0517] 序列号45:经修饰的抗体片段

[0518] 序列号46:经修饰的抗体片段

[0519] 序列号47:经修饰的抗体片段

[0520] 序列号48:经修饰的抗体片段

[0521] 序列号49:经修饰的抗体片段

[0522] 序列号50:经修饰的抗体片段

- [0523] 序列号51:经修饰的抗体片段
- [0524] 序列号52:经修饰的抗体片段
- [0525] 序列号53:经修饰的抗体片段
- [0526] 序列号54:经修饰的抗体片段
- [0527] 序列号55:经修饰的抗体片段
- [0528] 序列号56:经修饰的抗体片段
- [0529] 序列号57:经修饰的抗体片段
- [0530] 序列号58:经修饰的抗体片段
- [0531] 序列号59:经修饰的抗体片段
- [0532] 序列号60:经修饰的抗体片段
- [0533] 序列号61:经修饰的抗体片段
- [0534] 序列号62:经修饰的抗体片段
- [0535] 序列号63:经修饰的抗体片段
- [0536] 序列号64:经修饰的抗体片段
- [0537] 序列号65:经修饰的抗体片段
- [0538] 序列号66:经修饰的抗体片段
- [0539] 序列号67:经修饰的抗体片段
- [0540] 序列号68:经修饰的抗体片段
- [0541] 序列号69:经修饰的抗体片段
- [0542] 序列号70:经修饰的抗体片段
- [0543] 序列号71:经修饰的抗体片段
- [0544] 序列号72:经修饰的抗体片段
- [0545] 序列号73:经修饰的抗体片段

## 序列表

- <110> 中外制药株式会社
- <120> 用于向 GPC3 靶向治疗剂疗法有效的患者施予的 GPC3 靶向治疗剂
- <130> PCG-9038W0
- <150> JP2012-280304
- <151> 2012-12-21
- <160> 90
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 580
- <212> PRT
- <213> 人
- [0001] <400> 1

```

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
1           5           10           15
Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Asp
20          25          30
Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
35          40          45
Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
50          55          60
Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
65          70          75          80
Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
85          90          95
Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
100         105         110
Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
115         120         125
Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
130         135         140
Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
145         150         155         160
Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro

```



515 520 525  
 Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro  
 530 535 540  
 Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser  
 545 550 555 560  
 Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe  
 565 570 575  
 Phe Leu Val His  
 580

<210> 2  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 2

Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val  
 1 5

[0003]

<210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 3

Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu  
 1 5

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 4

Asp Tyr Ser Met His  
 1 5

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 5

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 6

<211> 2

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 6

Leu Tyr

1

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

[0004]

<400> 7

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn  
 1                    5                    10                    15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 8

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 9

Cys Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

Gln Ile Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Arg Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110

[0005]

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 11

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 12

Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly  
 1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 13

Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

[0006]

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 14

Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala Phe  
 1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 15

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 16

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 17

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 18

<211> 124

<212> PRT

<213> 小鼠

[0007]

<400> 18

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr  
20 25 30  
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala  
50 55 60  
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ile Ser Asn Asn Gln Val  
65 70 75 80  
Phe Leu Lys Ile Ser Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Ala Gln Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala  
100 105 110  
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 19

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                   85                   90                   95  
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

[0008]

<213> 小鼠

<400> 20

Asp Tyr Glu Met His  
 1                   5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 21

Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Gly

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 22

Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr  
1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 23

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
1 5 10 15

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 24

[0009]

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 25

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr  
1 5

<210> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115

<210> 27  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 27

[0010]

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 28  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 28

Ile Asn Ala Met Asn  
 1 5

<210> 29  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 29

Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Val Lys Asp

<210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 30

Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr  
 1                   5

[0011] <210> 31  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 31

Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
 1                   5                   10                   15

<210> 32  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 32

Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser  
 1                   5

<210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> 小鼠

<400> 33

Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ile Asn  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp  
50 55 60  
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Val Arg Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

[0012]

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 35

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30  
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 36  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 36

Ala Ser Ala Met Asn  
 1 5

[0013]

<210> 37  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 37

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Val Lys Asp

<210> 38  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 38

Asp Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 39

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Tyr Asp Ile Thr Tyr Leu Tyr  
1                   5                   10                   15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 40

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser  
1                   5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 41

[0014]

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Pro Thr  
1                   5

<210> 42

<211> 123

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
1                   5                   10                   15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ala Ser  
                  20                   25                   30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                  35                   40                   45  
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp  
                  50                   55                   60  
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met  
65                   70                   75                   80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr



Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 45

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的抗体片段

<400> 45

[0016]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 46

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的抗体片段

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                   40                   45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
                   100                   105                   110  
 Val Ser Ser  
                   115

[0017]

<210> 47

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的抗体片段

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                   40                   45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110  
Val Ser Ser  
115

<210> 48  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 经修饰的抗体片段

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30  
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ser  
115

[0018]

<210> 49  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 经修饰的抗体片段

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr



<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的抗体片段

<400> 51

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

[0020]

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的抗体片段

<400> 52

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95

```

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

- <210> 53
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 经修饰的抗体片段

<400> 53

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Asp Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

[0021]

- <210> 54
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 经修饰的抗体片段

<400> 54

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 55  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 55

[0022] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 56  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 56

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn His Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                   90                   95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的抗体片段

[0023]

<400> 57

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Asn Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                   90                   95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110

<210> 58

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 经修饰的抗体片段

&lt;400&gt; 58

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 59

[0024]

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 经修饰的抗体片段

&lt;400&gt; 59

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

	100	105	110
<210>	60		
<211>	112		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	经修饰的抗体片段		
<400>	60		
	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly		
	1                  5                  10                  15		
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser		
	20                  25                  30		
	Asn Ile Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
	35                  40                  45		
	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
	50                  55                  60		
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
	65                  70                  75                  80		
[0025]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn		
	85                  90                  95		
	Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100                  105                  110		

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 经修饰的抗体片段

&lt;400&gt; 61

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1                  5                  10                  15  
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                  20                  25                  30  
Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                  35                  40                  45  
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 62  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 62

[0026]

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 63  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 63

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1	5	10	15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
	20	25	30
Asn Ser Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn			
	85	90	95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的抗体片段

[0027]

<400> 64

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
	20	25	30
Asn Trp Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn			
	85	90	95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 经修饰的抗体片段

&lt;400&gt; 65

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Tyr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105           110

```

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0028]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 经修饰的抗体片段

&lt;400&gt; 66

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105           110

```

<210> 67  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 67

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Ala Ile Asn Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr  
                   100                   105                   110  
 Val Ser Ser  
                   115

[0029]

<210> 68  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 68

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
                   35                   40                   45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 69  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 69

[0030] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 70  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

&lt;400&gt; 70

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
                   35                   40                   45  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                   90                   95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0031]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 经修饰的抗体片段

&lt;400&gt; 71

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe  
                   50                   55                   60  
 Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
                   100                   105                   110  
 Val Ser Ser  
                   115

<210> 72  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 72

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                   90                   95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110

[0032]

<210> 73  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 经修饰的抗体片段

<400> 73

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile





195 200 205  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 76  
 <211> 377  
 <212> PRT  
 <213> 智人

[0035]

<400> 76

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110  
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg  
 115 120 125  
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys  
 130 135 140  
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

145                      150                      155                      160  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
    165                      170                      175  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
    180                      185                      190  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
    195                      200                      205  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
    210                      215                      220  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 225     230                      235                      240  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
    245                      250                      255  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
    260                      265                      270  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
    275                      280                      285  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
    290                      295                      300  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 305     310                      315                      320  
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
    325                      330                      335  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
    340                      345                      350  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
    355                      360                      365  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
    370                      375

[0036]

<210> 77  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
  
 <400> 77

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
    20                      25                      30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
    35                      40                      45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50                      55                      60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                                     85                                      90                                      95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
                                     100                                      105                                      110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
                                     115                                      120                                      125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
                                     130                                      135                                      140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
                                     165                                      170                                      175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
                                     180                                      185                                      190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
                                     195                                      200                                      205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
                                     210                                      215                                      220  
 [0037] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                                     245                                      250                                      255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
                                     260                                      265                                      270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
                                     275                                      280                                      285  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
                                     290                                      295                                      300  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
                                     325

<210> 78  
 <211> 374  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 78

Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln

1	5	10	15
Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser			
20	25	30	
Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu			
35	40	45	
Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln			
50	55	60	
Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser			
65	70	75	80
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile			
85	90	95	
Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg			
100	105	110	
Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys			
115	120	125	
Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe			
130	135	140	
Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile			
145	150	155	160
Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr			
165	170	175	
Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro			
180	185	190	
Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val			
195	200	205	
Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln			
210	215	220	
Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn			
225	230	235	240
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly			
245	250	255	
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg			
260	265	270	
Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro			
275	280	285	
Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu			
290	295	300	
Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys			
305	310	315	320
Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys			
325	330	335	
Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
340	345	350	
Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys			

[0038]





225                    230                    235                    240  
 Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro  
                                  245                    250                    255  
 Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr  
                                  260                    265                    270  
 Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln  
                                  275                    280                    285  
 Asn Arg Ile  
                                  290

<210> 81  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 81

[0041]

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
                                  20                    25                    30  
 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
                                  35                    40                    45  
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
                                  50                    55                    60  
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu  
                                  85                    90                    95  
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
                                  100                    105                    110  
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
                                  115                    120                    125  
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn  
                                  130                    135                    140  
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro  
 145                    150                    155                    160  
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val  
                                  165                    170                    175  
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
                                  180                    185                    190  
 Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln  
                                  195                    200                    205  
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

210 215 220  
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp  
 225 230 235 240  
 Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
 245 250

<210> 82  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 82

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
 20 25 30  
 Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
 35 40 45  
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
 50 55 60  
 [0042] Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu  
 85 90 95  
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
 100 105 110  
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
 115 120 125  
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn  
 130 135 140  
 Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val  
 165 170 175  
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
 180 185 190  
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln  
 195 200 205  
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly  
 210 215 220  
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile  
 225 230

<210> 83  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 83

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg  
                   20                   25                   30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
                   35                   40                   45  
 Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Met Met Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu  
                   50                   55                   60  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
                   85                   90                   95  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
                   100                   105                   110  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Val Ser Asp Gly Tyr Leu Phe Pro Tyr Trp  
                   115                   120                   125  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys  
                   130                   135                   140

[0043]

<210> 84  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 84

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser  
                   20                   25                   30  
 Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn  
                   35                   40                   45  
 Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro  
                   50                   55                   60  
 Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser  
 65                   70                   75                   80  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn

85 90 95  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr  
 100 105 110  
 Gly Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 Ala

<210> 85  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 86

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Arg  
 20 25 30  
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Leu Pro Asp Lys Arg Leu  
 [0044] 50 55 60  
 Glu Trp Val Ala Ser Val Gly Asn Gly Gly Ser Tyr Arg Tyr Tyr Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asn Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Ile Ser Gly Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ala Phe Pro Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
 115 120 125  
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys  
 130 135

<210> 86  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 86

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

```

                20                25                30
Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn
                35                40                45
Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
                50                55                60
Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser
65                70                75                80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn
                85                90                95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
                100                105                110
Gly Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
                115                120                125
Ala

```

<210> 87  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

[0045] <400> 87

```

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
1                5                10                15
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
                20                25                30
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
                35                40                45
Ser Asp Ser Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
50                55                60
Glu Trp Met Ala Tyr Ile Met Tyr Ser Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Pro
65                70                75                80
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ala Lys Asn Gln
                85                90                95
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
                100                105                110
Tyr Cys Ser Arg Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
                115                120                125
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys
                130                135

```

<210> 88  
 <211> 129

<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 88

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
           20           25           30
Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser
           35           40           45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
           50           55           60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro
65           70           75           80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile
           85           90           95
Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp
           100          105          110
Ile Thr Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
           115          120          125

```

[0046]

Ala

<210> 89  
<211> 138  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 89

```

Met Cys Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Leu Ala Thr Ala Ala Arg
1           5           10           15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly
           20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe
           35           40           45
Thr Asn His His Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
           50           55           60
Asp Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn
65           70           75           80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
           85           90           95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

```

100                      105                      110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
           115                      120                      125  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys  
           130                      135

<210> 90  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 90

[0047]

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
           20                      25                      30  
 Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
           35                      40                      45  
 Ile Asn Lys Asn Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro  
           50                      55                      60  
 Arg Leu Leu Ile Trp Tyr Thr Tyr Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser  
           85                      90                      95  
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp  
           100                      105                      110  
 Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
           115                      120                      125  
 Ala

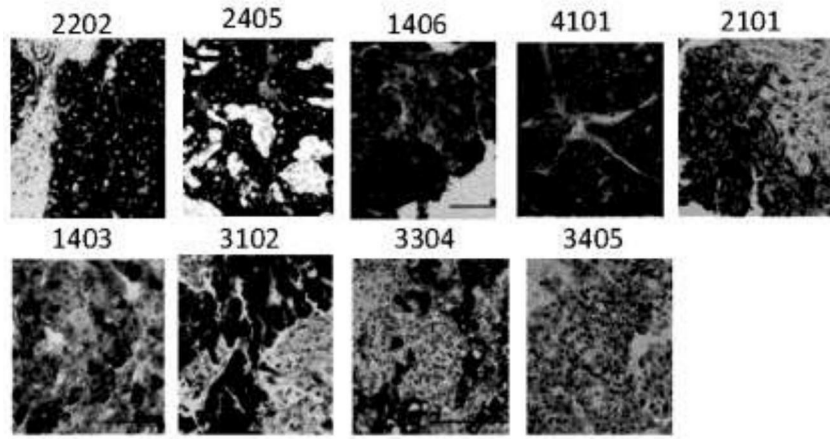


图1A

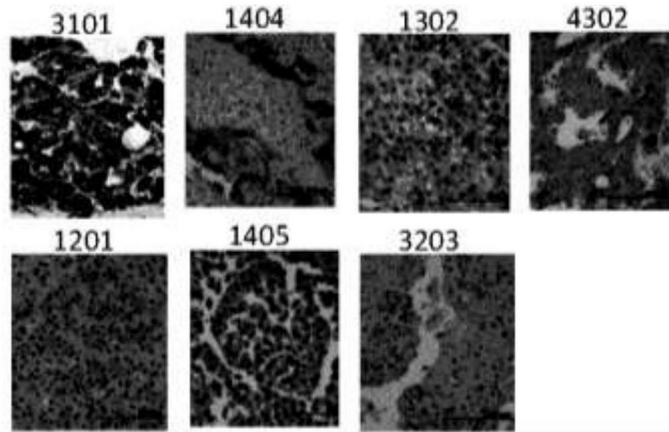


图1B

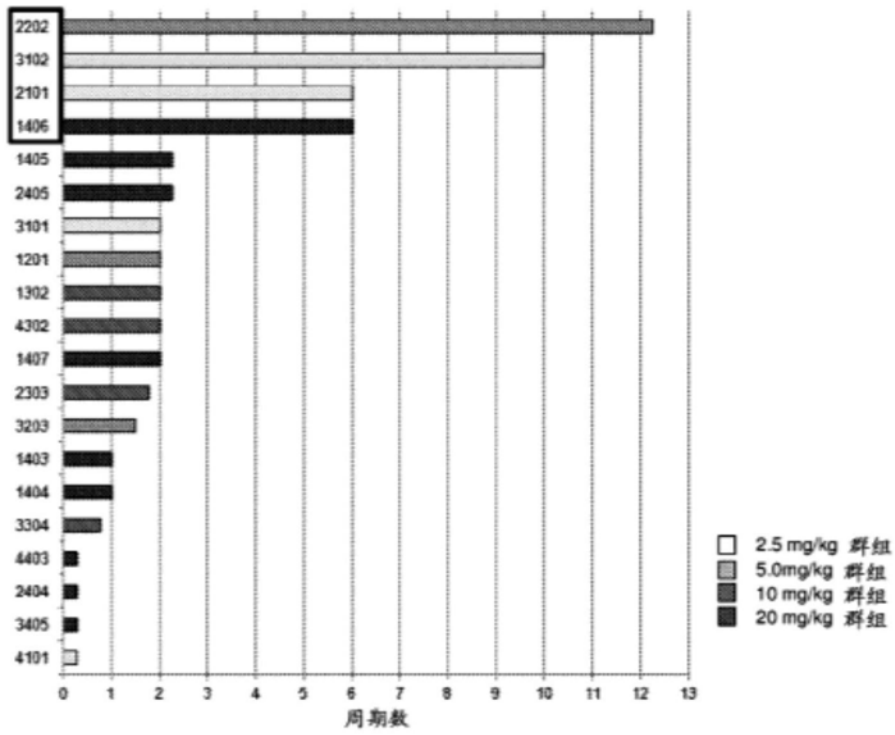


图2

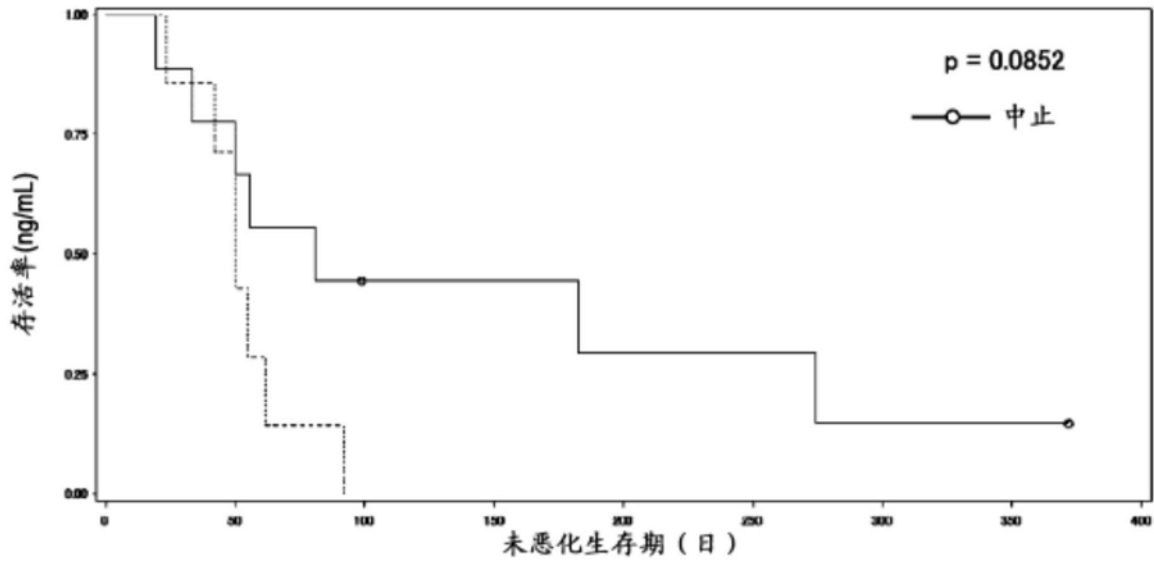


图3

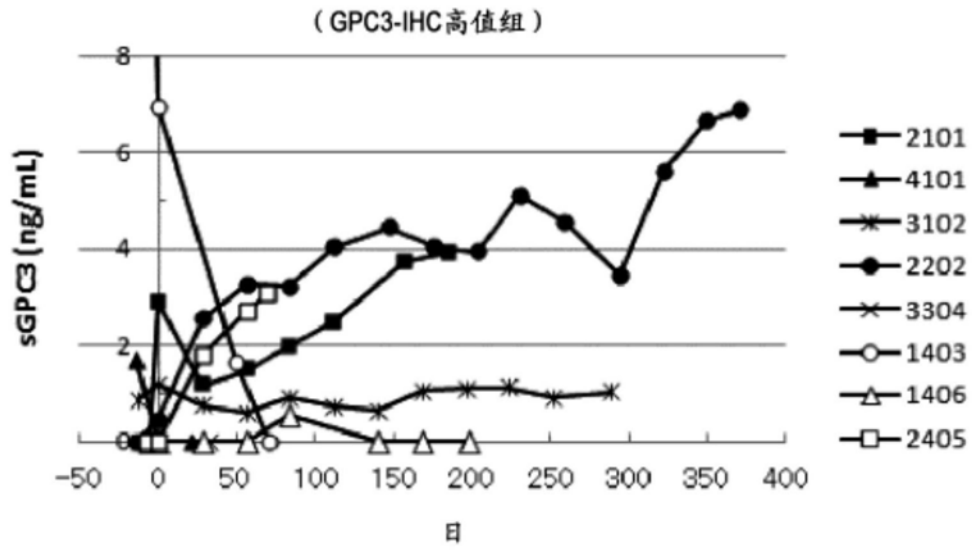


图4A

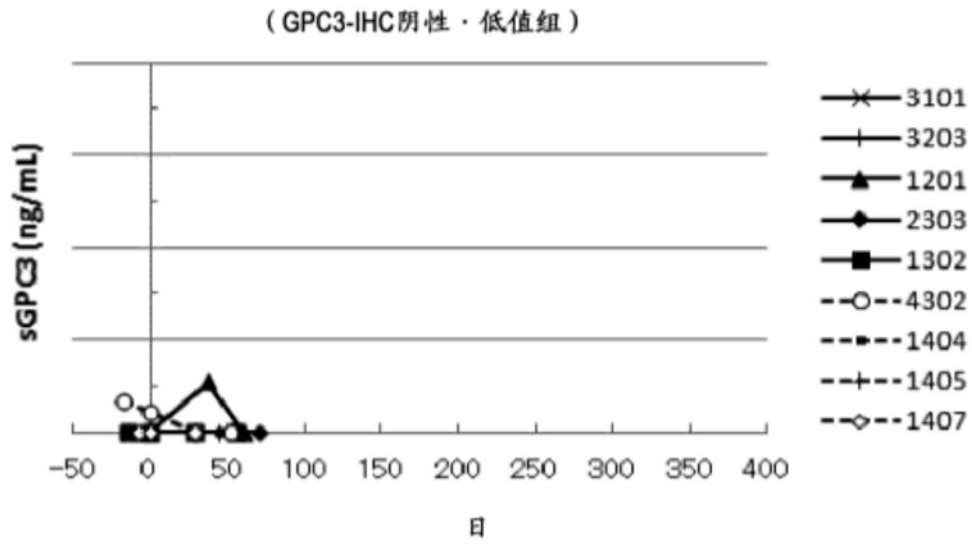


图4B

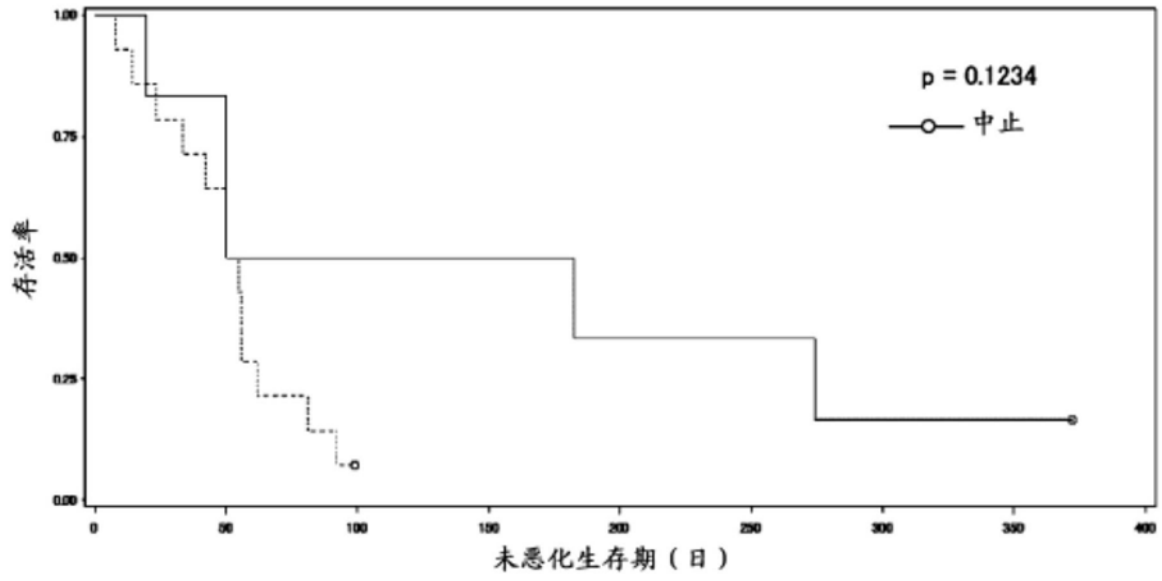


图5A

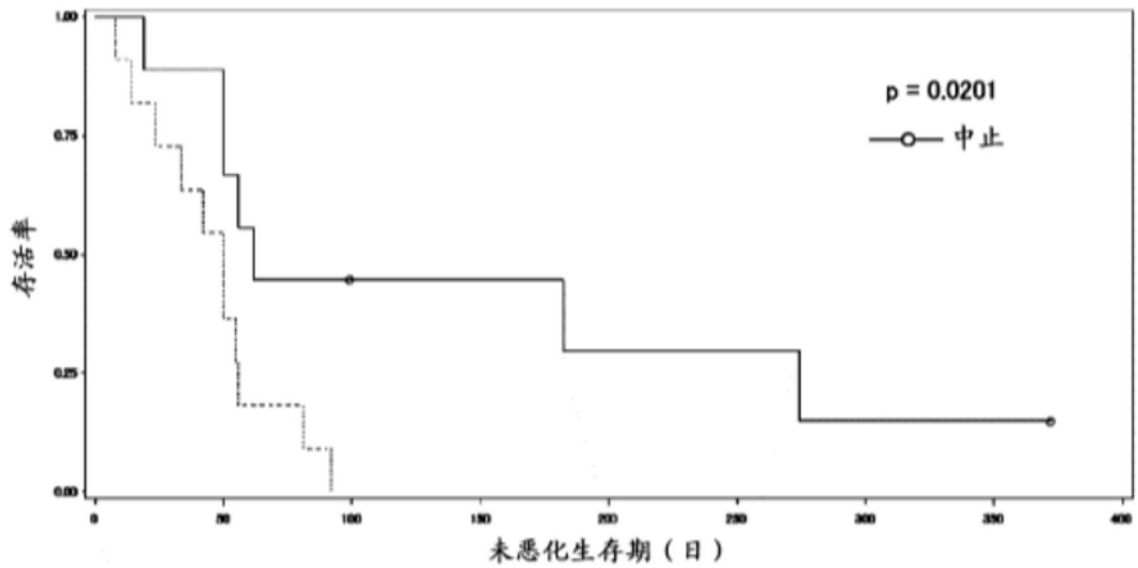


图5B

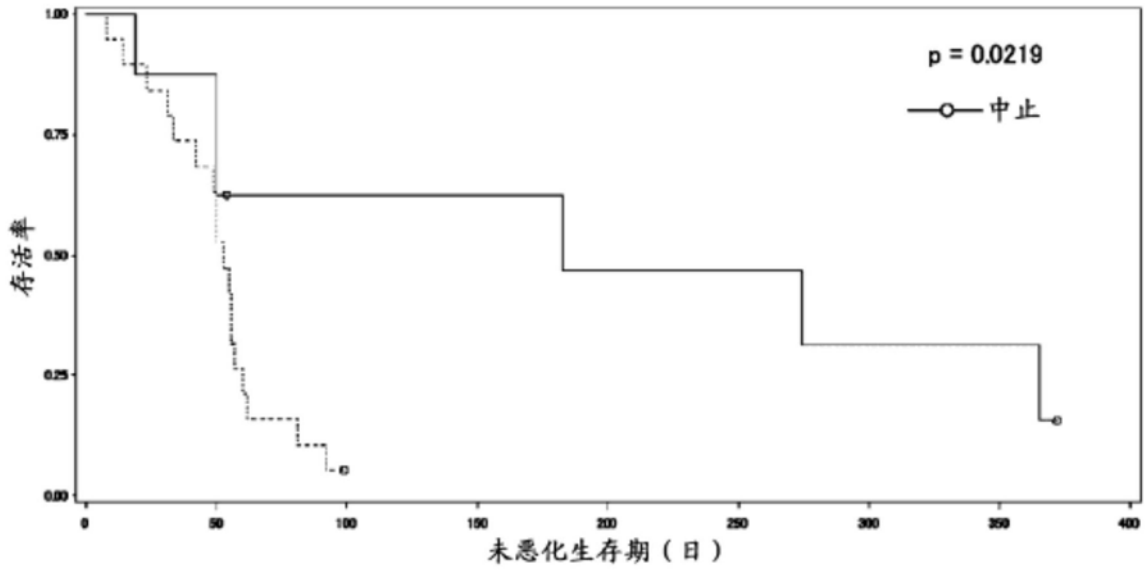


图6A

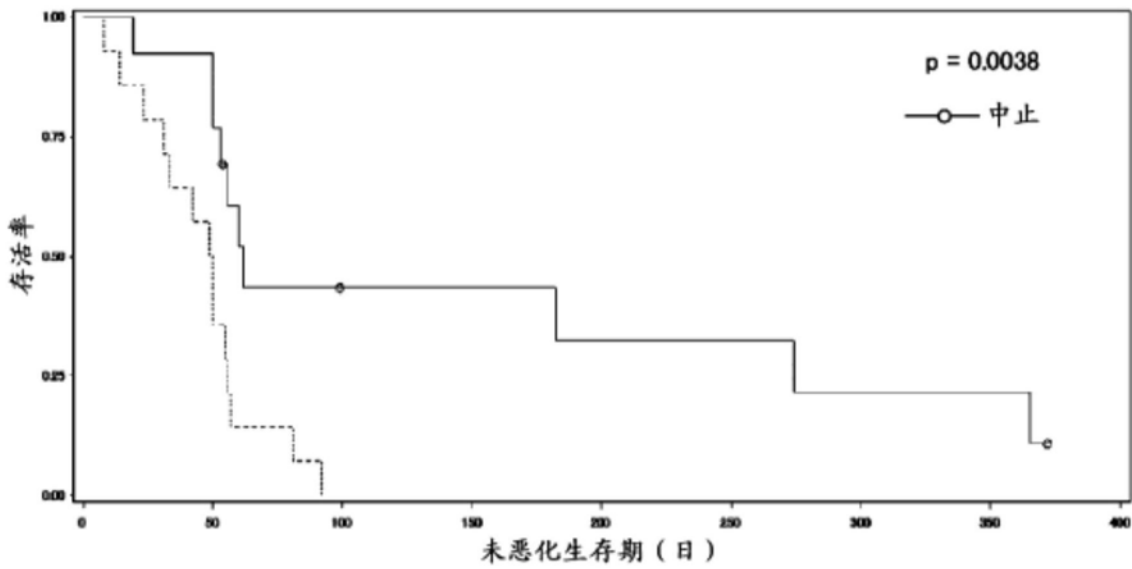


图6B

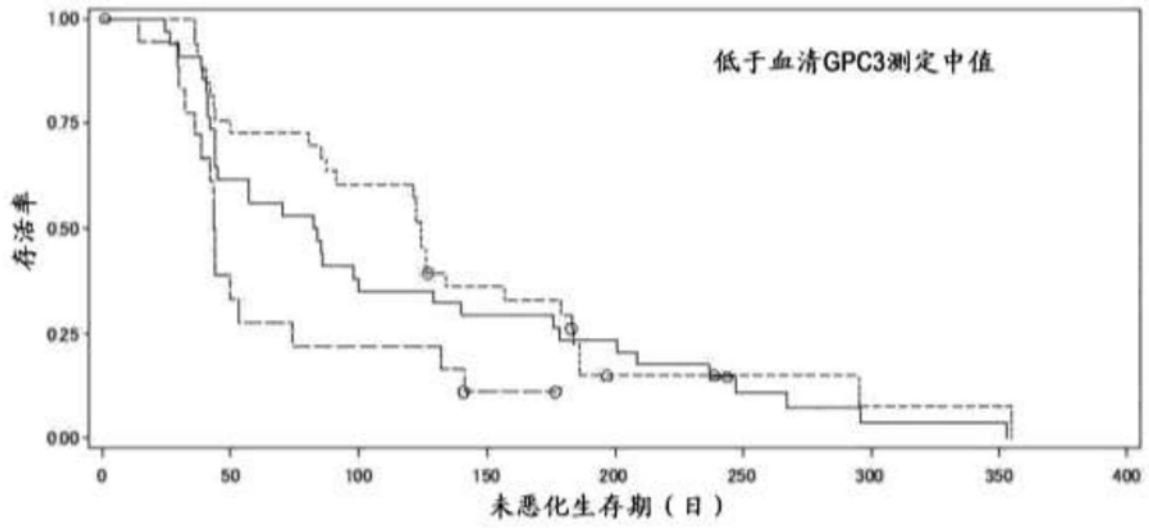


图7A

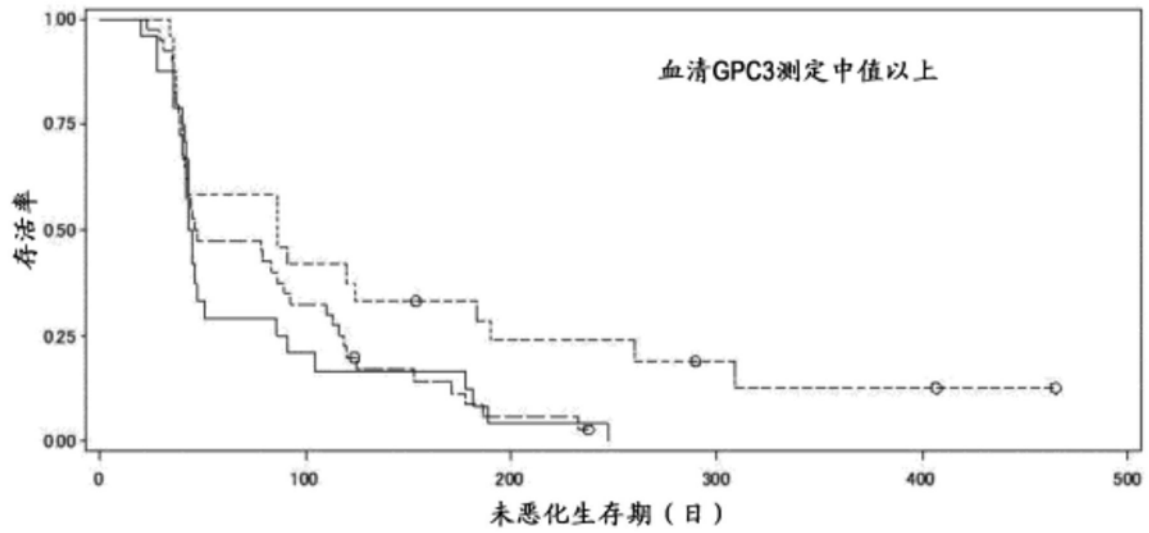


图7B

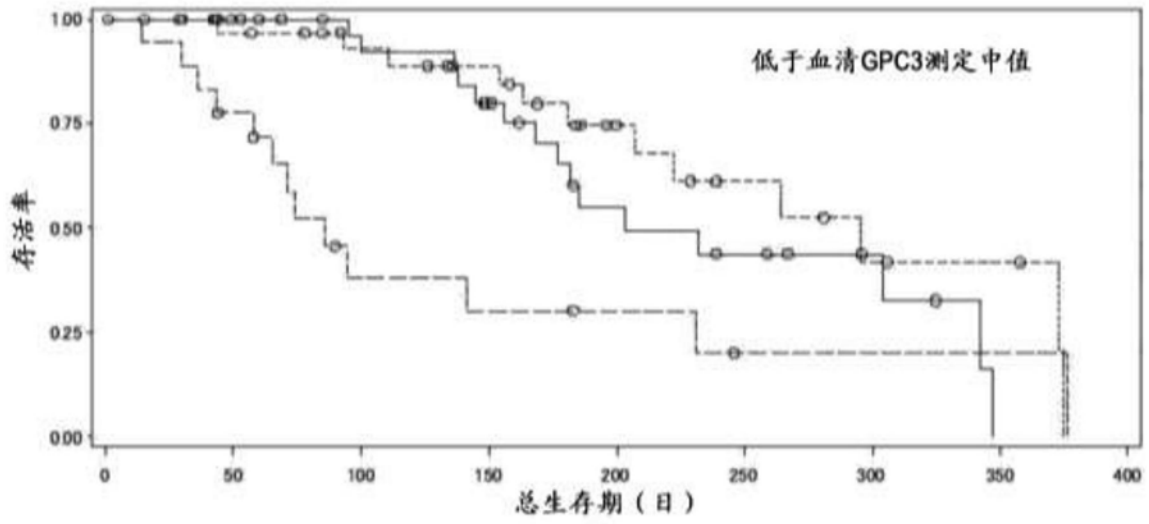


图7C

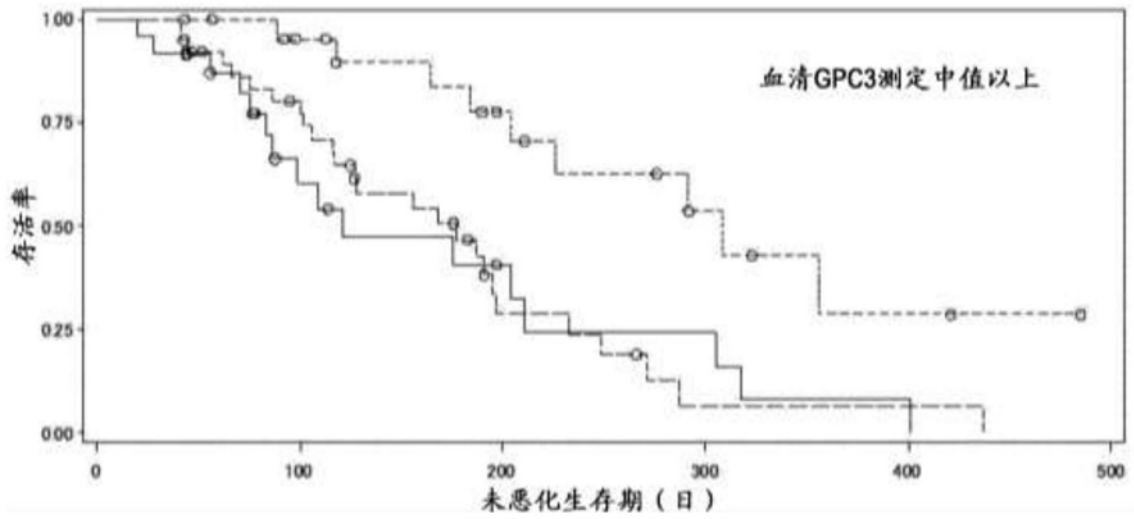


图7D

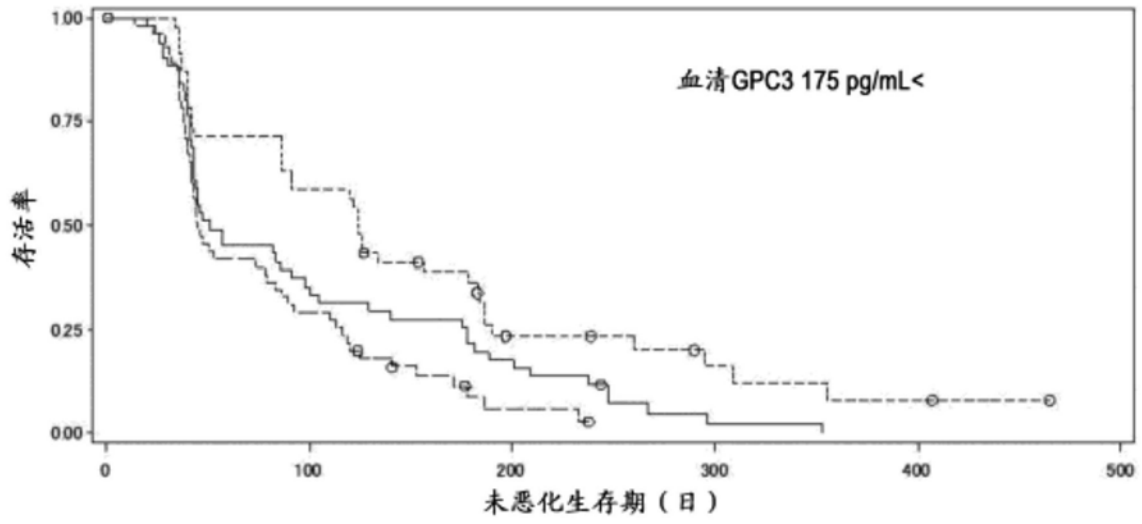


图7E

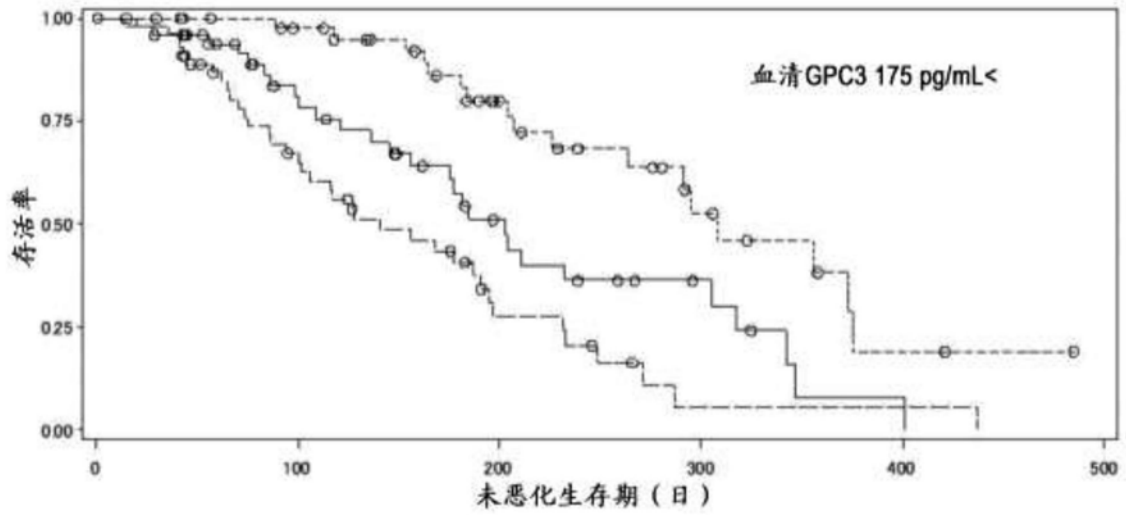


图7F

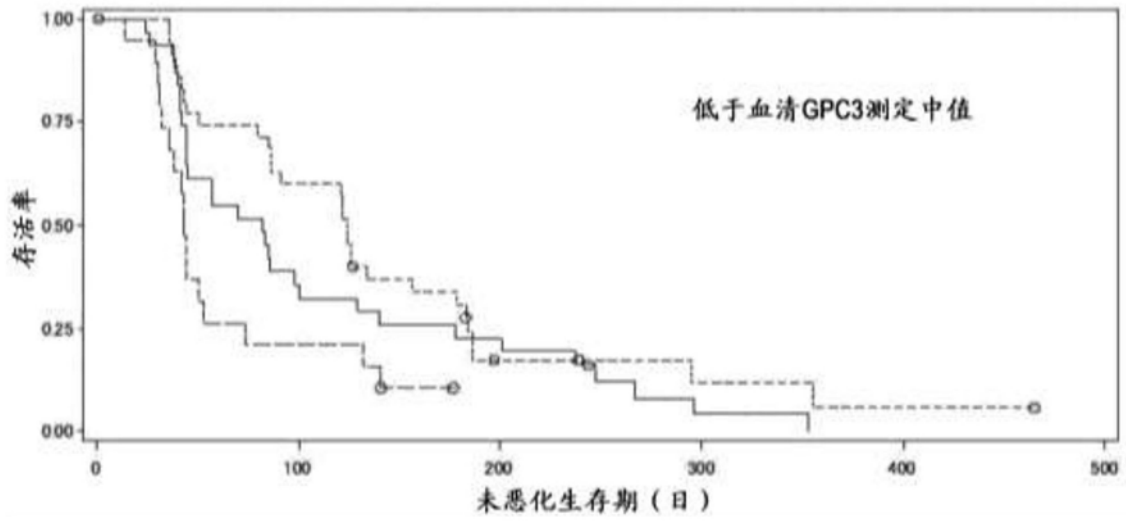


图8A

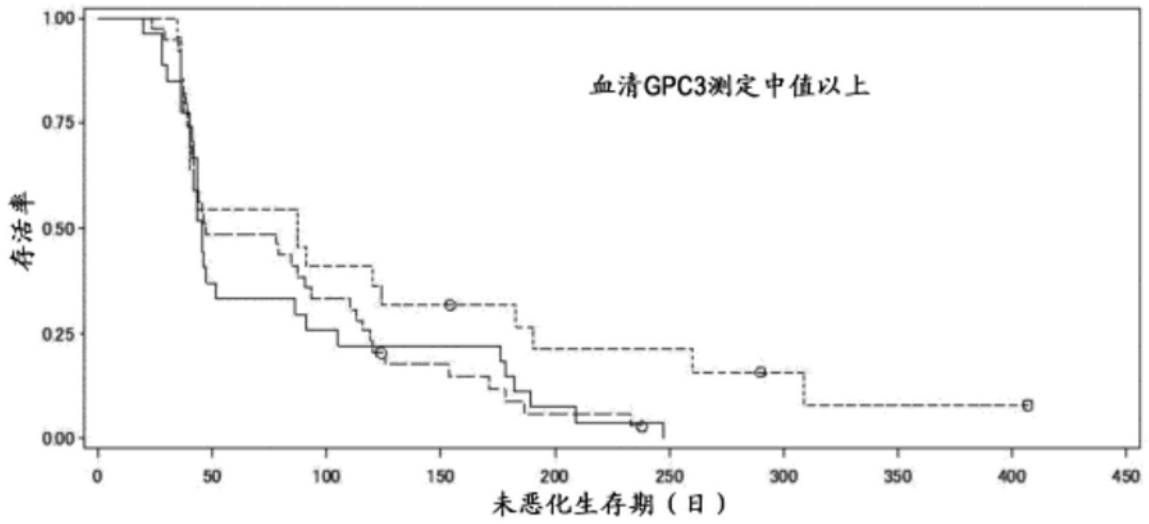


图8B

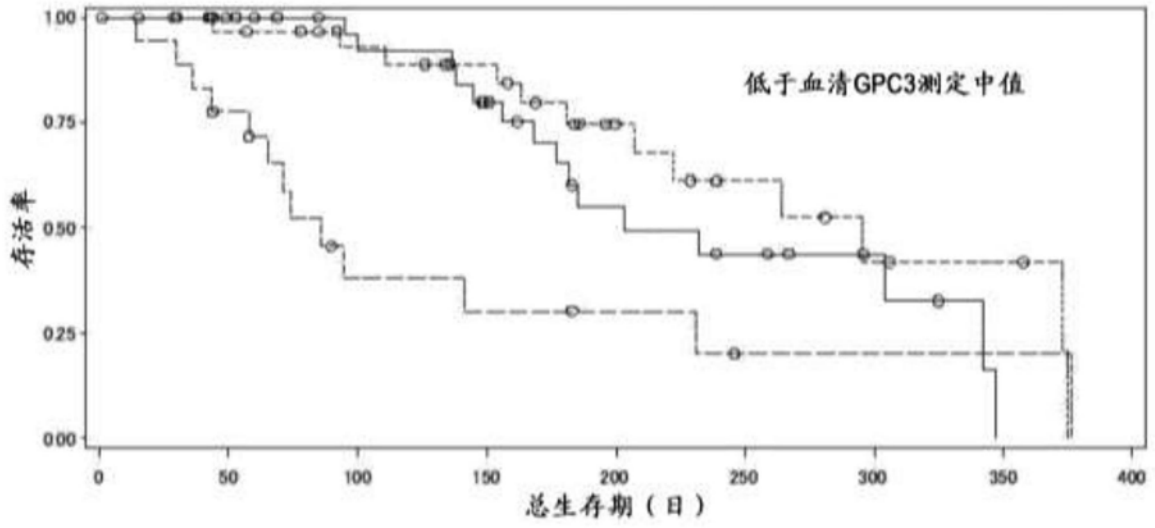


图8C

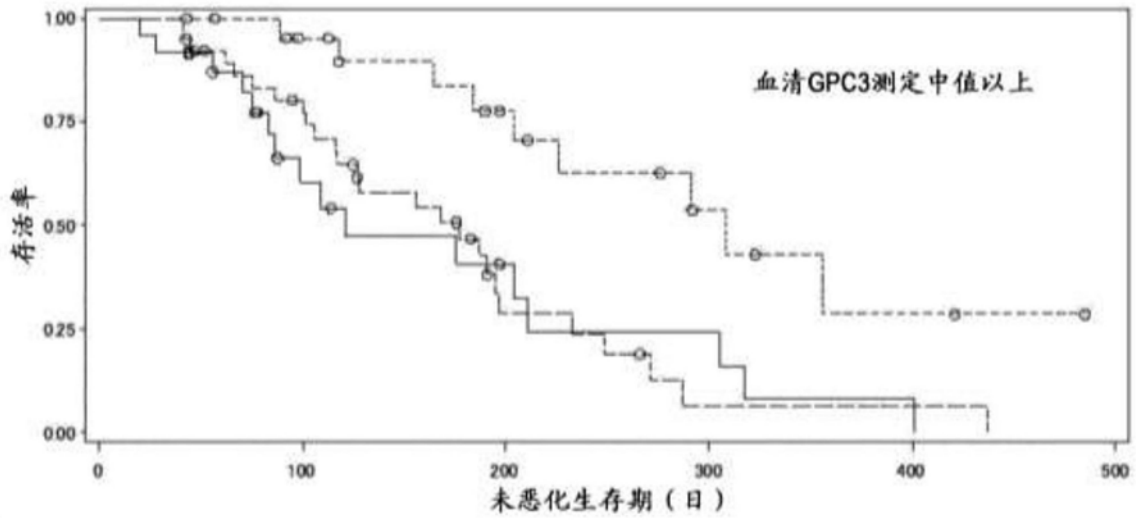


图8D

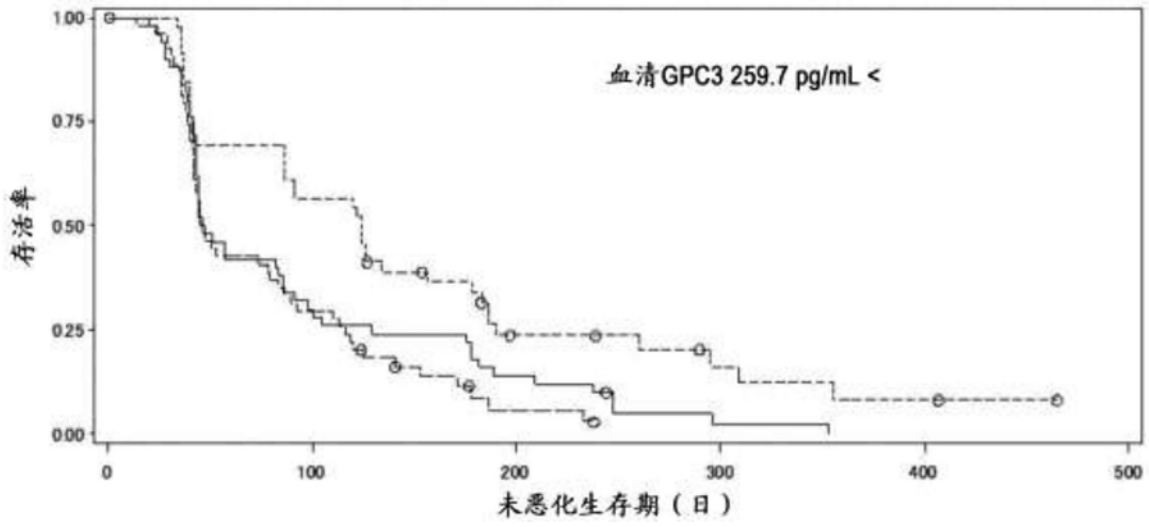


图8E

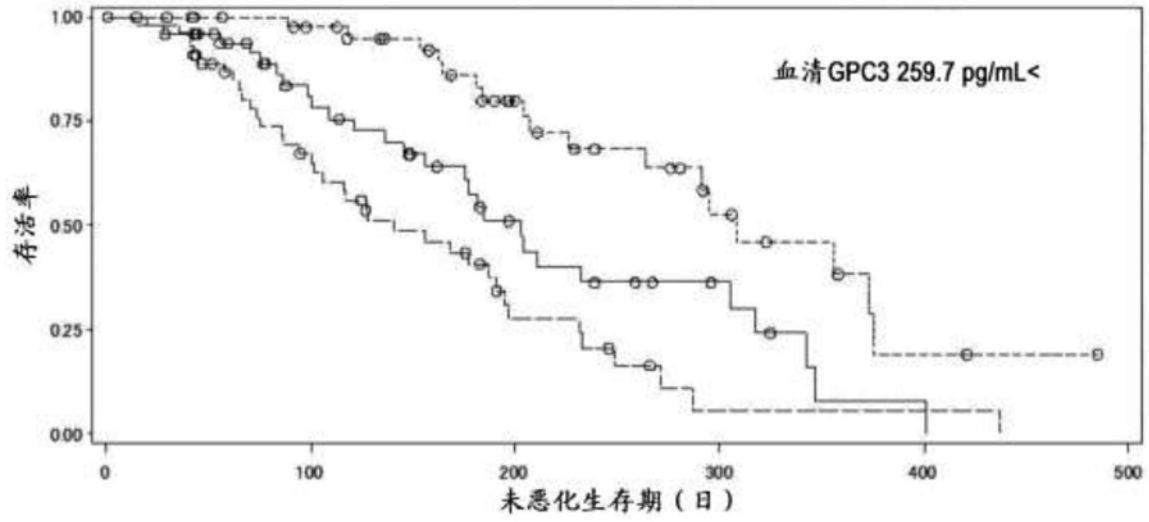


图8F

专利名称(译)	用于向GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者施予的GPC3靶向治疗剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN104871003B</a>	公开(公告)日	2019-12-20
申请号	CN201380067139.1	申请日	2013-12-24
申请(专利权)人(译)	中外制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	中外制药株式会社		
[标]发明人	大友俊彦 天野润 中村己贵子		
发明人	大友俊彦 天野润 中村己贵子		
IPC分类号	G01N33/574 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/16 A61P35/00 G01N33/48 G01N33/53 C07K16/30		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/303 G01N33/57438 G01N2400/00 A61K2039/54 A61K2039/545 A61P1/16 A61P35/00 C07K2317/73 G01N2800/52 A61K39/395 G01N33/574 C07K16/28 C07K2317/34 G01N2333/4722		
代理人(译)	杨宏军 牛蔚然		
优先权	2012280304 2012-12-21 JP		
其他公开文献	CN104871003A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种针对接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者确定GPC3靶向治疗剂疗法对所述患者或患者的癌症的有效性的方法、或确定是否继续对患者实施GPC3靶向治疗剂疗法的方法，所述方法包括监测生物学试样中的游离GPC3浓度，所述生物学试样是从接受GPC3靶向治疗剂疗法之前的患者和/或接受过GPC3靶向治疗剂疗法的患者分离的，所述方法中，该游离GPC3浓度为规定值时，确定该GPC3靶向治疗剂疗法是有效的，或者确定继续实施该GPC3靶向治疗剂疗法。此外，还公开了GPC3靶向治疗剂或制剂，用于向已确定GPC3靶向治疗剂疗法有效的患者、或已确定继续实施GPC3靶向治疗剂疗法的患者进一步施予。

基准	评价	分数
阳性细胞率 (PR)	0	0
	1%以上且小于 20%	1
	20%以上且小于 50%	2
	50%以上	3
染色强度 (SI)	轻微阳性	0
· 细胞质 (SI-cp)	弱阳性	1