

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成19年4月5日(2007.4.5)

【公表番号】特表2006-513225(P2006-513225A)

【公表日】平成18年4月20日(2006.4.20)

【年通号数】公開・登録公報2006-016

【出願番号】特願2004-564044(P2004-564044)

【国際特許分類】

A 6 1 K	45/06	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	31/7068	(2006.01)
A 6 1 K	31/704	(2006.01)
A 6 1 K	31/4745	(2006.01)
A 6 1 K	31/282	(2006.01)
A 6 1 K	33/24	(2006.01)
A 6 1 K	31/122	(2006.01)
A 6 1 K	31/337	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)

【F I】

A 6 1 K	45/06	
A 6 1 K	39/395	G
A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	31/7068	
A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	31/282	
A 6 1 K	33/24	
A 6 1 K	31/122	
A 6 1 K	31/337	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	43/00	1 1 1

【誤訳訂正書】

【提出日】平成19年1月30日(2007.1.30)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】化学療法剤と組み合わせたリンホトキシン 受容体因子

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、2002年12月20日提出の米国仮特許出願番号60/435185号の優先権を主張する。本願は、2002年12月20日提出の米国仮特許出願番号60/435154号にも関連する。これらの各特許および特許出願の内容全体が本明細書中で参考

として援用される。

#### 【0002】

##### (発明の分野)

本発明は、免疫学ならびに癌の診断および治療分野に属する。より詳細には、本発明は、治療方法における化学療法剤と組み合わせた活性化リンホトキシン受容体(LT-R)薬の使用に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

##### (発明の背景)

リンホトキシン受容体(本明細書中でLT--Rという)は、多数の免疫系細胞(濾胞性樹状細胞が含まれる)および多数の幹細胞性の免疫系の発達および機能維持の両方における役割が十分に記載されている腫瘍壞死因子ファミリーのメンバーである(Croweら(1994)Science 264:707; Browningら(1993)72:847; Browningら(1995)154:33; Matsumotoら(1997)Immunol. Rev. 156:137)。LT--Rの活性化により、インビオでの一定の癌細胞のアポトーシス性死を誘導することが示されている(PCT/US96/01386)。したがって、特異的ヒト化抗LT--R抗体などのアゴニストLT--R活性化因子での処置は、被験体(例えば、ヒト)の新形成の進行、重症度、または影響の処置または軽減に有用である。癌は、合衆国で5人の個体のうち約1人が罹患する今日の世界で最も一般的な健康上の問題の1つである。したがって、新形成細胞の成長抑制および種々の癌の処置は主要なヘルスニードであり、且つあり続ける可能性が高い。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0004】

##### (発明の要旨)

本発明は、部分的に、リンホトキシン受容体(LT--R)アゴニストおよびリンホトキシン受容体アゴニストではない化学療法剤の使用を含む、腫瘍体積の抑制および癌の処置方法を提供する。アゴニストと薬剤との組み合わせにより、アゴニストおよび薬剤の単独での効果の単純な和によって予想される以上の腫瘍抑制が達成される。このような効果を、本明細書中で「相乗的」抑制といい、相乗的または増強された相互作用に起因し得る。本発明はまた、本発明の方法の実施で使用するための薬学的組成物、送達デバイス、およびキットを提供する。

#### 【0005】

本発明は、有効量のリンホトキシン受容体(LT--R)アゴニストおよび有効量の少なくとも1種の化学療法剤を投与する工程と、前記LT--Rアゴニストおよび化学療法剤の投与によって腫瘍が相乗的に抑制されることとを含む、腫瘍体積の抑制方法を提供する。

#### 【0006】

本発明はまた、有効量の抗リンホトキシン受容体(LT--R)抗体および有効量の少なくとも1種の化学療法剤を投与する工程と、前記抗LT--R抗体および化学療法剤の投与によって腫瘍が相乗的に抑制されることとを含む、腫瘍体積の抑制方法を提供する。

#### 【0007】

本発明は、有効量のLT--Rアゴニスト、有効量の少なくとも1つの化学療法剤、および薬学的に受容可能なキャリアを含み、被験体への投与によって腫瘍が相乗的に抑制される、薬学的組成物を提供する。

#### 【0008】

本発明はまた、被験体に投与した場合に腫瘍が相乗的に抑制される癌処置薬調製用の有効量のリンホトキシン受容体(LT--R)アゴニストおよび有効量の化学療法剤の

使用を含む。

【0009】

本発明の1つの実施形態では、腫瘍の相乗的抑制が協力性である。さらなる実施形態では、腫瘍の相乗的抑制の組み合わせ指数 (combination index) が1.00未満である。さらに別の実施形態では、腫瘍の相乗的抑制が増強される。本発明のさらなる実施形態では、腫瘍の相乗的抑制のP値が0.05未満である。

【0010】

本発明の1つの実施形態では、LT- - Rアゴニストは、抗LT- - R抗体である。別の実施形態では、本発明の抗LT- - R抗体はモノクローナル抗体であり、モノクローナル抗体は、BKA11、CDH10、BCG6、AGH1、BDA8、CBE11、およびBHA10からなる群から選択される。本発明のさらに別の実施形態では、抗LT- - R抗体は、ヒト化抗体 (例えば、hucbe11およびhubha10が含まれる) である。さらに別の実施形態では、本発明の抗LT- - R抗体は、多価抗LT- - R抗体である。1つの実施形態では、多価抗LT- - R抗体構築物は多特異的である。

【0011】

本発明のさらに別の実施形態では、抗体は化学療法剤に結合している。

【0012】

本発明の1つの実施形態では、化学療法剤はDNA合成を妨害する薬剤である。1つの実施形態では、DNA合成を妨害する薬剤は、ヌクレオシドアナログ化合物 (例えば、ゲムシタビンが含まれる) である。さらに別の実施形態では、DNA合成を妨害する薬剤は、アントラサイクリン化合物 (例えば、アドリアマイシンが含まれる) である。

【0013】

本発明のさらに別の実施形態では、化学療法剤は、トポイソメラーゼIインヒビター (例えば、カンプトサールが含まれる) である。さらなる実施形態では、化学療法剤はアルキル化剤 (例えば、白金化合物が含まれる) である。1つの実施形態では、白金化合物は、カルボプラチニンおよびシスプラチニンのいずれかである。

【0014】

さらに別の実施形態では、本発明の化学療法剤は植物アルカロイドである。1つの実施形態では、植物アルカロイドがタキサン (例えば、タキソールが含まれる) である。

【0015】

1つの実施形態では、腫瘍体積の抑制方法は、有効量のリンホトキシン受容体 (LT- - R) アゴニストおよび有効量のリンホトキシン受容体アゴニストではない化学療法剤を投与する工程と、前記LT- - Rアゴニストおよび化学療法剤の投与によって腫瘍が相乗的に抑制されることとを含む。腫瘍の相乗的抑制は協力性であり得るが、一定の実施形態では、腫瘍の相乗的抑制の組み合わせ指数は1.00未満である。あるいは、組み合わせ指数は、約0.85と約0.90との間、約0.70と約0.85との間、約0.30と約0.70との間、約0.10と約0.30との間である。さらに別の実施形態では、組み合わせ指数は0.10未満である。他の実施形態では、腫瘍の相乗的抑制を増強することができ、一定の実施形態では、腫瘍の相乗的抑制のp値は0.05未満である。あるいは、腫瘍の相乗的抑制のp値は、約0.05と約0.04との間、約0.04と約0.03との間、約0.03と約0.02との間、約0.02と約0.01との間である。さらに別の実施形態では、p値は0.01未満である。

【0016】

任意の種々のLT- - Rアゴニストを、本発明の方法で使用することができる。一定の実施形態では、LT- - Rアゴニストは抗LT- - R抗体であり得る。1つの実施形態では、抗LT- - R抗体はモノクローナル抗体である。一定の実施形態では、モノクローナル抗体を、BKA11、CDH10、BCG6、AGH1、BDA8、CBE11、およびBHA10からなる群から選択することができる。他の実施形態では、抗LT- - R抗体はヒト化抗体である。一定の実施形態では、ヒト化抗体を、hucbe11

および huBHA10 からなる群から選択することができる。1つの実施形態では、ヒト化抗体は huCBE11 である。一定の実施形態では、本発明で使用するためのヒト化抗体を、E46.4 (ATCC 特許受託番号PTA-3357) または細胞株 E77.4 (ATCC 特許受託番号3765) からなる群から選択される細胞株によって產生することができる。さらに他の実施形態では、抗LT--R抗体は多価抗LT--R抗体構築物であり、一定の実施形態では、多特異的であり得る。本発明の1つの実施形態では、抗LT--R抗体は化学療法剤に結合している。

#### 【0017】

同様に、アゴニストと薬剤との組み合わせにより、アゴニストおよび薬剤の単独での効果の単純な和によって予想される以上の腫瘍抑制が達成される場合、任意の種々の化学療法剤を本発明の方法で使用することができる。一定の実施形態では、化学療法剤はDNA合成を妨害する薬剤である。1つの実施形態では、DNA合成を妨害する薬剤は、ヌクレオシドアナログ化合物である。1つの実施形態では、ヌクレオシドアナログ化合物はゲムシタビンである。別の実施形態では、DNA合成を妨害する薬剤は、アントラサイクリン化合物であり、一定の実施形態では、アントラサイクリン化合物はアドリアマイシンである。他の実施形態では、化学療法剤は、トポイソメラーゼIインヒビターである。1つの実施形態では、トポイソメラーゼIインヒビターは、イリノテカン（例えば、カンプトサールが含まれる）である。他の実施形態では、化学療法剤はアルキル化剤であり得る。1つの実施形態では、アルキル化剤は白金化合物であり、一定の実施形態では、カルボプラチニンおよびシスプラチニンからなる群から選択することができる。1つの実施形態では、白金化合物はシスプラチニンである。さらに他の実施形態では、化学療法剤は植物アルカロイドであり得る。1つの実施形態では、植物アルカロイドはタキサンであり、一定の実施形態では、タキソールであり得る。

#### 【0018】

本発明は、リンホトキシン受容体 (LT--R) アゴニストと共に投与した場合に腫瘍体積の抑制に相乗効果を示す化学療法剤のスクリーニング方法を提供する。1つの実施形態では、このような方法は、(a) 試験被験体中の第1の腫瘍と LT--R アゴニストとを接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程と、(b) 試験被験体中の比較可能な第2の腫瘍と候補化学療法剤とを接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程と、(c) 試験被験体中の比較可能な第3の腫瘍と LT--R アゴニストおよび候補化学療法剤の両方と接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程を含み、LT--R アゴニストおよび候補化学療法剤の両方の存在下での腫瘍体積の抑制が LT--R アゴニストおよび候補化学療法剤のそれぞれによる腫瘍体積抑制の合計よりも大きい場合、候補化学療法剤は、腫瘍体積抑制に相乗効果を示すと見なされる。

#### 【0019】

本発明の方法で使用するための薬学的組成物も提供する。1つの実施形態では、薬学的組成物は、有効量の LT--R アゴニスト、有効量の LT--R アゴニストではない化学療法剤、および薬学的に受容可能なキャリアを含み、LT--R アゴニストと化学療法剤との組み合わせ投与によって腫瘍が相乗的に抑制される。一定の実施形態では、化学療法剤は、DNA合成を妨害する薬剤、ヌクレオシドアナログ化合物、アルキル化剤、および植物アルカロイドからなる群から選択される。一定の実施形態では、LT--R アゴニストは抗LT--R抗体であり得るが、いくつかの実施形態では、ヒト化抗体であり得る。1つの実施形態では、ヒト化抗体は huCBE11 であり得る。他の実施形態では、抗LT--R抗体は、多価抗LT--R抗体構築物であり得る。

#### 【0020】

本方法で使用するためのさらなる薬学的送達デバイスを提供する。1つの実施形態では、薬学的送達デバイスは、有効量の LT--R アゴニスト、有効量の LT--R アゴニストではない化学療法剤、および薬学的に受容可能なキャリアを含むか、これらを入れることができ、デバイスを使用した LT--R アゴニストおよび化学療法剤の投与によって腫瘍が相乗的に抑制される。一定の実施形態では、デバイスを使用したアゴニストおよ

び化学療法剤の投与は同時である。一定の実施形態では、アゴニストおよび化学療法剤を、デバイスを使用した投与前にデバイス中で混合することができる。さらに他の実施形態では、デバイスを使用したアゴニストおよび化学療法剤の投与は連続的である。

#### 【0021】

本発明の組成物および送達デバイスを使用した癌の処置または腫瘍体積の抑制方法も提供する。1つの実施形態では、被験体の癌の処置方法は、被験体に有効量の本発明の薬学的組成物を投与する工程を含む。一定の実施形態では、被験体はヒトである。一定の実施形態では、癌は充実性腫瘍を含む。組成物を、腫瘍部位に局所的に投与することができる。1つの実施形態では、組成物を腫瘍動脈血供給に直接投与する。別の実施形態では、被験体の癌処置方法は、本発明の薬学的送達デバイスを使用して、有効量のLT--Rアゴニストおよび有効量のLT--Rアゴニストではない化学療法剤を被験体に投与する工程を含む。他の実施形態では、被験体の腫瘍体積の抑制方法は、有効量の本発明の組成物を被験体に投与する工程を含む。さらに別の実施形態では、被験体の腫瘍体積の抑制方法は、本発明の薬学的送達デバイスを使用して、有効量のLT--Rアゴニストおよび有効量のLT--Rアゴニストではない化学療法剤を被験体に投与する工程を含む。

#### 【0022】

本発明は、さらに、本発明の薬学的組成物または薬物送達デバイスおよび任意選択的にその使用説明書を含むキットを提供する。このようなキットの使用には、例えば、治療への適用が含まれる。一定の実施形態では、任意のキット中に含まれる本発明の組成物は凍結乾燥されており、使用前に再水和する必要がある。

#### 【0023】

1つの実施形態では、本発明は、デバイスを使用したLT--Rアゴニストおよび化学療法剤の投与によって腫瘍が相乗的に抑制されるように、(1)有効量のLT--Rアゴニスト、(2)有効量のLT--Rアゴニストではない少なくとも1つの化学療法剤、および(3)薬学的に受容可能なキャリアを含むかこれらを入れることができる薬学的送達デバイスを提供する。1つの実施形態では、デバイスにより、LT--Rアゴニストおよび化学療法剤が同時に投与される。別の実施形態では、デバイスでの同時投与前にLT--Rアゴニストおよび化学療法剤をデバイス中で混合する。個別の実施形態では、デバイスを使用してLT--Rアゴニストおよび化学療法剤を連続的に投与する。

#### 【0024】

他の実施形態では、前述の任意の薬学的送達デバイスを使用した有効量のLT--Rアゴニストおよび有効量のLT--Rアゴニストではない化学療法剤の被験体への投与によって被験体の癌を処置する。

#### 【0025】

本発明の別の実施形態は、特許請求の範囲に記載の任意の薬学的組成物の有効量の薬学的組成物を被験体に投与する工程を含む、患者の癌の処置方法を提供する。1つの実施形態では、被験体はヒトである。別の実施形態では、癌は充実性腫瘍を含む。充実性腫瘍の処置のために、1つの実施形態は、腫瘍部位への薬学的組成物の局所的投与を提供する。充実性腫瘍の処置に関する別の実施形態では、薬学的組成物を、腫瘍の動脈血供給に直接投与する。

#### 【0026】

本発明の別の実施形態では、有効量の任意の上記薬学的組成物の被験体への投与によって、被験体の腫瘍体積を抑制する。個別の実施形態では、任意の上記薬学的送達デバイスを使用した有効量のLT--Rアゴニストおよび有効量のLT--Rアゴニストではない化学療法剤の被験体への投与によって、被験体の腫瘍体積を抑制する。

#### 【0027】

さらに別の実施形態では、本発明は、上記の任意の薬学的組成物を含む、被験体の癌の処置用キットを提供する。別の実施形態では、キットは、さらに、被験体に組成物を投与するための説明書を含む。

#### 【0028】

別の実施形態では、本発明は、有効量の L T - - R アゴニストおよび有効量の L T - - R アゴニストではない化学療法剤ならびに任意選択的に使用説明書を含む、薬学的送達デバイスを使用した被験体の癌の処置用キットを提供する。

#### 【 0 0 2 9 】

最後の実施形態では、本発明は、リンホトキシン 受容体 ( L T - - R ) アゴニストと一緒に投与した場合に腫瘍体積抑制に相乗効果を示す、化学療法剤のスクリーニング方法を提供する。本方法は、以下：

( a ) 試験被験体中の第 1 の腫瘍と L T - - R アゴニストとを接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程；

( b ) 試験被験体中の比較可能な第 2 の腫瘍と候補化学療法剤とを接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程；および

( c ) 試験被験体中の比較可能な第 3 の腫瘍と L T - - R アゴニストおよび候補化学療法剤の両方とを接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程、  
を包含し、

ここで、 L T - - R アゴニストおよび候補化学療法剤の両方の存在下での腫瘍体積の抑制が L T - - R アゴニストおよび候補化学療法剤のそれぞれによる腫瘍体積抑制の合計よりも大きい場合、この候補化学療法剤は、腫瘍体積抑制に相乗効果を示すと見なされる。

#### 【 0 0 3 0 】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

##### ( 発明の詳細な説明 )

###### ( 1 . 定義 )

便宜上、本発明のさらなる説明前に、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲中の一定の使用用語をここに定義する。

#### 【 0 0 3 1 】

文脈中で別であることが明確に示されていない限り、単数形「一つの」(「 a 」、「 a n 」)、および「その」(「 t h e 」)には複数形が含まれる。

#### 【 0 0 3 2 】

用語「投与する」は、被験体の系または被験体中または被験体上の特定の領域への薬学的組成物または治療薬の任意の送達方法を含む。本明細書中で使用される、句「全身投与」、「全身に投与する」、「末梢投与」、および「末梢に投与する」は、患者の系に侵入し、それにより代謝および他の同様のプロセスを受けるような中枢神経系への化合物、薬剤、または他の材料の直接以外の投与(例えば、皮下投与)を意味する。「非経口投与」および「非経口で投与する」は、通常注射による経腸および局所投与以外の投与様式(静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、および胸骨内への注射および注入が含まれるが、これらに限定されない)を意味する。

#### 【 0 0 3 3 】

用語「DNA合成を妨害する薬剤」は、DNA合成プロセスを減少または阻害することができる任意の分子または化合物をいう。DNA合成を妨害する薬剤の例には、トポイソメラーゼ I などのDNA合成に影響を与えるか促進する酵素のインヒビターまたはピリミジンまたはプリンアナログなどのヌクレオシドアナログが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 3 4 】

用語「アルキル化剤」は、(例えば、アミン、アルコール、フェノール、有機酸、および無機酸)の求核基と反応し、それによりタンパク質または核酸などの別の分子にアルキル基(例えば、エチル基またはメチル基)を付加することができる任意の分子または化合物をいう。化学療法剤として使用されるアルキル化剤の例には、ブスルファン、クロラムブシル(chlorambucil)、シクロホスファミド、イフォスファミド、メクロ

レタミン、メルファラン、チオテバ、種々のニトロソ尿素化合物、ならびにシスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金化合物が含まれる。

【0035】

用語「抗腫瘍活性」は、物質または組成物と相互作用する腫瘍細胞の増殖を遮断するか腫瘍の細胞死を誘導する物質または組成物の能力をいう。用語「アポトーシス」は、プログラム細胞死のプロセスをいう。

【0036】

用語「癌」または「新形成」は、一般に、任意の悪性新生物または細胞の自然成長または増殖をいう。本明細書中で使用されるこの用語は、完全に発達した悪性新生物および前癌病変を含む。「癌」を有する被験体は、例えば、腫瘍または白血病などの白血球増殖を有し得る。一定の実施形態では、癌を有する被験体は、充実性腫瘍などの腫瘍を有する被験体である。充実性腫瘍を含む癌には、非小細胞肺癌（NSCLC）、精巣癌、肺癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、結腸直腸癌（CRC）、乳癌、前立腺癌、胃癌、皮膚癌、胃癌、食道癌、および膀胱癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0037】

用語「化学療法剤」は、外来細胞または腫瘍細胞などの悪性細胞に起因する疾患の処置に使用される任意の分子または組成物をいう。本明細書で意図される化学療法剤には、本発明の抗体と結合することができる薬剤または抗体と結合することなく本発明の抗体と組み合わせて使用することができる薬剤が含まれる。本発明の1つの実施形態では、本発明の抗体と組み合わせて使用することができる化学療法剤には、以下が含まれるが、これらに限定されない：白金（すなわち、シスプラチン）、アントラサイクリン、ヌクレオシドアナログ（ブリンおよびピリミジン）、タキサン、カンプトセシン、エピポドフィロトキシン、DNAアルカリ化剤、葉酸アンタゴニスト、ビンカアルカロイド、リボヌクレオチドレダクターゼインヒビター、エストロゲンインヒビター、プロゲステロンインヒビター、アンドロゲンインヒビター、アロマターゼインヒビター、インターフェロン、インターロイキン、モノクローナル抗体、タキソール、カンプトサール、アドリアマイシン（dox）、5-FU、およびゲムシタビン。このような化学療法剤を、抗体および化学療法剤の同時投与によって本発明の抗体と組み合わせて本発明の実施において使用することができる。1つの実施形態では、本発明の抗体は、化学療法剤と結合していない。本発明の別の実施形態では、化学療法剤と抗LT-Rアゴニスト抗体とは結合している。

【0038】

用語「組み合わせ指数」は、ChouおよびTalalay（1984）Adv. Enz. Regul. 22: 27の方法によって決定される少なくとも2つの分子または化合物の組み合わせ用量-効果の基準をいい、発明の詳細な説明および実施例にさらに説明する。用量効果が協力性である場合、組み合わせ指数は1.00未満である。あるいは、相乗効果を示す組み合わせ指数は約0.85と約0.90との間、約0.70と約0.85との間、約0.30と約0.70との間、約0.10と約0.30との間であり得る。

【0039】

用語「有効量」は、所望の効果（例えば、インビトロまたはインビオのいずれかでの腫瘍体積の減少が含まれるが、これに限定されない）に影響を与えるのに十分な本発明の化合物、材料、または化合物を含む組成物の量をいう。本発明の薬学的組成物の有効量は、所望の臨床結果（例えば、患者の癌の改善、安定化、防止、または進行の遅延が含まれるが、これらに限定されない）に影響を与えるのに十分な薬学的組成物の量である。いずれの場合も、有効量の本発明の化合物を、1回または複数回投与することができる。これらの上記指標の検出および測定は当業者に公知であり、例えば、全身腫瘍組織量の減少、腫瘍サイズの抑制、二次腫瘍増殖の減少、腫瘍組織中の遺伝子発現、バイオマーカーの存在、リンパ節転移、組織学的悪性度、および核異型度が含まれるが、これらに限定されない。

【0040】

用語「ヒト化抗体」は、ある種由来の抗体の相補性決定領域（CDR）をヒトの可変領

域のフレームワーク領域に移植した抗体または抗体構築物をいう。

【0041】

用語「腫瘍体積の抑制」は、腫瘍体積の任意の低減または減少をいう。薬学的組成物または治療薬の腫瘍体積を抑制する能力を、「影響率」によって測定することができる。用語「影響率(Fa)」は、処置群の平均腫瘍体積減少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって計算した腫瘍抑制率の基準をいう。1.000のFaは、腫瘍の完全な抑制を示す。Faの計算を、発明の詳細な説明にさらに記載する。

【0042】

用語「リンホトキシン受容体(LT--R)アゴニスト」は、LT--Rへのリガンド結合、細胞表面LT--Rクラスター形成、および/またはLT--Rシグナル伝達を増加させることができる任意の薬剤をいう。

【0043】

用語「抗LT--R抗体」は、LT--受容体の少なくとも1つのエピトープを認識して結合する任意の分子をいう。抗LT--R抗体の例には、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および多価抗体が含まれる。「抗体」は、例えば、任意のイソ型の抗体全体(IgG、IgA、IgM、IgEなど)を含むことが意図され、そして脊椎動物(例えば、哺乳動物)のタンパク質とも特異的に反応するそのフラグメントおよび抗体フラグメントを含む融合タンパク質を含有する。従来の技術を使用して抗体を断片化し、フラグメントを上記の抗体全体と同一の様式で有用性についてスクリーニングすることができる。したがって、この用語には、一定のタンパク質と選択的に反応することができる抗体分子のタンパク質分解酵素で切断されたか組換えによって調製された部分のセグメントが含まれる。このようなタンパク質分解および/または組換えフラグメントの非限定的な例には、ペプチドリンカーやによって連結されたV[L]および/またはV[H]ドメインを含むFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv、および一本鎖抗体(sFv)が含まれる。用語「抗体」には、5つのIgクラス(例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM)のうちの任意の1つ由来の定常領域に結合した2つまたはそれより多くの可変領域を含み得る「抗体構築物」も含まれる。本発明には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、または抗体および組換え抗体の他の精製調製物が含まれる。

【0044】

用語「モノクローナル抗体」は、特定のエピトープと免疫反応するか結合することができる抗原結合部位をたった1種類だけ含む抗体分子をいう。エピトープに指向するモノクローナル抗体、その誘導体、フラグメント、アナログ、またはホモログの調製のために、連続細胞株培養によって抗体分子の產生を提供する任意の技術を使用することができる。このような技術には、ハイブリドーマ技術(KohlerおよびMilstein(1975)Nature 256:495-497を参照のこと)；トリオーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら(1983)Immunol.Today 4:72を参照のこと)、およびヒトモノクローナル抗体を產生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら, 1985 In:Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96を参照のこと)が含まれるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体を本発明の実施で使用することができ、ヒトハイブリドーマ(Coteら(1983). Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 80:2026-2030を参照のこと)またはインビトロでのエプスタイン・バーウイルスでのヒトB細胞の形質転換(Coleら(1985)In:Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96を参照のこと)の使用によって產生することができる。

【0045】

句「多価抗体」または「多価抗体構築物」は、1つを超える抗原認識部位を含む抗体または抗体構築物をいう。例えば、「2価」抗体構築物は、2つの抗原認識部位を有するの

に対し、「4価」抗体構築物は4つの抗原認識部位を有する。用語「单一特異性」、「二重特異性」、「三重特異性」、「四重特異性」などは、本発明の多価抗体構築物中に存在する異なる抗原認識部位の特異性数（抗原認識部位数と対照的）をいう。例えば、「单一特異性」抗体構築物の抗原認識部位は全て同一のエピトープに結合する。「二重特異性」抗体構築物は、第1のエピトープに結合する少なくとも1つの抗原認識部位および第1のエピトープと異なる第2のエピトープに結合する少なくとも1つの抗原認識部位を有する。「多価单一特異性」抗体構築物は、同一のエピトープに全て結合する複数の抗原認識部位を有する。「多価二重特異性」抗体構築物は、複数の抗原認識部位を有し、そのうちのいくつかが第1のエピトープに結合し、いくつかが第1のエピトープと異なる第2のエピトープに結合する。このような多価抗体構築物ならびにその作製および使用方法の例は、2002年12月20日提出の発明の名称が「Anti-LT--R Multispecific Multivalent Antibody Constructs, and Methods of Making and Using the Same」の仮特許出願（2002年、12月20日提出の米国仮特許出願番号60/435154号）（その全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されている。

#### 【0046】

用語「P値」は、確率値をいう。p値は、試験によって得られた結果が偶然のみにどの程度起因する可能性があるかを示す。本発明の1つの実施形態では、両側1標本T検定のp値である。0.05未満のp値が統計的に有意であると見なされる（すなわち、偶然のみに起因する可能性がない）あるいは、統計的に有意なp値は、約0.05と約0.04との間、約0.04と約0.03との間、約0.03と約0.02との間、約0.02と約0.01との間であり得る。一定の場合、p値は0.01未満であり得る。本明細書中で使用される、p値を、リンホトキシン受容体（LT--R）アゴニストおよびリンホトキシン受容体アゴニストではない化学療法剤を腫瘍または腫瘍を有する被験体に投与した場合に腫瘍体積に対する任意の統計的に有意な相乗的阻害が存在するかどうか測定するため使用する。不定期のある日よりもむしろ一連の処置日で統計的有意性が認められる場合にp値に生物学的関連性が存在する。

#### 【0047】

「患者」、「被験体」、または「宿主」は、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかをいう。

#### 【0048】

用語「薬学的送達デバイス」は、被験体への治療薬の投与に使用することができる任意のデバイスをいう。薬学的送達デバイスの非限定的な例には、皮下注射用シリンジ、多室シリンジ、ステント、カテーテル、経皮パッチ、顕微針、マイクロアブレーダー、および移植可能な徐放デバイスが含まれる。1つの実施形態では、用語「薬学的送達デバイス」は、注射前に2つの化合物を混合することができる2室シリンジをいう。

#### 【0049】

句「薬学的に受容可能な」を、本明細書中で、妥当な利益／リスク比と釣り合っており、過剰な毒性も、過剰な刺激も、過剰なアレルギー反応も、他の問題も合併症も伴うことがない、ヒトおよび動物組織との接触での使用に正常な医学的判断の範囲内で適切な化合物、材料、組成物、および／または投薬形態をいうために使用する。

#### 【0050】

本明細書中で使用される、句「薬学的に受容可能なキャリア」は、ある器官または身体の一部から別の器官または身体の一部への本発明の化合物の運搬または輸送に関与する液体もしくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、または溶媒カプセル化物質などの薬学的に受容可能な材料、組成物、またはビヒクルを意味する。各キャリアは、処方物の他の成分と適合可能であり、且つ患者に有害でないという意味で許容可能でなければならない。薬学的に受容可能なキャリアとして使用することができる材料のいくつかの例には、（1）ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖、（2）トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン、（3）セルロースならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、およびセルロースアセテートなどの誘導体、（4）

粉末トラガカント、(5)麦芽、(6)ゼラチン、(7)タルク、(8)ココアバターおよび座剤用ワックスなどの賦形剤、(9)ピーナツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、およびダイズ油などの油、(10)プロピレングリコールなどのグリコール、(11)グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール、(12)オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル、(13)寒天、(14)水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤、(15)アルギン酸、(16)無発熱物質水、(17)等張生理食塩水、(18)リングル液、(19)エチルアルコール、(20)pH緩衝化溶液、(21)ポリエステル、ポリカーボネート、および／またはポリアンヒドライド、ならびに(22)薬学的处方物で使用される他の無毒の適合可能な物質が含まれる。

#### 【0051】

「薬学的に受容可能な塩」は、化合物の比較的無毒の無機酸付加塩および有機酸付加塩をいう。これらの塩を、投与ビヒクルもしくは投薬形態製造プロセスにおいて in situで調製するか、遊離塩基形態の本発明の精製化合物と適切な有機酸もしくは無機酸との個別の反応、およびその後の精製におけるこのようにして形成された塩の単離によって調製することができる。本発明の化合物の薬学的に受容可能な塩には、例えば、非毒性有機酸または無機酸由来の化合物の従来の非毒性塩または第四級アンモニウム塩が含まれる。

#### 【0052】

用語「植物アルカロイド」は、生物学的に活性であり細胞傷害性を示す、植物由来のアルカリ性窒素含有分子のファミリーに属する化合物をいう。植物アルカロイドの例には、ドセタキセルおよびパクリタキセルなどのタキサンならびにピンプラスチン、ピンクリスチン、およびビノレルビンなどのピンカが含まれるが、これらに限定されない。1つの実施形態では、植物アルカロイドはタキソールである。

#### 【0053】

用語「相乗的」は、薬剤の組み合わせ由来の効果の合計が個別の薬剤による効果の合計よりも高い薬剤の組み合わせ由来の効果をいう。相乗効果の例には、増強および協力作用が含まれる。用語「増強」は、2つまたはそれより多くの薬剤の同時効果が薬剤の個別の効果の合計を超える場合をいう。1つの実施形態では、第1の薬剤を単独で投与した場合に抑制効果を示さないが、組み合わせて投与した場合に第2の薬剤の効果を増強する場合、増強が起こる。本発明の1つの実施形態では、LT--Rアゴニストまたは化学療法剤の1つのみが個別に腫瘍体積を抑制する能力を有するが、組み合わせると薬剤の効果が増強される。

#### 【0054】

用語「腫瘍の相乗的抑制」は、個別の薬剤に起因する薬剤の組み合わせの効果の合計を超える腫瘍体積の全減少をいう。本発明の1つの実施形態では、腫瘍の相乗的抑制には、LT--Rアゴニストまたは化学療法剤のいずれかのみの個別の投与によって得られた腫瘍抑制の合計を統計学的に有意に超えるLT--RアゴニストとLT--Rアゴニストではない化学療法剤との組み合わせの投与によって得られた平均腫瘍抑制が含まれる。LT--Rアゴニストと化学療法剤との組み合わせ投与によって得られた腫瘍阻害が予想される各化合物の値の和よりも「統計的に有意に高い」かどうかを、発明の詳細な説明に記載の種々の統計学的方法によって決定することができる。

#### 【0055】

用語「協力性」は、任意の2つまたはそれより多くの単一薬剤の効果の和よりも有効な組み合わせをいう。本発明の1つの実施形態では、用語「協力性」は、LT--Rアゴニストおよび化学療法剤の両方がそれぞれ腫瘍体積の抑制能力を有する相乗的抑制型を含む。

#### 【0056】

用語「トポイソメラーゼⅠインヒビター」は、トポイソメラーゼⅠ酵素の生物活性を抑制または低減する分子または化合物をいう。トポイソメラーゼⅠインヒビターの非限定的

な例には、ダウノルビシン、ドキソラビシン、およびイダムビシンなどのアントラサイクリンならびにエトポシドおよびテニポシドなどのエピポドフィロトキシンが含まれる。

#### 【0057】

「癌処置」または「癌を有する被験体の処置」は、癌の範囲が減少するか妨げられるような薬学的処置薬を被験体に投与すること(例えば、薬物の投与)をいう。癌処置は、癌細胞の複製の抑制、癌の拡大の抑制、腫瘍サイズの減少、体内の癌細胞数の減少または低減、および/または癌に起因する疾患の症状の改善もしくは緩和を意味する。処置は、死亡率および/または罹患率が減少する場合に、治療と見なされる。本発明の1つの実施形態では、用語「癌処置」は、腫瘍サイズの減少をいう。処置には、薬学的組成物などの組成物の投与が含まれ(これらに限定されない)、予防的または病理学的事象の開始後のいずれかで行うことができる。

#### 【0058】

用語「腫瘍体積」は、腫瘍自体および適用可能な場合に罹患リンパ節を含む腫瘍の大きさの合計をいう。腫瘍体積を、当該分野で公知の種々の方法(例えば、キャリパーを使用した腫瘍の寸法の測定、コンピュータ断層撮影(CT)スキャンまたは磁気共鳴画像診断(MRI)スキャン、ならびに例えばz軸直径、または球形、橢円、または立方体などの標準的形状に基づいた方程式を使用した体積の計算など)によって決定することができる。

(2. リンホトキシン 受容体(LT- - - R)アゴニスト)

任意の種々のLT- - - Rアゴニストを本発明の方法で使用することができる。米国特許第6,312,691号およびWO96/22788号(その内容全体が本明細書中で参考として援用される)は、癌細胞死を誘発するためにLT- - - Rアゴニストを使用した癌処置のための方法および組成物を記載する。例えば、米国特許第6,312,691号は、本発明で使用するためのLT- - - Rアゴニスト(膜結合LT- / 複合体、可溶性LT- / 複合体、および抗LT- - - R抗体が含まれる)ならびに調製および精製のための方法を記載する。

#### 【0059】

表面LT- / ヘテロマー複合体を、LT- 遺伝子およびLT- 遺伝子の両方での宿主細胞の同時トランスフェクションによって再構築することができる。表面LT複合体を、いずれかのLT遺伝子のみを発現する安定な細胞株では認められない。しかし、通常、宿主細胞が大量のLT- を産生する場合(例えば、RPMI1788細胞;以下を参照のこと)、所望のLT- ポリペプチドをコードするLT- 遺伝子でのトランスフェクションは、全長LT- サブユニットを含むLT- / 複合体の作製に十分なはずである。

#### 【0060】

多数の真核生物発現系でのLT- ポリペプチドおよびLT- ポリペプチドの同時発現により、そのアセンブリが得られ、活性リガンドとして搬出される(Croweら, J. Immunol. Methods, 168, 79-89(1994))。使用することができる宿主系には、CHO細胞、COS細胞、B細胞(骨髄腫が含まれる)、バキュロウイルス感染昆虫細胞、および酵母が含まれるが、これらに限定されない。本発明のLT- / ヘテロマー複合体のLT- サブユニットを、リンホトキシン、天然のヒトまたは動物リンホトキシン、組換えリンホトキシン、可溶性リンホトキシン、分泌性リンホトキシン、LT- 生物活性を有するリンホトキシン変異タンパク質、またはLT- 生物活性を有する任意の上記のリンホトキシンフラグメントから選択することができる。

#### 【0061】

可溶性(非膜結合)LT- / ヘテロマー複合体は、膜結合形態から可溶性形態に変化したLT- サブユニットを含む。これらの複合体は、出願人の同時係属国際出願(1992年1月9日にWO94/13808号として公開のPCT/US93/11669)に詳述されている。可溶性LT- ペプチドを、Brownингら(1993)Ce

11 72 : 847 の付番方式にしたがって、膜貫通領域の末端（すなわち、およそアミノ酸番号44）と第1のTNF相同領域（すなわち、アミノ酸番号88）との間の任意のポイントで配列が切断されたリンホトキシンのアミノ酸配列によって定義する。

【0062】

可溶性LT-ポリペプチドを、細胞質テールおよび膜貫通領域を除去するためのLT-のN末端の短縮によって産生することができる（Crownら, Science, 264, pp. 707-710 (1994)）。あるいは、膜貫通ドメインを、欠失または通常は膜貫通ドメインを含む疎水性アミノ酸残基の親水性の残基への置換によって不活化することができる。いずれの場合も、脂質親和性を減少し、水溶性を改善する実質的に親水性のハイドロパシープロフィールを作成した。潜在的免疫原性エピトープの導入が回避されるので、親水性アミノ酸残基と置換して膜貫通ドメインを欠失させるのが好ましい。

【0063】

可溶性LT- / ヘテロマー複合体を、LT- および可溶性LT- をコードするDNAでの適切な宿主細胞の同時トランスフェクションによって産生することができる（Crownら, (1994) J. Immunol. Methods, 168: 79）。LT- の非存在下で分泌された可溶性LT- は高度にオリゴマーを形成している。しかし、LT- と同時発現した場合、両タンパク質を含む70kDaの三量体様構造が形成される。可溶性LT- ポリペプチドをコードする遺伝子での通常はLT- のみを発現する細胞株（上記考察の RPMI 1788 細胞など）へのトランスフェクションによって可溶性LT- 1 / 2 ヘテロマー複合体を産生することも可能である。LT- およびLT- ポリペプチドを個別に合成し、マイルドな界面活性剤を使用して変性させ、共に混合し、界面活性剤の除去によって復元して、混合LTヘテロマー複合体を形成することができ、この複合体は、分離することができる（以下を参照のこと）。

【0064】

一定の実施形態では、LT- - Rアゴニストは抗LT- - R抗体であり得る。一定の実施形態では、抗LT- - R抗体は、ポリクローナル抗体であり得る。免疫化後、LT- - Rと反応性を示す抗血清を得ることができ、所望ならば、血清からポリクローナル抗体を単離することができる。別の実施形態では、抗LT- - R抗体はモノクローナル抗体である。一定の実施形態では、モノクローナル抗体を、BKA11、CDH10、BCG6、AGH1、BDA8、CBE11、およびBHA10からなる群から選択することができる。モノクローナル抗体を産生するために、抗体産生細胞（リンパ球）を、免疫動物から採取し、標準的な体細胞融合手順によって骨髄腫細胞などの不死化細胞と融合してハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技術は当該分野で周知であり、例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbarら, (1983) Immunology Today, 4: 72）のようなハイブリドーマ技術（最初、Kohler and Milstein, (1975) Nature, 256: 495 - 497によって開発された）およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術（Coleら, (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77 - 96）が含まれる。ハイブリドーマ細胞を、LT- - Rと特異的な反応性を示す抗体および単離されたモノクローナル抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングすることができる。一定の実施形態では、本発明で使用するためのモノクローナル抗体を、表1中の細胞株からなる群から選択される細胞株によって産生することができる。

【0065】

## 【表1】

表1:

細胞株	mAb名	受託番号
a) AG.H1.5.1	AGH1	HB 11796
b) BD.A8.AB9	BDA8	HB 11798
c) BC.G6.AF5	BCG6	B 11794
d) BH.A10	BHA10	B 11795
e) BK.A11.AC10	BKA11	B 11799
f) CB.E11.1	CBE11	B 11793
g) CD.H10.1	CDH10	B 11797

他の実施形態では、抗 L T - - R 抗体はヒト化抗体である。一定の実施形態では、ヒト化抗体を、 hu C B E 1 1 および hu B H A 1 0 からなる群から選択することができる。1つの実施形態では、P C T 公開番号 W O 0 2 / 3 0 9 8 6 ; 米国仮特許出願番号 6 0 / 2 4 0 , 2 8 5 号 ; 米国仮特許出願番号 6 0 / 2 7 5 , 2 8 9 号 ; 米国仮特許出願番号 6 0 / 2 9 9 , 9 8 7 号に記載のように、ヒト化抗体は hu C B E 1 1 である。別の実施形態では、P C T 出願番号 P C T U S 0 3 / 2 0 7 6 2 号 ; 米国仮特許出願番号 6 0 / 3 9 2 , 9 9 3 号 ; および米国仮特許出願番号 6 0 / 4 1 7 , 3 7 2 号に記載のように、ヒト化抗体は hu B H A 1 0 である。

## 【0066】

上記表中の出願人の出願（その内容全体が本明細書中で参考として援用される）は、癌細胞死を誘発するための hu C B E 1 1 および hu B H A 1 0 をそれぞれ使用した癌処置のための方法および組成物を記載する。動物を所望の抗原で免疫化し、対応する抗体を単離し、特異的抗原結合を担う可変領域配列部分を取り出す。次いで、動物由来の抗原結合領域を、抗原結合領域が欠失したヒト抗体遺伝子の適切な位置にクローニングする。例えば、 Jones , P. ら ( 1 9 8 6 ) , N a t u r e 3 2 1 , 5 2 2 - 5 2 5 または T e m p e s t ら ( 1 9 9 1 ) B i o t e c h n o l o g y 9 , 2 6 6 - 2 7 3 を参照のこと。また、トランスジェニックマウスまたは他の哺乳動物を使用して、ヒト化抗体を発現することができる。このようなヒト化は、部分的であっても完全であってもよい。ヒト化抗体は、ヒト抗体中の異種（種間）配列の使用を最小にし、処置した被験体において免疫応答を誘発する可能性が低い。一定の実施形態では、本発明で使用するためのヒト化抗体を、 E 4 6 . 4 ( A T C C 特許受託番号 P T A - 3 3 5 7 ) または細胞株 E 7 7 . 4 ( A T C C 特許受託番号 3 7 6 5 ) からなる群から選択される細胞株によって產生することができる。

## 【0067】

抗 L T - - R 抗体の種々の形態を、標準的な組換え D N A 技術 ( W i n t e r および M i l s t e i n , N a t u r e , 3 4 9 , p p . 2 9 3 - 9 9 ( 1 9 9 1 ) ) を使用して作製することもできる。例えば、動物抗体由来の抗原結合ドメインがヒト定常ドメインに連結した「キメラ」抗体を構築することができる（例えば、 C a b i l l y らに付与された米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号 ; M o r r i s o n ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , 8 1 , p p . 6 8 5 1 - 5 5 ( 1 9 8 4 ) ）。キメラ抗体は、ヒト臨床治療で使用した場合に動物抗体によって誘発される観察される免疫応答を減少させる。異なるクラスの免疫グロブリンから単離された抗 L T - - R 可変ドメインおよびヒト定常ドメイン ( C H 1 、 C H 2 、 C H 3 ) を含むキメラ抗体またはヒト化抗体の作製によって、組換え抗 L T - - R 抗体の異なるクラスを構築することもできる。例え

ば、抗原結合部位の価数が増加した抗LT- - R IgM抗体を、ヒト $\mu$ 鎖定常領域を保有するベクターへの抗原結合部位のクローニングによって組換え產生することができる (Arulanandamら, J. Exp. Med., 177, pp. 1439-50 (1993); Laneら, Eur. J. Immunol., 22, pp. 2573-78 (1993); Trauneckerら, Nature, 339, pp. 68-70 (1989))。さらに、標準的な組換えDNA技術を使用して、抗原結合部位周囲のアミノ酸残基の変化によって組換え抗体のその抗原に対する結合親和性を変化させることができる。例えば、(Queenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, pp. 10029-33 (1989); WO 94/04679号)を参照のこと。

#### 【0068】

当該分野で公知のように、本発明の抗LT- - R抗体を架橋することもできる。架橋後の最終結合体は、血液などの生理液に可溶性を示すことが好ましい。ポリマーは結合体形態で高免疫原性であるべきでなく、静脈内注入または注射のいずれかの投与経路を意図する場合、これらに適合可能な粘度を有するべきである。

#### 【0069】

さらに他の実施形態では、抗LT- - R抗体は多価抗LT- - R抗体構築物であり、一定の実施形態では、多特異性であり得る。このような多価抗体構築物ならびにその作製および使用方法の例は、同日付で発明の名称が「Anti-LT- - R Multispecific Multivalent Antibody Constructs, and Methods of Making and Using the Same」(その全体が本明細書中で参考として援用される)である米国仮特許出願番号60/435,154号およびPCT出願番号\_\_\_\_\_号に記載されている。

#### 【0070】

1つの実施形態では、多価抗体はリンホトキシン受容体のアゴニストであり、受容体に結合することができる少なくとも2つのドメインを含み、LT- - Rシグナル伝達を誘導する。これらの構築物は、LT- - 受容体への結合に特異的な抗原認識部位を含む2つまたはそれより多くの可変領域を含む重鎖および1つまたは複数の可変領域を含む軽鎖を含み得るか、LT- - 受容体への結合に特異的なCDRを含む2つまたはそれより多くの可変領域を含む重鎖または軽鎖のみを含む様に構築することができる。

#### 【0071】

1つの態様では、本発明は、ヒトリンホトキシン受容体(LT- - R)アゴニストである多価抗体構築物を含む。1つの実施形態では、多価抗体構築物は、LT- - Rエピトープに特異的な少なくとも1つの抗原認識部位を含む。一定の実施形態では、少なくとも1つの抗原認識部位はscFvドメイン内に存在する一方で、他の実施形態では、全ての抗原認識部位はscFvドメイン内に存在する。

#### 【0072】

抗体構築物は、2価、3価、4価、または5価であり得る。一定の実施形態では、抗体構築物は単一特異性である。1つの実施形態では、抗体構築物は、CB11に結合するエピトープに特異的である。他の実施形態では、本発明の抗体は、4つのCB11抗原認識部位を含む単一特異性の4価のLT- - Rアゴニスト抗体である。別の実施形態では、抗体構築物は、BHA10エピトープに特異的であり、いくつかの実施形態では、4価である。任意のこれらの実施形態では、少なくとも1つの抗原認識部位は、scFvドメイン上に存在し得るが、一定のこれらの実施形態では、全ての抗原認識部位がscFvドメイン上に存在し得る。抗体は、多特異性であり得、ここで、本発明の抗体はヒトLT- - 受容体上の異なるエピトープに結合する。

#### 【0073】

一定の実施形態では、抗体構築物は二重特異性である。他の実施形態では、抗体構築物は、以下の抗体の1つが結合するエピトープからなるリンホトキシン受容体(LT- - R)エピトープ群の少なくとも2つのメンバーに特異的である: BKA11、CDH10、BCG6、AGH1、BDA8、CB11、およびBHA10。1つの実施形態で

は、抗体構築物は、CBE11およびBHA10抗体が結合するエピトープに特異的であり、一定の実施形態では、4価である。1つの実施形態では、抗体構築物は、2つのCBE11特異的抗原認識部位および2つのBHA10特異的認識部位を有し、抗体は二重特異性の4価LT-Rアゴニスト抗体である。任意の多特異性抗体構築物では、少なくとも1つの抗原認識部位は、scFvドメイン上に存在することができ、一定の実施形態では、全ての抗原認識部位はscFvドメイン上に存在する。

【0074】

さらに他の実施形態では、本発明の抗体構築物は、以下のポリヌクレオチド配列を含み、表2のポリペプチド配列をコードする。

【0075】

【表2】

表2:

配列	説明
配列番号1	hCBE11/hBHA10二重特異性-1抗体構築物の成熟重鎖のポリヌクレオチド配列
配列番号2	hCBE11/hBHA10二重特異性-1抗体構築物の成熟重鎖のポリペプチド配列
配列番号3	hCBE11/hBHA10二重特異性-1抗体構築物の成熟軽鎖のポリヌクレオチド配列
配列番号4	hCBE11/hBHA10二重特異性-1抗体構築物の成熟軽鎖のポリペプチド配列
配列番号5	成熟hCBE11/hBHA10二重特異性-2抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号6	成熟hCBE11/hBHA10二重特異性-2抗体構築物のポリペプチド配列
配列番号7	hCBE11単一特異性-1抗体構築物の成熟重鎖のポリヌクレオチド配列
配列番号8	hCBE11単一特異性-1抗体構築物の成熟重鎖のポリペプチド配列
配列番号9	成熟hCBE11単一特異性-2抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号10	成熟hCBE11単一特異性-2抗体構築物のポリペプチド配列
配列番号11	成熟CBE11五量体重鎖抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号12	成熟CBE11五量体重鎖抗体構築物のポリペプチド配列
配列番号13	成熟CBE11キメラ軽鎖抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号14	成熟CBE11キメラ軽鎖抗体構築物のポリペプチド配列

配列番号11～14に記載の重鎖および軽鎖を含む五量体CBE11構築物をスクリーニングアッセイで使用して、併用療法を同定することもできる。

【0076】

抗原認識部位または全可変領域は、1つまたは複数の親抗体に由来し得る。親抗体には

、天然に存在する抗体もしくは抗体フラグメント、天然に存在する抗体を適合させた抗体もしくは抗体フラグメント、LT-受容体に特異的であることが公知の抗体もしくは抗体フラグメントの配列を使用してデノボで構築した抗体が含まれ得る。親抗体に由来し得る配列には、重鎖および/または軽鎖可変領域および/またはCDR、フレームワーク領域、またはその他の部分が含まれる。

#### 【0077】

多価多特異性抗体は、2つまたはそれより多くの可変領域を含む重鎖および/または1つまたは複数の可変領域を含む軽鎖を含み得るが、可変領域の少なくとも2つがLT-受容体上の異なるエピトープを認識する。

#### 【0078】

多価多特異性抗体の作製方法は当該分野で公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な產生は、2つの鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づく(Milsteinら, *Nature*, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為な組み合わせにより、これらのハイブリドーマ(クアドローマ(quadrroma))は、10個の異なる抗体分子の潜在的混合物を產生し、そのうちのたった1つが正確な二重特異性構造を有する。通常はアフィニティクロマトグラフィ工程によって行われる正確な分子の精製はむしろ扱いにくく、産物の収率は低い。類似の手順は、WO93/08829号およびTrauneckerら, EMBO J., 10:3655-3659(1991)に開示されている。

#### 【0079】

多価抗LT--R抗体を、親抗LT--R抗体(マウスまたはヒト化BHA10(Browningら, *J. Immunol.* 154:33(1995); Browningら, *J. Exp. Med.* 183:867(1996))および/またはマウスまたはヒト化CBE11(米国特許第6,312,691号)が含まれる)由来の種々の異なる配列を使用した種々の異なる方法で構築することができる。

#### 【0080】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性(抗体-抗原組み合わせ部位)を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。融合は、好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2領域、およびCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを使用する。少なくとも1つの融合物中に存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物および所望ならば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、個別の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。構築で使用される不釣り合いな比の3つのポリペプチド鎖により適切な収率がえられる実施形態では、これにより3つのポリペプチドフラグメントの相互の比率の調整が非常に柔軟になる。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖の同一の比での発現により収率が高くなるかその比が特に有意でない場合、1つの発現ベクター中の2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することが可能である。

#### 【0081】

本発明の別の実施形態は、非ヒト動物(1つまたは複数のヒト免疫グロブリン導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物など)で產生することができるヒ抗LT--R抗体の使用を含む。米国特許第5,569,825号、WO00076310号、WO0058499号、およびWO00037504号(本明細書中で参考として援用される)に記載のように、このような動物をハイブリドーマ產生用の脾臓細胞供給源として使用することができる。

#### 【0082】

いくつかの実施形態では、所望の効果を得るために、本発明の抗体および抗体フラグメントを化学修飾することができる。例えば、以下の参考文献に記載の当該分野で公知の任意のペグ化反応によって、本発明の抗体および抗体フラグメントをペグ化することができる: Focus on Growth Factors 3:4-10(1992); 欧

州特許第0154316号；および欧州特許第0401384号（それぞれその全体が本明細書中で参考として援用される）。好ましくは、反応性ポリエチレンギリコール分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応によってペグ化する。本発明の抗体および抗体フラグメントのペグ化のための好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレンギリコール（PEG）である。本明細書中で使用される、「ポリエチレンギリコール」は、他のタンパク質の誘導で使用されている任意のPEG形態（モノ（C1-C10）アルコキシ-またはアリールオキシ-ポリエチレンギリコールなど）を含むことを意味する。

#### 【0083】

本発明のペグ化抗体および抗体フラグメントの調製方法は、一般に、（a）抗体または抗体フラグメントが1つまたは複数のPEG基に結合するようになる条件下で、抗体または抗体フラグメントをPEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレンギリコールと反応させる工程と、（b）反応生成物を得る工程とを含む。公知のパラメーターおよび所望の効果に基づいて至適な反応条件またはアシル化反応を選択することが当業者に明らかである。

#### 【0084】

一般にペグ化抗体およびペグ化抗体フラグメントを使用して、本明細書中に記載の抗体および抗体フラグメントの投与によって緩和するか調整することができる病態を処置することができる。一般に、ペグ化抗体およびペグ化抗体フラグメントは、非ペグ化抗体および抗体フラグメントと比較して半減期が増大した。ペグ化抗体およびペグ化抗体フラグメントを、単独、共に、または他の薬学的組成物と組み合わせて使用することができる。

#### 【0085】

本発明の他の実施形態では、当該分野で認識されている技術を使用して、抗体またはその抗原結合フラグメントを卵白アルブミンに結合する。

#### 【0086】

本発明の別の実施形態では、潜在的なグリコシル化部位を減少または消失するために抗体またはそのフラグメントを修飾する。このような修飾抗体を、しばしば「無グリコシル化（aglycosylated）」抗体という。抗体またはその抗原結合フラグメントの結合親和性を改良するために、例えば、変異誘発（例えば、部位特異的変異誘発）によって抗体のグリコシル化部位を変化させることができる。「グリコシル化部位」は、糖残基結合のための位置として真核細胞によって認識されるアミノ酸残基をいう。オリゴサッカリドなどの炭水化物が結合するアミノ酸は、典型的には、アスパラギン残基（N結合）、セリン残基（O結合）、およびトレオニン残基（O結合）である。抗体または抗原結合フラグメント内の潜在的なグリコシル化部位を同定するために、抗体の配列を、例えば、Center for Biological Sequence Analysisによって提供されているウェブサイトなどの公的に利用可能なデータベース（N結合グリコシル化部位の予想については、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>を、そしてO結合グリコシル化部位の予想については<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>を参照のこと）の使用によって試験する。抗体のグリコシル化部位をさらに変化させる方法は、米国特許第6,350,861号および同第5,714,350号に記載されている。

#### 【0087】

本発明のさらに別の実施形態では、非修飾抗体と比べて少なくとも1つの定常領域媒介生物エフェクター機能を減少させるために抗体の定常領域を修飾して抗体またはそのフラグメントを変化させることができる。Fc受容体（FcR）への結合が減少するように本発明の抗体を修飾するために、抗体の免疫グロブリン定常領域セグメントを、FcR相互作用に必要な特定の領域で変異させることができる（例えば、Canfield（1991）J.Exp.Med.173:1483およびLund, J.ら（1991）J.of Immunol.147:2657を参照のこと）。抗体のFcR結合能力の減少により、オプソニン作用、食作用、および抗原依存性細胞傷害性などのFcR相互作用に

依存する他のエフェクター機能を減少させることもできる。

#### 【0088】

特定の実施形態では、本発明は、さらに、エフェクター分子（例えば、エフェクター細胞上の補体または受容体）に結合する能力などのエフェクター機能が変化した抗体を特徴とする。特に、本発明のヒト化抗体は、Fc領域中の少なくとも1つのアミノ酸残基が異なる残基または側鎖に置換され、それにより抗体のFcRに結合する能力が減少した、変化した定常領域（例えば、Fc領域）を有する。抗体のFcR結合能力の減少により、オプソニン作用、食作用、および抗原依存性細胞傷害性などのFcR相互作用に依存する他のエフェクター機能を減少させることもできる。1つの実施形態では、修飾ヒト化抗体はIgGクラスであり、ヒト化抗体は、例えば、非修飾ヒト化抗体と比較してエフェクター機能が変化するようにFc領域中で少なくとも1つのアミノ酸残基が置換されている。特定の実施形態では、本発明のヒト化抗体は、免疫原性が低く（例えば、望ましくないエフェクター細胞活性、溶解、または補体結合を誘発しない）、そして/またはより望ましい半減期を有しながらLT-Rまたはそのリガンドに対する特異性を保持するような変化したエフェクター機能を有する。

#### 【0089】

あるいは、本発明は、FcR結合（例えば、Fc-R3結合）を増強するために定常領域を変化させたヒト化抗体を特徴とする。このような抗体は、エフェクター細胞機能の調整（例えば、ADCC活性の増加）、例えば、特に、本発明の腫瘍学適用での使用に有用である。

#### 【0090】

本明細書中で使用される、「抗体依存性細胞媒介細胞傷害性」および「ADCC」は、FcRを発現する非特異的細胞傷害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し、その後標的細胞を溶解させる細胞媒介反応をいう。ADCCを媒介するための一次細胞（NK細胞）は、Fc-RIIIのみを発現するのに対して、単球は、抗体（例えば、この抗体と別の薬剤または抗体との結合体）のFc-RI、Fc-RIII、およびFc-RIPIを発現する。

#### 【0091】

さらに別の実施形態では、相乗様式で腫瘍体積を抑制するために、本発明の抗LT-R抗体を化学療法剤に結合することができる。本発明の抗体に結合することができる化学療法剤の例には、放射性結合体（radioconjugate）（90Y、131I、99mTc、111In、186Rhなど）、腫瘍活性化プロドラッグ（メイタンシノイド、CC-1065アナログ、クリケアミシン（clinical amycin）誘導体、アントラサイクリン、ビンカアルカロイドなど）、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0092】

他のLT--Rアゴニスト（インビトロ腫瘍細胞傷害性アッセイを使用して同定したものが含まれるが、これらに限定されない）は、動物またはヒトに単独で投与するか組み合わせて投与した場合にインビボで類似の抗腫瘍効果を示し得ると考えられる。

#### 【0093】

腫瘍細胞に対するLT--Rアゴニストの細胞傷害効果を、LT--R活性化薬（特に、IFN）の存在によって増強することができる。インターフェロン（好ましくは、IFN）を誘導することができ、且つ腫瘍細胞に対するLT--Rヘテロマー複合体および抗LT--R抗体の細胞傷害効果を強化する任意の薬剤は、本発明のLT--Rアゴニスト群に分類される。例えば、臨床試験によって二本鎖RNA（dsRNA）処理によるインターフェロン誘導が証明されている。したがって、ポリリボグアニル酸/ポリリボシチジル酸（ポリ-rG/rC）およびdsRNAの他の形態は、インターフェロンインデューサーとして有効である（Juraskova et al. Eur. J. Pharmacol., 221, pp. 107-11 (1992)）。

#### 【0094】

上記のように產生された L T - - R アゴニストを、薬学的組成物として使用するために適切な純度に精製することができる。一般に、精製組成物は、組成物中に存在する全ての種のうちの約 85 % 超、存在する全ての種のうちの約 85 %、90 %、95 %、99 %、またはそれより多くを構成する 1 つの種を有する。本発明の種を、組成物が本質的に单一の種からなるように本質的に均一に精製することができる（従来の検出方法では組成物中に汚染種を検出することができない）。当業者は、本明細書中の教示に照らしてタンパク質精製のための標準的な技術を使用して本発明のポリペプチドを精製することができる。当業者に公知の多数の方法（例えば、アミノ末端アミノ酸配列分析、ゲル電気泳動、および質量分析が含まれる）によって、ポリペプチドの純度を決定することができる。

#### 【 0 0 9 5 】

- ( 3 . L T - R アゴニストおよび化学療法剤の相乗的抑制 )
- ( 3 . 1 化学療法剤 )

本発明は、癌を処置するための化学療法剤と組み合わせたリンホトキシン - 受容体アゴニストの使用を提供する。同様に、アゴニストと薬剤との組み合わせによりアゴニストおよび薬剤のみの効果の単純な和による予想よりも高い腫瘍抑制が達成される場合、任意の種々の化学療法剤を、本発明の方法で使用するか試験することができる。化学療法剤を、どのようにして癌細胞内で特定の化学物質に影響を与えるのか、薬物がどの細胞作用またはプロセスを妨害するのか、および薬物がどの細胞周期の特定の時期に影響を与えるのかに基づいていくつかのカテゴリーに分類する。

#### 【 0 0 9 6 】

一定の実施形態では、化学療法剤は D N A 合成を妨害する薬剤である。1 つの実施形態では、D N A 合成を妨害する薬剤はヌクレオシドアナログ化合物である。一定の実施形態では、ヌクレオシドアナログ化合物はゲムシタビンである。別の実施形態では、D N A 合成を妨害する薬剤はアントラサイクリン化合物であり、一定の実施形態では、アントラサイクリン化合物はアドリアマイシンである。

#### 【 0 0 9 7 】

他の実施形態では、化学療法剤はトポイソメラーゼ I インヒビターである。一定の実施形態では、トポイソメラーゼ I インヒビターはカンプトサールである。

#### 【 0 0 9 8 】

他の実施形態における化学療法剤は、アルキル化剤である。アルキル化剤は、D N A に直接作用して癌細胞の増殖を防止する。1 つの薬物クラスとして、これらの薬剤は周期特異的ではない（言い換えれば、これらは細胞周期の全ての時期で作用する）。アルキル化剤は、一般に、慢性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、多発性骨髄腫、ならびに肺、乳房、および卵巣の一定の癌に有効である。アルキル化剤の例には、ブスルファン、シスプラチニン、カルボプラチニン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イフオスファミド、ダカルバジン（D T I C）、メクロレタミン（ナイトロジエンマスター）、およびメルファランが含まれる。1 つの実施形態では、アルキル化剤は白金化合物であり、一定の実施形態では、カルボプラチニンおよびシスプラチニンからなる群から選択することができる。一定の実施形態では、白金化合物はシスプラチニンである。

#### 【 0 0 9 9 】

さらに他の実施形態では、化学療法剤は植物アルカロイドである。1 つの実施形態では、植物アルカロイドはタキサン（例えば、タキソールが含まれる）である。

#### 【 0 1 0 0 】

種々の形態の化学療法剤および / または他の生物活性薬を使用することができる。これらには、腫瘍に移植するか、注射するか、挿入した場合に生物学的に活性である、非電荷分子、分子複合体、塩、エーテル、エステル、アミドなどの形態が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【 0 1 0 1 】

- ( 3 . 2 相乗的化学療法剤のスクリーニング )

本発明は、リンホトキシン - 受容体（L T - - R ）アゴニストを投与した場合に腫

瘍体積抑制に相乗効果を示す化学療法剤のスクリーニング方法を提供する。1つの実施形態では、このような方法は、(a)試験被験体中の第1の腫瘍とLT--Rアゴニストとを接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程と、(b)試験被験体中の比較可能な第2の腫瘍と候補化学療法剤とを接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程と、(c)試験被験体中の比較可能な第3の腫瘍とLT--Rアゴニストおよび候補化学療法剤の両方と接触させて腫瘍体積の抑制を測定する工程とを含み、LT--Rアゴニストおよび候補化学療法剤の両方の存在下での腫瘍体積の抑制がLT--Rアゴニストおよび候補化学療法剤のそれぞれによる腫瘍体積抑制の合計よりも大きい場合、候補化学療法剤は、腫瘍体積抑制に相乗効果を示すと見なされる。

#### 【0102】

本明細書中で使用される「腫瘍の相乗的抑制」は、LT--Rアゴニストのみまたは化学療法剤のみのいずれかの個別の投与によって得られる腫瘍抑制の合計よりも統計的に有意に高いLT--Rアゴニストと化学療法剤との組み合わせの投与によって得られる平均腫瘍抑制をいう。LT--Rアゴニストと化学療法剤との組み合わせ投与によって得られた腫瘍抑制が個別の化合物の予想される値の和よりも「統計的に有意に高い」かどうかを、以下のように決定することができる。上記定義のように、このような相乗的抑制を増強するか、協力性であり得る。

#### 【0103】

一般に、組み合わせ処置によって、処置群における個別の処置によってそれぞれ得られた平均腫瘍体積の減少の合計と比較して処置群で統計的に有意に相乗的に平均腫瘍体積が減少するかどうかの決定によって増強を評価することができる。平均腫瘍体積の減少を、コントロール群と処置群との間の平均腫瘍体積の減少の相違として計算することができる。腫瘍体積の抑制率(影響率(Fa))を、処置群の平均腫瘍体積の減少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって計算することができる。1.000のFaは、腫瘍の完全な抑制を示す。統計的に有意な増強の試験には、各処置群のFaの計算が必要である。組み合わせのいずれかの成分を投与した群由来の平均Faの合計となるように、組み合わせ処置についての予想されるFaの和を取った。例えば、両側1標本t検定を使用して、p値によって計算したところ試験によって得られた結果が偶然のみにどの程度起因する可能性があるかを評価することができる。0.05未満のp値が統計的に有意であると見なされ(すなわち、偶然のみに起因する可能性がない)、約0.05と約0.04との間、約0.04と約0.03との間、約0.03と約0.02との間、約0.02と約0.01との間が含まれるが、これらに限定されない。一定の場合、p値は0.01未満であり得る。したがって、組み合わせにより相乗効果が増強されると見なすためには、組み合わせ処置群のFaは、単一成分での処置群についての予想されるFaの和よりも統計的に有意に高くなればならない。

#### 【0104】

相乗効果が組み合わせ処置に起因するかどうかを、半数影響/組み合わせ指数アイソボログラム法によって評価することができる(Chou, T., and Talalay, P. (1984) Ad. Enzyme Reg., 22:27-55)。この方法では、LT--Rアゴニストのみ、化学療法剤のみ、および固定モル比での2つの組み合わせの半数影響プロット由来のパラメーターに基づいて、異なる用量-効果レベルについての組み合わせ指数(CI)値を計算する。1未満のCI値は相乗効果を示し、約0.85と約0.90との間、約0.70と約0.85との間、約0.30と約0.70との間、約0.10と約0.30との間が含まれるが、これらに限定されない。さらに別の実施形態では、組み合わせ指数は0.10未満である。この分析を、CalcuSyn(用量効果分析のためのWindows(登録商標)ソフトウェア(Biosoft, Cambridge U.K.))を使用して実施することができる。

#### 【0105】

併用療法について相乗効果を示すかどうかを分析するための、当該分野で公知であるか後に開発される任意の方法は、適切な化学療法剤のスクリーニングでの使用が意図される

。

### 【0106】

本発明の1つの実施形態では、癌処置で組み合わせた相乗効果を示すLT--Rアゴニスト/化学療法剤の組み合わせを、当該分野で公知のスクリーニングアッセイ(腫瘍体積の抑制を試験するアッセイが含まれる)によって同定する。腫瘍体積は、一般に、化合物または化合物の組み合わせの抗癌有効性の評価のための代用物として使用される(例えば、Naundorfら(2002)Int. J. Cancer, 100:101; Goelら(2001)Clin. Cancer Res. 7:175; Liaoら(2000)Cancer Res. 60:6805; Prewettら(1999)Cancer Res. 59:5209; Boudreau M.D.ら(2001)Cancer Res. 61:1386を参照のこと)。異種移植片モデルを使用して、腫瘍体積を研究することができる。潜在的アゴニスト/化学療法剤のスクリーニングに使用される異種移植片モデルの例には、WiDrヒト結腸直腸腺癌およびKM-20L2ヒト結腸直腸腺癌が含まれる。抗Erbb2抗体ヘルセプチン(米国特許第6,627,196号を参照のこと)および抗VEGF抗体(米国特許第5,955,311号を参照のこと)のマウスモデルを使用した腫瘍体積の減少または抑制についても記載されている。腫瘍サイズ(例えば、腫瘍体積)の評価ガイドラインは、「NCI-cooperative group-industry relationship guidelines, appendix XVII (Status of the NCI preclinical antitumor agent discovery screen, principles and practice of oncology updates)」に記載されている。

### 【0107】

抗体および/または化学療法化合物の抗癌効果の他の評価方法には、生存率および死亡率の分析ならびに適切な場合の分子マーカー(例えば、前立腺癌のPSA、結腸癌のTPA)の評価が含まれ、このようなマーカーのレベルを化合物の抗癌活性の評価において評価することができる。

### 【0108】

(4.薬学的組成物および送達デバイス)

(4.1 薬学的組成物)

本発明は、上記LT--Rアゴニストおよび化学療法剤を含む薬学的組成物を提供する。1つの態様では、本発明は、1つまたは複数の薬学的に受容可能なキャリア(添加物)および/または希釈剤とともに処方した治療有効量の1つまたは複数の上記化合物を含む薬学的に受容可能な組成物を提供する。別の態様の一定の実施形態では、本発明の化合物自体または薬学的に受容可能なキャリアとの混合物として投与することができ、他の化学療法剤と組み合わせて投与することもできる。したがって、組み合わせ(併用)療法には、第1の投与物の治療効果がその後の投与で完全には消滅しない方法での活性化合物の連続的、同時、および個別、または同時投与が含まれる。

### 【0109】

選択された投与経路に無関係に、適切な水和形態で使用することができる本発明の化合物および/または本発明の薬学的組成物を、当業者に公知の従来の方法によって薬学的に受容可能な投薬形態に処方する。本発明の化合物を単独で投与することができるが、薬学的処方物(組成物)として化合物を投与することが好ましい。本発明の化合物を、ヒトまたは動物の医薬における使用のための任意の従来の方法において他の医薬品との類推によって投与のために処方することができる。

### 【0110】

以下で詳述するように、本発明の薬学的組成物を、固体または液体形態(以下に適合する形態が含まれる)での投与のために特に処方することができる:(1)経口投与(例えば、飲薬(水性または非水性溶液または懸濁液)、錠剤(例えば、口腔内用、舌下用、および全身吸収用)、ボーラス、粉末、顆粒、舌に塗布するためのペースト)、(2)例え

ば、皮下、筋肉内、静脈内、または硬膜外注射による非経口投与（例えば、滅菌溶液もしくは懸濁液または徐放性処方物）、（3）例えば、クリーム、軟膏、徐放性パッチ、または皮膚に適用するスプレーとしての局所塗布、（4）腔内または直腸内（例えば、ペッサーリー、クリーム、またはフォームとして）、（5）舌下、（6）眼内、（7）経皮、または（8）鼻腔内。1つの実施形態では、非経口投与のために薬学的組成物を処方する。別の実施形態では、動脈内注射のために薬学的組成物を処方する。別の実施形態では、全身投与のために薬学的組成物を処方する。

#### 【0111】

他の場合、本発明の化合物は、1つまたは複数の酸性官能基を含むことができるので、薬学的に受容可能な塩基と薬学的に受容可能な塩を形成することができる。

#### 【0112】

湿潤剤、乳化剤、および滑沢剤（ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなど）、ならびに着色料、遊離薬、コーティング剤、甘味料、香味物質、防腐剤、および抗酸化剤を組成物中に含めることもできる。

#### 【0113】

本発明の処方物には、経口、鼻腔内、局所（口腔内および舌下が含まれる）、直腸、腔内、および／または非経口投与に適切な処方物が含まれる。処方物は、単回投薬形態で存在することが都合がよく、薬学分野で周知の任意の方法によって調製することができる。単回投薬形態を得るためにキャリア材料と混合することができる有効成分の量は、処置を受ける宿主、特に投与様式によって変化する。単回投薬形態を得るためにキャリア材料と混合することができる有効成分の量は、一般に、治療効果が得られる化合物量である。

#### 【0114】

本発明の化合物の経口投与のための液体投薬形態には、薬学的に受容可能な乳濁液、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシルが含まれる。有効成分に加えて、液体投薬形態は、当該分野で一般的に使用されている不活性希釈剤（例えば、水または他の溶媒など）、可溶化剤および乳化剤（エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコールなど）、オイル（特に、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステルならびにその混合物を含み得る。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤、および懸濁剤などの佐剤、甘味料、香味物質、着色料、香料、および防腐剤も含み得る。活性化合物に加えて、懸濁液は、懸濁剤（例えば、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、ソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天-寒天、およびトラガカントならびにその混合物）を含み得る。

#### 【0115】

経口投与に適切な本発明の処方物は、それぞれ有効成分として所定量の本発明の化合物を含む、カプセル、カシェ、丸薬、錠剤、ロゼンジ（香りづけをした基剤（通常スクロースおよびアカシアまたはトラガカント）を使用）、粉末、顆粒、または水性もしくは非水性の溶液または懸濁液、水中油滴型もしくは油中水滴型乳濁液、エリキシルもしくはシロップ、香錠（ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤を使用）、および／または洗口剤などの形態であり得る。本発明の化合物を、ボーラス、舐剤、またはペーストとして投与することもできる。

#### 【0116】

経口投与のための本発明の固体投薬形態（カプセル、錠剤、丸薬、ドラジェ、粉末、および顆粒など）では、有効成分を、1つまたは複数の薬学的に受容可能なキャリア（クエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウムなど）および／または任意の以下と混合する：（1）デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸などの充填剤または增量剤、（2）例えば、カルボキシメチルセルロース、アル

ギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および／またはアカシアなどの結合剤、(3)グリセロールなどの保湿剤(4)寒天・寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカのデンプン、アルギン酸、一定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤、(5)パラフィンなどの溶解遅延剤(solution retardin g agent)、(6)第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤、(7)例えば、セチルアルコール、モノステアリン酸グリセロール、および非イオン性界面活性剤などの湿潤剤、(8)カオリンおよびベントナイトクレイなどの吸収剤、(9)タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびその混合物などの滑沢剤、ならびに(10)着色料。カプセル、錠剤、および丸薬の場合、薬学的組成物は緩衝剤も含み得る。ラクトースまたは乳糖などの賦形剤および高分子量のポリエチレングリコールなどを使用して、軟カプセルおよび硬ゼラチンカプセルで類似の型の固体組成物を充填剤として使用することもできる。

#### 【0117】

任意選択的に1つまたは複数の副成分を使用して、圧縮または成形によって錠剤を作製することができる。結合剤(例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、滑沢剤、不活性希釈剤、防腐剤、崩壊剤(例えば、デンブングリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム)、界面活性剤、または分散剤を使用して、圧縮錠剤を調製することができる。適切な装置での不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物の成形によって、成形錠剤を作製することができる。任意選択的に、本発明の薬学的組成物の錠剤または他の固体投薬形態(ドラジエ、カプセル、丸薬、および顆粒など)を、腸溶性コーティングおよび医薬品処方分野で周知の他のコーティングなどのコーティングおよびシェルを使用して得るか調製することができる。例えば、所望の放出プロフィールを得るための種々の比でのヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、リポソーム、および／またはミクロスフィアを使用して有効成分を持続的に放出するか徐放するようにこれらを処方することもできる。急速放出のためにこれらを処方することができる(例えば、凍結乾燥)。例えば、細菌保持フィルターによる濾過または使用直前に滅菌水もしくはいくつかの他の滅菌注射液に溶解することができる滅菌固体組成物の形態での滅菌剤の組み込みによってこれらを滅菌化させることができる。これらの組成物はまた、任意選択的に、乳白剤も含むことができ、有効成分のみを優先的には胃腸管の一定の部分に任意選択的には徐放様式で放出する組成物であり得る。使用することができる包埋組成物の例には、高分子剤およびワックスが含まれる。有効成分はまた、適切な場合、1つまたは複数の上記賦形剤を含むマイクロカプセル化形態であり得る。

#### 【0118】

本発明の化合物の局所投与または経皮投与のための投薬形態には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、および吸入剤が含まれる。活性化合物を、滅菌条件下で必要とされ得る薬学的に受容可能なキャリア、任意の防腐剤、緩衝液、または噴射剤と混合することができる。本発明の活性化合物に加えて、軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルは、動物性脂肪および植物性脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、および酸化亜鉛、またはその混合物などの賦形剤を含み得る。本発明の活性化合物に加えて、粉末およびスプレーは、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含み得る。スプレーは、さらに、フロンガスなどの慣習的噴射剤ならびにブタンおよびプロパンなどの揮発性非置換炭化水素を含み得る。

#### 【0119】

非経口投与に適切な本発明の薬学的組成物は、糖、アルコール、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬、処方物を意図するレシピエントの血液と等張にする溶質、懸濁剤、または増粘剤を含み得る1つまたは複数の薬学的に受容可能な滅菌等張水溶液または非水溶液、分散液、懸濁液、乳濁液、または使用直前に滅菌注射用溶液または分散液に再構成することができ

る滅菌粉末と組み合わせた1つまたは複数の本発明の化合物を含む。これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントを含み得る。本発明の化合物に対する微生物作用の防止を、種々の抗菌薬および抗真菌薬（例えば、パラベン、クロロブタノール、およびソルビン酸フェノールなど）の封入によって確実にことができる。等張化剤（糖および塩化ナトリウムなど）などを組成物に含めることも望ましい。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤を含むことによって注射可能な薬学的形態の吸収を延長させることができる。

#### 【0120】

いくつかの場合、薬物の効果を延長するために、皮下注射または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅延させることができ。水溶性の低い結晶または無定型材料の液体懸濁物の使用によってこれを行うことができる。次いで、薬物の吸収速度は、その溶解速度に依存し、言い換えると、結晶サイズおよび結晶形態に依存し得る。あるいは、非経口投与薬物形態の吸収を、オイル~~ビヒ~~クリル中の薬物の溶解または懸濁によって遅延する。

#### 【0121】

ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中の本発明の化合物のマイクロカプセルマトリクスの形成によって注射可能な蓄積形態を作製する。薬物：ポリマー比および使用した特定のポリマーの性質に依存して、薬物放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）およびポリ（アンヒドライド）が含まれる。蓄積注射処方物を、体内組織に適合可能なりポソームまたはマイクロエマルジョン中の薬物の捕捉によっても調製する。

#### 【0122】

##### （4.2 送達方法およびデバイス）

種々の薬学的送達デバイス（皮下注射用シリンジ、多室シリンジ、ステント、カテーテル、経皮パッチ、顕微針、マイクロアブレーダー、および移植可能な徐放デバイスが含まれ得る）を使用して、本発明の薬学的組成物を投与することもできる。1つの実施形態では、薬学的送達デバイスは、少なくとも有効量のLT--Rアゴニストおよび有効量の化学療法剤を含むかこれらを入れることができる。いくつかの実施形態では、デバイスは、LT--Rアゴニストおよび化学療法剤を同時に送達するか投与することができる。デバイスは、デバイスを使用した投与前にアゴニストと化学療法剤を混合する能力を有し得る。さらに他の実施形態では、デバイスは、アゴニストおよび化学療法剤を連続的に投与することができる。

#### 【0123】

1つの潜在的な薬学的送達デバイスは、注射前に2つの化合物を混合するかこれらを連続的に送達することができる多室シリンジである。典型的な2室シリンジおよびこのような前充填シリンジの自動化製造プロセスは、Neue Verpackung, No. 3, 1988, p. 50-52; Drugs Made in Germany, Vol. 30, Pag. 136-140 (1987); Pharm. Ind. 46, Nr. 10 (1984) p. 1045--1048およびPharm. Ind. 46, Nr. 3 (1984) p. 317-318に開示されている。シリンジ型アンプルは、ニードルを取りつけるためのボトル型の前部開口部、前部チャンバー中の凍結乾燥粉末を後部チャンバー中の再構成液と混合するための2つのピストンおよび外部型バイパスを具備する2室デバイスである。記載のプロセスは、主に、シリンジ外筒の洗浄およびシリコン処理工程、キャリアトレイ中への複数の外筒の挿入工程、滅菌工程、外筒後部を介した中央のピストンの導入工程、トレイを逆さまにする工程、前部開口部による粉体溶液の導入工程、乾燥粉末への凍結乾燥工程、前部開口部を閉じて凍結乾燥チャンバーに送達する工程、トレイを回転させる工程、外筒後部による再構成液体の導入工程、後部ピストンの挿入、トレイからの生成物の取り出し工程、最後の調節およびパッケージング工程を含む。種々の成分を予め充填したアンプルを、シリンジと共に使用するために製造することができる。

#### 【0124】

別の実施形態では、多室シリンジは、Lyophiljectシステム（Vetter Ph

arma Turm, Yardley, PA) である。Lyophilect により、使用者は薬物を迅速な再構成および注射のための希釈剤をパッケージングしたシリンジ中で直接凍結乾燥させることができる。これは、特許第4,874,381号および同第5,080,649号に記載されている。

#### 【0125】

他の実施形態では、2つの個別のシリンジ、カテーテル、顕微針、または注射することができる他のデバイスを使用して化合物を投与する。

#### 【0126】

罹患組織中、その周囲、もしくはそれと連結して配置されたかまたは血流中に配置されたミクロスフィア、リポソーム、他の微粒子送達系、または徐放処方物を使用して、本発明の薬学的組成物を投与することもできる。徐放キャリアの適切な例には、座剤またはマイクロカプセルなどの成形品の形態の半透性ポリマーマトリクスが含まれる。移植可能かまたはマイクロカプセル状の徐放マトリクスには、ポリラクチド(米国特許第3,773,319号；歐州特許第58,481号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸とのコポリマー(Sidmanら, Biopolymers, 22, pp. 547-56(1985))；ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはエチレン酢酸ビニル(Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15, pp. 167-277(1981)；Langer, Chem. Tech., 12, pp. 98-105(1982))が含まれる。取り組まれる特定の臨床症状の処置に有効な用量で本発明の組成物を投与する。例えば、患者の病態および体重、所望の処置範囲、および患者の処置耐性を考慮した所与の適用のための好ましい薬学的処方物および治療に有効な投与計画の決定は、十分に当業者の範囲内である。

#### 【0127】

経皮パッチは、本発明の化合物の身体への送達の調節にさらなる利点を有する。適切な媒質への化合物の溶解または分散によって、このような投薬形態を作製することができる。吸収増強剤を使用して、皮膚を介した化合物の流動を増加させることもできる。このような流動の速度を、速度調節膜を設けるかポリマーマトリクスまたはゲルへ化合物を分散することによって調節することができる。

#### 【0128】

##### (5. 治療方法)

本発明は、さらに、任意選択的に上記送達デバイスを使用して被験体に有効量の本発明の薬学的組成物を投与する工程を含む癌処置の新規の治療方法を提供する。

#### 【0129】

本発明の方法を使用して、任意の癌を処置することができる(充実性腫瘍の処置が含まれるがこれに限定されない)。本発明の化合物によって処置することができる充実性腫瘍の例には、乳癌、精巣癌、肺癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、肺臓癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、結腸癌、前立腺癌、胃癌、皮膚癌、胃癌、食道癌、および膀胱癌が含まれるが、これらに限定されない。一定の実施形態では、方法は、有効量の本発明の薬学的組成物の被験体への非経口投与を含む。1つの実施形態では、方法は、本発明の組成物を被験体に動脈内投与する工程を含む。他の実施形態では、方法は、有効量の本発明の組成物を被験体中の腫瘍動脈血供給に直接投与する工程を含む。1つの実施形態では、方法は、カテーテルを使用して有効量の本発明の組成物を癌性腫瘍の動脈血供給へ直接投与する工程を含む。カテーテルを使用して本発明の組成物を投与する実施形態では、蛍光顕微鏡法またはカテーテルの挿入を観察および/もしくは誘導することができる当該分野で公知の他の方法によってカテーテルの挿入を誘導または観察することができる。別の実施形態では、方法は、化学塞栓を含む。例えば、化学塞栓法は、オイル基剤(例えば、ポリビニルアルコールを含むエチオドール)と混合した樹脂様材料および1つまたは複数の化学療法剤から構成される組成物を使用して癌性腫瘍を供給する血管を遮断する工程を含み得る。さらに他の実施形態では、方法は、本発明の組成物を被験体に全身投与する工程を含む。

#### 【0130】

一般に、本発明の薬学的組成物を使用した化学塞栓または直接動脈内もしくは静脈内注射療法を、典型的には、部位に関係なく類似の様式で行う。簡単に述べれば、X線を照射する動脈または静脈（塞栓または注射すべき部位に依存する）に挿入されたカテーテルを介した放射線不透過性造影剤の注射によって、塞栓すべき領域の血管造影法（血管の道筋）または一定の実施形態でより詳細には動脈造影法を最初に行うことができる。経皮的または手術によってカテーテルを挿入することができる。次いで、流れが停止するまでカテーテルによって本発明の薬学的組成物を逆流することによって、血管を塞栓することができる。血管造影の繰り返しによって閉塞を確認することができる。次いで、直接注射を使用する実施形態では、血管に所望の用量の本発明の薬学的組成物を注入する。

#### 【0131】

塞栓療法により、一般に、処置すべき腫瘍または血管塊の隙間の全体にインヒビターを含む組成物が分布する。動脈管腔を詰まらせる物理的な大量の閉塞性粒子により、血液供給が閉塞する。この効果に加えて、抗血管因子の存在により、腫瘍または血管塊に供給される新規の血管形成が防止され、血液供給遮断の喪失効果が増強される。直接動脈内または静脈内投与により、一般に、同様に処置すべき腫瘍または血管塊の隙間全体にインヒビターを含む組成物が分布する。しかし、血液供給は、一般に、この方法を使用して閉塞されると予想されない。

#### 【0132】

本発明の1つの態様内で、塞栓または直接動脈内もしくは静脈内注射療法を使用して、肝臓または他の組織の原発性または二次腫瘍を処置することができる。簡単に述べれば、大腿動脈または上腕動脈を介してカテーテルを挿入し、X線透視ガイダンス下での動脈系を介した肝動脈のステアリングによって肝動脈に進める。腫瘍に供給する血管を完全に遮断する必要がある限りカテーテルを肝動脈樹（hepatic arterial tree）に進める一方で、できるだけ多数の正常な構造に供給する動脈枝を損傷させない。理想的には、これは、肝動脈の部分的枝であるが、胃十二指腸動脈の起源から離れた全肝動脈または複数の個別の動脈でさえも腫瘍範囲およびその個別の血液供給に依存して遮断される必要があるということもあり得る。一旦カテーテルが望ましく位置づけられると、遮断すべき動脈の流れが停止するまで（観察から5分後でも好ましい）の動脈カテーテルを介した組成物の注射（上記）によって動脈を塞栓する。カテーテルを介した放射線不透過性造影剤の注入および透視検査またはX線フィルムによって予め造影剤を充填した血管にもはや注入されないことの証明によって動脈閉塞を確認することができる。直接注射を使用する実施形態では、動脈カテーテルによる所望の用量の組成物（上記）の注射によって動脈に注入する。閉塞すべき動脈へのそれぞれの供給を使用して、同一の手順を繰り返すことができる。

#### 【0133】

ほとんどの実施形態では、本発明の薬学的組成物には、予防または治療上の処置の一部として治療有効量の組み込まれた治療薬または他の材料を患者に送達するのに十分な量で送達される物質が組み込まれる。粒子中の所望の濃度の活性化合物は、薬物の吸収速度、不活性速度、および排出速度、ならびに化合物の送達速度に依存する。投薬量は緩和すべき病態の重症度によっても変化し得ることに留意すべきである。任意の特定の被験体のために、個体のニーズおよび組成物を投与する者または投与を監督する者の専門的判断に従って特定の投薬計画を経時的に調整すべきであることをさらに理解すべきである。典型的には、当業者に公知の技術を使用して、投与を決定する。選択された投薬レベルは、種々の要因（使用した本発明の特定の化合物、そのエステル、塩、またはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排出または代謝速度、処置の持続時間、使用した特定の化合物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および／または材料、処置をうける患者の年齢、性別、体重、病態、一般的な健康状態、および病歴、ならびに医学分野で周知の同様の要因が含まれる）に依存する。

#### 【0134】

投薬量は、患者の体重1kgあたりの組成物の量に基づき得る。他の量は当業者に公知

であり、容易に決定される。あるいは、本発明の投薬量を、組成物の血漿濃度を参照して決定することができる。例えば、最大血漿濃度 (C<sub>max</sub>) および 0 から無限大までの血漿濃度 - 時間曲線下面積 (AUC (0 ~ 4)) を使用することができる。本発明の投薬量には、C<sub>max</sub> および AUC (0 ~ 4) についての上記値が得られる投薬量およびこれらのパラメーターについての値よりも高いか低くなる他の投薬量が含まれる。

#### 【0135】

当該分野の通常の技術を有する医師および獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師および獣医師は、薬学的組成物中で使用される本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルから開始し、所望の効果が得られるまで投薬量を段階的に増加させることができる。

#### 【0136】

一般に、本発明の化合物の適切な 1 日量は、治療効果を得るために有効な最も低い用量である化合物量である。このような有効用量は、一般に、上記因子に依存する。

#### 【0137】

所与の患者を最も有効に処置する任意の特定の化合物の正確な投与時間および量は、特定の化合物の活性、薬物動態学、および生物学的利用能、患者の生理学的条件（年齢、性別、疾患の型および悪性度、全身的な身体状態、薬物の所与の投薬量および型に対する反応性が含まれる）、ならびに投与経路などに依存する。本明細書中に記載のガイドラインを使用して被験体のモニタリングならびに投薬量および／またはタイミングの調整からなる日常的実験しか必要とせずに、処置（例えば、投与の最適な時間および／または量の決定）を至適化することができる。

#### 【0138】

被験体が処置を受ける間、24時間の間の所定の時間に1つまたは複数の関連指標の測定によって患者の健康をモニタリングすることができる。処置（投与および処方の補足、量、時間が含まれる）を、このようなモニタリングの結果にしたがって至適化することができる。同一のパラメーターの測定によって、改善範囲を決定するために患者を定期的に再評価することができ、典型的には、治療開始から4週間後に最初の再評価を行い、その後治療中の4～8週間毎に再評価し、その後3ヶ月ごとに再評価する。治療を数カ月または数年継続することができ、ヒトの治療では最低1ヶ月が典型的な期間である。薬剤の投与量およびおそらく投与時間を、これらの再評価に基づいて調整することができる。

#### 【0139】

化合物の至適用量よりも少ない投薬量で処置を開始することができる。その後、至適な治療効果が得られるまで少しづつ増加させながら投薬量を増加させることができる。

#### 【0140】

これを知ることにより、どの薬物が相互に十分に作用する可能性が高いかについて、そして1つを超える薬物を使用する場合には各薬物を（どんな順序でおよびどんな頻度で）いつ投与するべきかを、正確に計画することについての癌専門医の決定が補助される。

#### 【0141】

いくつかの本発明の化合物または他の化学療法剤の組合せ使用により、異なる成分の効果の開始および持続時間が相補的 (complementary) であり得るので、任意の各成分に必要な投薬量を減少させることができる。このような併用療法では、異なる活性成分を同時または個別に送達し、且つ1日のうちで同時または異なる時間で送達することができる。本発明の化合物の毒性および治療効果を、例えば、LD<sub>50</sub> および ED<sub>50</sub> の決定のための細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。治療指数の高い組成物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を使用することができるが、副作用を減少させるために所望の部位に化合物をターゲティングする送達系をデザインするように配慮すべきである。

#### 【0142】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒトで使用するための投薬範囲の

処方で使用することができる。任意の補助物質 (s u p p l e m e n t) または補助物質中の任意の成分の投薬量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性を示さない E D 5 0 値を含む循環濃度範囲内である。投薬量は、使用した投薬形態および使用した投与経路に依存してこの範囲内で変化させることができる。本発明の薬剤のために、治療有効用量を最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養で決定したところ I C 5 0 (すなわち、症状を最大で半分阻害する試験化合物の濃度) を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルの用量を処方することができる。このような情報を使用して、ヒトの有用な用量をより正確に決定することができる。例えば、高速液体クロマトグラフィによって血漿レベルを測定することができる。

#### 【 0 1 4 3 】

##### ( 6 . キット )

本発明は、種々の癌治療のためのキットを提供する。例えば、キットは、1つまたは複数の上記薬学的組成物および任意選択的にその使用説明書を含み得る。さらに他の実施形態では、本発明は、1つまたは複数の薬学的組成物およびこのような組成物の投与のための1つまたは複数のデバイスを含むキットを提供する。例えば、本発明のキットは、薬学的組成物および癌性腫瘍への組成物の直接動脈内注射のためのカテーテルを含み得る。他の実施形態では、本発明のキットは、任意選択的に医薬品として処方したか凍結乾燥した送達デバイスと共に使用するための L T - R アゴニストおよび化学療法剤を予め充填したアンプルを含み得る。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 4 4 】

##### ( 実施例 )

本発明を、以下の実施例によってさらに例示するが、決して本発明を制限すると解釈すべきではない。

#### 【 0 1 4 5 】

##### ( 材料と方法 )

##### ( W i D r マウスマodel )

h u C B E 1 1 と組み合わせた化学療法剤の効果を研究するために、W i D r 異種移植片モデルを使用した。C B E 1 1 は、重症複合型免疫不全症 (S C I D) マウスで異種移植片として成長したW i D r 腫瘍に対して抗腫瘍活性を示すことが示されている (B r o w n i n g ら (1996) J . E x p . M e d . 1 8 3 : 8 6 7 )。治療薬 (すなわち、L T - R アゴニストおよび化学療法剤) を、W i D r 腫瘍細胞を移植した胸腺欠損ヌードマウスに投与した。抗腫瘍活性 (併用療法の任意の協力効果または効果の増強が含まれる) を、W i D r 異種移植片ヒト結腸直腸腫瘍成長にしたがって研究し、ここで、確立された予備形成腫瘍塊に対して処置を開始した。

#### 【 0 1 4 6 】

W i D r 細胞は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (M a n a s s a s , V A ) から入手した。細胞を、抗生物質を含まない 2 m M L - グルタミンならびに 1 . 5 g / L 重炭酸ナトリウム、0 . 1 m M 非必須アミノ酸、および 1 m M ピルビン酸ナトリウムを含むように調整したイーグル平衡塩類溶液 (B S S) を含み、10 % ウシ胎児血清 (F B S) を加えた 90 % イーグル最少基本培地にてインビトロで成長させた (5 % C O 2 )。マウスに移植した腫瘍ホモジネート調製物のアリコートに対して細菌培養を行い、移植から 24 時間後および 48 時間後の両方で全ての培養物が細菌汚染について陰性であることを確認した。

#### 【 0 1 4 7 】

0 日目に、血清を含まない 2 0 0 μ L R P M I 1 6 4 0 中の 2 × 1 0 6 個の W i D r 細胞の接種物を右側腹部に皮下移植した。3 日目から腫瘍重量および体重の測定値を1週間に2回記録し、4日目にカンプトサールを含む研究についても記録した。腫瘍の長さが約 5 m m および幅が 5 m m と測定された場合、マウスを処置群およびコントロール群に無作為に分けた。0日目から開始して、1週間に2回体重を記録した。

## 【0148】

(KM-20L2マウスモデル)

h u C B E 1 1 と組み合わせた化学療法剤の効果を研究するために、KM-20L2異種移植片モデルを使用した。治療薬（すなわち、L T Rアゴニストおよび化学療法剤）を、W i D r 腫瘍細胞を移植した胸腺欠損ヌードマウスに投与した。抗腫瘍活性（併用療法の任意の協力効果または効果の増強が含まれる）を、W i D r 異種移植片ヒト結腸直腸腫瘍成長にしたがって研究し、ここで、確立された予備形成腫瘍塊に対して処置を開始した。

## 【0149】

KM-20L2を、N C I tumor repository から入手した。細胞を、抗生素質を含まない10%ウシ胎児血清（F B S）を含む90%R P M I - 1 6 4 0 で成長させた。マウスに移植した腫瘍細胞ホモジネート調製物のアリコートに対して細菌培養を行い、移植から24時間後および48時間後の両方で全ての培養物が細菌汚染について陰性であることを確認した。

## 【0150】

0日目に、無血清培地中の $2 \times 10^6$ 個または $3 \times 10^6$ 個のKM-20L2細胞接種物をマウスの右側腹部に皮下移植した。腫瘍サイズを定期的に記録した。腫瘍の長さが約5mmおよび幅が5mm（65mg）と測定された場合、マウスを処置群およびコントロール群に無作為に分けた。

## 【0151】

(腫瘍の測定)

ノギスを使用して腫瘍を測定した。腫瘍サイズの測定値を、研究終了まで研究にしたがって定期的に記録した。長橋円の体積を計算するための以下の式を使用して、二次元腫瘍測定値から腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）を評価した：腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）=（長さ×幅<sup>2</sup> [L × W<sup>2</sup>]）÷ 2。単位密度を仮定し、体積を重量に変換した（すなわち、1mm<sup>3</sup> = 1mg）。腫瘍成長抑制を、T / C率（式中、Tは処置群の平均腫瘍重量であり、Cはコントロール群の平均腫瘍重量である）として評価した。この研究型における42%またはそれ未満のT / C率を、National Cancer Institute（U S A）による有意な活性の指標と見なす。その結果、動物を屠殺した。

## 【0152】

(統計分析)

標準的な統計学的方法にしたがって、腫瘍重量測定値の統計分析を行った。全ての評価における全ての用量群についての体重および腫瘍重量の平均、標準偏差（S D）、および平均の標準誤差（S E M）を決定した。各処置群とビヒクルコントロール群との間および各組み合わせ処置群と各h u C B E 1 1群との間に任意の統計的有意差が存在するかどうかを決定するために、各評価（各研究の終了時が含まれる）における平均腫瘍重量に対してスチューデントt検定を行った。

## 【0153】

h u C B E 1 1 および化学療法剤を使用した組み合わせ処置時に抗腫瘍活性の協力作用または増強が起こるかどうかを決定するために、分析を行った。化学療法剤のみを使用したW i D r 腫瘍を保有するマウスの処置によって用量応答抗腫瘍効果が得られた場合、h u C B E 1 1 と化学療法剤との組み合わせの協力作用を、組み合わせ指数の計算によって正式に評価することができる（C h o u およびT a l a l a y（1984）A d v . E n z . R e g u . 2 2 : 2 7）。さらに、いくつかの組み合わせ処置による増強を、組み合わせ処置によって各処置によって得られる有効性の合計と比較して統計的に有意な相乗効果が得られるかどうかの決定によって評価した。

## 【0154】

各処置群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって抗腫瘍効果を決定した。コントロール群と処置群との間の平均腫瘍体積の相違として平均腫瘍体積の減少を計算した。腫瘍体積の抑制率（すなわち、影響率（F a））を、処置群の平均腫瘍体積の減

少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって計算した。1.000のFaは、腫瘍の完全な抑制を示した。その結果、さらなる統計分析を行った。

【0155】

(協力性分析)

C I によって示した協力作用または拮抗作用の程度の全解釈(記号で示す)を、以下の表3に記載する。

【0156】

【表3】

表3: 協力作用または拮抗作用を説明するための記号の解釈

組み合わせ指数の範囲	記号	解釈
<0.1	+++++	非常に強い協力作用
0.1-0.3	++++	強い協力作用
0.3-0.7	+++	協力作用
0.7-0.85	++	中程度の協力作用
0.85-0.90	+	わずかな協力作用
0.90-1.10	±	ほぼ累加的
1.10-1.20	-	わずかな拮抗作用
1.20-1.45	--	中程度の拮抗作用
1.45-3.3	---	拮抗作用
3.3-10	----	強い拮抗作用
>10	-----	非常に強い拮抗作用

(実施例1:アルキル化化学療法剤と組み合わせたLT-Rアゴニストの抗腫瘍効果)

h u C B E 1 1のシスプラチントとの組み合わせ抗腫瘍効果。h u C B E 1 1と組み合わせたアルキル化化学療法剤(例えば、シスプラチント)の投与により相乗的抗腫瘍活性(例えば、協力活性または増強活性)が得られるかどうかを決定するために、W i D r異種移植片モデルを使用して、h u C B E 1 1と組み合わせてシスプラチントを投与した。

【0157】

シスプラチントおよびh u C B E 1 1の抗腫瘍効果の研究のために、適切なシスプラチントおよびh u C B E 1 1の用量を決定するための投薬範囲の研究を行った。投与研究により、それぞれの腫瘍成長抑制に対する各薬剤の抗腫瘍効果も試験した。確立されたW i D r腫瘍を保有する胸腺欠損ヌードマウスを、生理食塩水(コントロール)、h u C B E 1 1(50 μgまたは500 μg)、シスプラチント(0.25 mg/kg ~ 2 mg/kgの範囲の用量)のいずれかで処置した(生理食塩水コントロールはn=30/用量、実験群はn=10/用量)。3日目に腫瘍サイズを測定し、その後悪性度分類日まで定期的に測定した。

【0158】

50日目の2 mg/kg、1 mg/kg、および0.25 mg/kgのシスプラチント用量群の腫瘍成長は、生理食塩水コントロール群と有意に異ならなかった。N C I活性基準(T/C率が42%またはそれ未満)に基づいて、2 mg/kg ~ 0.25 mg/kgのシスプラチントはW i D rモデルで不活性であると判断された。50日目に、0.5 mg/kg(P<0.05)の用量のみのシスプラチントにより、ヌードマウスにおいてW i D rヒト結腸直腸腫瘍成長が有意に抑制された。並行研究では、44日目に、500 μg(P<0.001)および50 μg(P<0.01)の用量のh u C B E 1 1により、腫瘍成長が有意に抑制されると判断された。シスプラチントのみでの処置では、用量反応抗腫瘍効果は得られなかつたので、シスプラチントとh u C B E 1 1との組み合わせの協力作用を評価することができなかつた。

## 【0159】

シスプラチニとhuCBE11との組み合わせ処置により腫瘍成長の抑制が有意に増加するかどうかを決定するために、上記の確立された腫瘍を有する確立されたWiDr腫瘍細胞を保有する胸腺欠損ヌードマウスに対して組み合わせ研究を行った。有効性、協力作用、および増強を決定するために、本研究により、種々の組み合わせのhuCBE11(50μgまたは500μg)およびシスプラチニ(1mg/kgおよび2mg/kg)の効果を比較した。シスプラチニ(1および2mg/kg)およびhuCBE11(50および500μg)の4つの異なる用量の組み合わせを評価した。

## 【0160】

組み合わせ研究(表4~6および図4および6に示す)の結果は、シスプラチニと組み合わせたhuCBE11は処置マウスの腫瘍体積を有意に減少させることを証明する。全ての腫瘍データを44日目に得た。各処置群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって抗腫瘍効果を決定した。1.000のFaは、腫瘍の完全な抑制を示す。表4は、huCBE11およびシスプラチニの個別処置および組み合わせ処置についての用量-結果の関係を示す。

## 【0161】

## 【表4】

表4: 用量-効果の関係

処置	用量	単位	同時処置	用量	単位	腫瘍体積	体積の減少	Fa
コントロール						1418.6	0.0	0.000
シスプラチニ	1	mg/kg				1300.4	118.2	0.083
シスプラチニ	2	mg/kg				1340.1	78.5	0.055
huCBE11	50	μg				869.7	548.9	0.387
huCBE11	500	μg				614.7	803.9	0.567
huCBE11	50	μg	シスプラチニ	1	mg/kg	490.4	928.2	0.654
huCBE11	50	μg	シスプラチニ	2	mg/kg	354.5	1064.1	0.750
huCBE11	500	μg	シスプラチニ	1	mg/kg	410.9	1007.7	0.710
huCBE11	500	μg	シスプラチニ	2	mg/kg	275.0	1143.6	0.806

500μgのhuCBE11と2mg/kgのシスプラチニまたは1mg/kgのシスプラチニとの組み合わせにより、500μgのhuCBE11のみと比較して統計的に有意に(それぞれP<0.01およびP<0.05)低いWiDr腫瘍重量が得られた。50μgのhuCBE11と2mg/kgのシスプラチニまたは1mg/kgのシスプラチニとの組み合わせによっても、50μgのhuCBE11のみと比較して統計的に有意に(それぞれP<0.001およびP<0.01)低いWiDr腫瘍重量が得られた。44日目では、huCBE11 500μgとシスプラチニ2mg/kgとの組み合わせ(P<0.01)(図1)またはhuCBE11 500μgとシスプラチニ1mg/kgとの組み合わせ(P<0.05)での処置後の腫瘍重量はhuCBE11 500μgのみよりも有意に低かった。さらに、huCBE11 50μgとシスプラチニ2mg/kgとの組み合わせ群(P<0.001)およびhuCBE11 50μgとシスプラチニ1mg/kgとの組み合わせ群(P<0.01)での処置後の平均腫瘍重量はhuCBE11 50μgのみの群よりも有意に低かった。

## 【0162】

huCBE11とシスプラチニとの組み合わせは、NCI活性基準(T/C率が42%

またはそれ未満)に基づいて、試験した全ての用量の組み合わせで、WiDr モデルで活性であると判断された。 huCBE11 500 µg およびシスプラチン 2 mg / kg において、24日目(38.4%)から44日目(19.4%)までのT/C率は42%未満であった。 huCBE11 500 µg およびシスプラチン 1 mg / kg において、30日目(37.3%)から44日目(29.0%)までのT/C率は42%未満であった(図2)。 huCBE11 50 µg およびシスプラチン 2 mg / kg において、27日目(40.5%)から44日目(25.0%)までのT/C率は42%未満であった(図3)。 huCBE11 50 µg およびシスプラチン 1 mg / kg において、34日目(40.0%)から44日目(34.6%)までのT/C率は42%未満であった。

#### 【0163】

これらの研究から得た腫瘍重量データを使用して、huCBE11とシスプラチンとの組み合わせにより増強させるかどうかを決定するための統計学的比較を行った。44日目の個別の腫瘍体積(表5)を使用して、各動物の腫瘍体積の抑制率(すなわち、Fa)を計算した(表6)。統計的に有意な増強についての試験には、各動物のFaの計算が必要であった。各腫瘍体積(表5)を使用して、各動物の腫瘍体積の抑制率(Fa)を計算した(表6)。表4に示すように、(コントロール群の平均腫瘍体積 - 個別の動物の腫瘍体積) ÷ コントロール群の平均腫瘍体積としてFaを計算した。組み合わせ処置についての予想される累加Faを、組み合わせのいずれかの成分(huCBE11またはシスプラチン)を投与した群由来の平均Faの合計であると解釈する。組み合わせ処置の実際の効果と処置が単に累加であると予想される効果との間の相違も計算した(表6)。両側1標本t検定を使用して、組み合わせ処置により予想される累加値と統計的に有意に異なる平均Faが得られるかどうかを決定した(表6)。本研究で使用したhuCBE11およびシスプラチンを使用した全ての組み合わせ処置計画により、予想される累加抗腫瘍効果と比較した場合に抗腫瘍効果が統計的に有意に増強された。

#### 【0164】

## 【表5】

表 5: 4日目の個々の腫瘍体積

コントロール	シスプラチン 1 mg/kg	シスプラチン 2 mg/kg	huCBE11 50 µg	huCBE11 500 µg	huCBE11 50 µg + シスプラチン 1 mg/kg	huCBE11 50 µg + シスプラチン 2 mg/kg	huCBE11 500 µg + シスプラチン 1 mg/kg	huCBE11 500 µg + シスプラチン 2 mg/kg
1503.6	1280.0	970.2	842.6	726.2	445.5	305.8	460.1	292.7
1123.2	1038.3	1204.2	686.0	645.6	638.0	632.2	388.2	159.9
983.3	2096.4	1301.9	487.5	99.1	548.5	420.8	285.4	141.6
1052.2	930.1	1505.3	802.7	944.8	359.8	286.8	314.2	271.7
1228.2	1383.3	1469.5	624.9	534.1	398.7	407.0	359.3	690.3
1413.9	1440.7	541.4	712.0	333.2	437.1	247.0	418.9	691.6
1649.3	1220.3	1829.8	1216.2	469.4	830.0	463.2	388.0	175.8
703.0	1274.3	2160.2	580.7	655.8	639.3	318.3	427.3	28.1
1626.8	1103.9	1076.4	1866.3	1014.0	480.0	250.4	424.8	145.4
1285.5	1236.7	1342.0	878.7	725.3	126.8	213.5	642.5	152.6
1215.6								
2294.6								
2271.9								
974.4								
2039.3								
1713.9								
741.1								
1467.8								
1757.7								
1327.3								
平均:	1418.6	1300.4	1340.1	869.7	614.7	490.4	354.5	410.9
								275.0

## 【0 1 6 5】

【表6】

表 6: 腫瘍体積の個々の阻害率

シスプラチン 1 mg/kg	シスプラチン 2 mg/kg	huCBE11 50 µg	huCBE11 500 µg	huCBE11 50 µg + シスプラチン 1 mg/kg	huCBE11 50 µg + シスプラチン 2 mg/kg	huCBE11 500 µg + シスプラチン 1 mg/kg	huCBE11 500 µg + シスプラチン 2 mg/kg
0.098	0.316	0.406	0.488	0.686	0.784	0.676	0.794
0.268	0.151	0.516	0.545	0.550	0.554	0.726	0.887
-0.478	0.082	0.656	0.930	0.613	0.703	0.799	0.900
0.344	-0.061	0.434	0.334	0.746	0.798	0.778	0.808
0.025	-0.036	0.559	0.624	0.719	0.713	0.747	0.513
-0.016	0.618	0.498	0.765	0.692	0.826	0.705	0.512
0.140	-0.290	0.143	0.669	0.415	0.673	0.726	0.876
0.102	-0.523	0.591	0.538	0.549	0.776	0.699	0.980
0.222	0.241	-0.316	0.285	0.662	0.824	0.701	0.898
0.128	0.054	0.381	0.489	0.911	0.849	0.547	0.892
平均:	0.083	0.055	0.387	0.567	0.654	0.750	0.806
累加 :					0.470	0.442	0.650
相違 :					0.184	0.308	0.060
両側一標本 t 検定							
T値 :				4.345	10.806	2.784	3.572
DF:				9	9	9	9
P値 :				0.0019	<0.0001	0.0213	0.0060

h u C B E 1 1 / シスプラチン研究で使用した全ての組み合わせにより、腫瘍体積の統計的に有意な相乗的抑制が得られた（表6）。50 µg または 500 µg の用量の h u C B E 1 1 と組み合わせた場合、1 mg / kg および 2 mg / kg の用量のシスプラチンにより、統計的に有意な相乗効果が得られた。これらの組み合わせにより、h u C B E 1 1 の抗腫瘍効果が有意に増強された。要するに、W i D r ヒト結腸直腸腺癌を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスにおける L T 受容体活性化 m A b である h u C B E 1 1 と化学療法剤であるシスプラチンとの組み合わせ処置により、h u C B E 1 1 投与のみおよびシスプラチン投与のみと比較して有意に改善された結果を示した（すなわち、増強された）。

## 【0166】

（実施例2：アントラサイクリンアナログである化学療法剤と組み合わせた L T R アゴニストの抗腫瘍効果）

h u C B E 1 1 とアドリアマイシンとの組み合わせの抗腫瘍効果。h u C B E 1 1 と組み合わせたアントラサイクリンアナログ化学療法剤（例えば、アドリアマイシン）の投与により相乗的抗腫瘍活性（例えば、協力作用または増強）が得られるかどうかを決定するために、W i D r 異種移植片腫瘍モデルを使用して、アドリアマイシンを h u C B E 1 1 と組み合わせて投与した。

## 【0167】

アドリアマイシンと h u C B E 1 1 との組み合わせ抗腫瘍効果の研究のためのアドリアマイシンおよび h u C B E 1 1 の適切な用量を決定するためおよび各薬物のみの個別の効果を決定するために、用量範囲決定研究 (d o s e r a n g i n g s t u d y) を最初に行つた。1 mg / kg から 6 mg / kg までの漸増用量のアドリアマイシンを、W i D r 腫瘍細胞を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスへの腹腔内注射によって投与した（0日目）。全ての試験用量で、アドリアマイシンは、N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e ( N C I ) の活性基準（42% またはそれ未満）の試験 / コントロール率

(T/C率)に基づいて、WiDrモデルにおいて化学療法剤として不活性であると判断された。42日目(研究の終了日)に、アドリアマイシン群とビヒクルコントロール群との間に有意差は認められなかった。個別の研究では、35日目(評価日)で、6mg/kgまたは4mg/kgのいずれかのアドリアマイシンでも腫瘍成長に対する有意な阻害を示さなかった。したがって、アドリアマイシンはWiDr腫瘍を有意に抑制せず、アドリアマイシン群と生理食塩水群との間の有意差は存在しなかった。

#### 【0168】

並行研究では、500μg、100μg、および50μgの用量のHuCBE11は、42日目で腫瘍成長を抑制することが見出され、NCI活性基準に基づいて、WiDrモデルにおいて化学療法剤として活性であると判断された。WiDr腫瘍重量は、研究終了時(42日目)にビヒクルコントロール群と比較して全てのHuCBE11抗体試験群で統計的に有意に低かった。T/C率は、HuCBE11 500μgの群および100μgの群において32~42日目に42%未満であることが認められた(従って、NCI活性基準を満たす)。

#### 【0169】

試験したHuCBE11とアドリアマイシンとの全ての組み合わせは、NCI基準(42%またはそれ未満のT/C率)に基づいてWiDrモデルで活性であると判断された。HuCBE11 100μg/注射または500μg/注射とアドリアマイシン 6mg/kgとの組み合わせ群( $P < 0.001$ )およびHuCBE11 50μg/注射とアドリアマイシン 6mg/kgまたは4mg/kgとの組み合わせ群( $P < 0.05$ )は、対応するHuCBE11のみの群よりも腫瘍重量が統計的に有意に低かった。18日目、21日目、または32日目から42日目までの全ての組み合わせ用量群のT/C率は42%未満であり、42日目のHuCBE11 100μgとアドリアマイシン 6mg/kgとの群では8.4%という低さであった。HuCBE11 500μgまたは100μgとアドリアマイシン 6mg/kgとの組み合わせ群の研究終了時(42日目)の腫瘍重量は、各HuCBE11のみの群よりも統計的に有意に( $P < 0.001$ )低いことが認められた(図5および図7)。

#### 【0170】

アドリアマイシンおよびHuCBE11の活性研究後、併用療法の認められた投与効果をより良好に特徴づけるための研究を行った。WiDrヒト結腸直腸腫瘍成長モデルを使用して、WiDrヒト結腸直腸腫瘍を異種移植した実験胸腺欠損ヌードマウスに50、100、または500μgのHuCBE11のみまたは4または6mg/kgのアドリアマイシンとの組み合わせを投与した。各処置群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって抗腫瘍有効性を決定した。コントロール群と処置群との間の平均腫瘍体積の相違として平均腫瘍体積の減少を計算した。腫瘍体積の抑制率(すなわち、影響率(Fa))を、処置群の平均腫瘍体積の減少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって計算した。1.000のFaは、腫瘍の完全な抑制を示した。表7は、個別の処置および組み合わせ処置の用量-効果の関係を示す。

#### 【0171】

## 【表7】

表 7: huCBE11とアドリアマイシンとの組み合わせ処置群についての用量-効果の関係

処置	用量	単位	同時処置	用量	単位	腫瘍体積	体積の減少	Fa
コントロール						1124.0	0.0	0.000
アドリアマイシン	4	mg/kg				1353.0	-229.0	-0.204
アドリアマイシン	6	mg/kg				1023.5	100.5	0.089
huCBE11	50	μg				633.2	490.8	0.437
huCBE11	100	μg				399.5	724.5	0.645
huCBE11	500	μg				396.0	728.0	0.648
huCBE11	50	μg	アドリアマイシン	4	mg/kg	350.3	773.7	0.688
huCBE11	50	μg	アドリアマイシン	6	mg/kg	258.9	865.1	0.770
huCBE11	100	μg	アドリアマイシン	4	mg/kg	356.5	767.5	0.683
huCBE11	100	μg	アドリアマイシン	6	mg/kg	86.5	1037.5	0.923
huCBE11	500	μg	アドリアマイシン	4	mg/kg	288.9	835.1	0.743
huCBE11	500	μg	アドリアマイシン	6	mg/kg	118.7	1005.3	0.894

アドリアマイシンのみでのW i D r腫瘍を保有するマウスの処置により、用量応答抗腫瘍有効性が得られなかった；したがって、huCBE11 + アドリアマイシンの組み合わせの協力作用を、組み合わせ指数の計算によって正式に評価することができなかった（ChouおよびTalalay (1984) Adv. Enz. Regul. 22: 27）。

## 【0172】

組み合わせ処置による増強を、huCBE11 / アドリアマイシンの組み合わせ処置によって各処置によって得られた有効性の合計と比較した場合に統計的に有意な相乗効果が得られるかどうかの決定によって評価した。統計的に有意な増強の試験には、各動物のFaの計算が必要であった。各腫瘍体積（表8）を使用して、35日目の各動物の腫瘍体積の抑制率（Fa）（表9）を計算した。上記の表7に示すように、（コントロール群の平均腫瘍体積 - 個別の動物の腫瘍体積）÷コントロール群の平均腫瘍体積としてFaを計算した。組み合わせ処置についての予想される累加Faを、組み合わせのいずれかの成分（huCBE11またはアドリアマイシン）を投与した群由来の平均Faの合計であると解釈する。組み合わせ処置の実際の効果と処置が単に累加であると予想される効果との間の相違も計算した（表9）。両側1標本t検定を使用して、組み合わせ処置により予想される累加値と統計的に有意に異なる平均Faが得られるかどうかを決定した（表9）。

## 【0173】

【表8】

表 8. 35日目の抑制率の計算のための各腫瘍体積および平均腫瘍体積

アドリナ リシン 4 mg/kg		アドリナ リシン 50 µg		アドリナ リシン 100 µg		アドリナ リシン 500 µg		アドリナ リシン 1000 µg		アドリナ リシン 50 µg + アドリナ リシン 4 mg/kg		アドリナ リシン 50 µg + アドリナ リシン 6 mg/kg		アドリナ リシン 100 µg + アドリナ リシン 500 µg		アドリナ リシン 100 µg + アドリナ リシン 6 mg/kg		アドリナ リシン 500 µg + アドリナ リシン 4 mg/kg		アドリナ リシン 500 µg + アドリナ リシン 6 mg/kg			
975.4	842.1	537.2	289.2	990.1	778.7	205.8	70.6	65.1	57.2	432.8	81.7	909.0	1087.2	1455.4	311.9	267.9	0.1	284.8	259.1	128.5	74.7	209.2	76.7
2233.6	548.3	1881.7	754.4	171.4	296.8	476.1	128.7	602.9	110.3	180.7	151.9	1069.4	1582.5	1017.1	375.4	208.9	280.9	406.8	451.8	799.1	155.9	273.4	80.0
879.1	2687.5	696.6	381.9	245.8	781.0	561.2	147.0	241.3	38.9	217.4	120.1	610.1	528.1	605.1	409.6	293.4	272.3	281.4	135.2	426.8	38.9	248.1	117.4
761.8	1865.5	901.8	766.4	281.4	537.5	191.2	281.9	601.7	131.1	277.0	164.7	647.5	1277.8	889.3	1688.6	737.5	273.7	340.8	319.0	188.2	59.8	130.9	100.2
2065.7	1550.2	1059.5	762.8	457.4	368.7	369.8	112.7	202.8	126.5	758.7	117.8	583.7	1560.9	1191.2	592.2	341.5	370.6	385.1	682.7	308.3	71.3	160.7	175.9
1028.3	1024.9	777.8	1795.6	1817.0	1434.7	2087.6	908.0	684.4	187.0	1124.0	1353.0	1023.5	633.2	399.5	396.0	350.3	258.9	356.5	86.5	288.9	118.7		

【表9】

	アドリアマ イシン 4 mg/kg	アドリアマ イシン 6 mg/kg	huCBE11 50 µg	huCBE11 100 µg	huCBE11 500 µg	huCBE11 4 mg/kg	huCBE11 50 µg + アドリアマイシン アドリアマイシン 4 mg/kg	huCBE11 50 µg + アドリアマイシン アドリアマイシン 6 mg/kg	huCBE11 100 µg + アドリアマイシン アドリアマイシン 4 mg/kg	huCBE11 100 µg + アドリアマイシン アドリアマイシン 6 mg/kg	huCBE11 100 µg + アドリアマイシン アドリアマイシン 6 mg/kg
	0.251	0.522	0.743	0.119	0.307	0.817	0.937	0.942	0.949	0.615	0.927
	0.512	-0.674	-	0.329	0.848	0.736	0.576	0.885	0.464	0.902	0.839
	0.033	-0.295	0.723	0.762	1.000	0.747	0.769	0.886	0.934	0.814	0.932
	-0.408	0.095	0.666	0.814	0.750	0.638	0.598	0.289	0.861	0.757	0.929
	-1.391	0.380	0.660	0.781	0.305	0.501	0.869	0.785	0.965	0.807	0.893
	0.530	0.462	0.636	0.739	0.758	0.750	0.880	0.620	0.965	0.779	0.896
	-0.660	0.198	0.318	0.750	0.522	0.830	0.749	0.465	0.883	0.754	0.853
	-0.137	0.209	-0.502	0.344	0.756	0.697	0.716	0.833	0.947	0.884	0.911
	-0.379	0.057	0.321	0.593	0.672	0.671	0.900	0.820	0.887	0.525	0.895
	-0.389	-0.060	0.473	0.696	0.670	0.657	0.393	0.726	0.937	0.857	0.844
平均：	-0.204	0.089	0.437	0.645	0.648	0.688	0.770	0.683	0.923	0.743	0.894
累加：	-	-	-	-	-	0.437	0.526	0.645	0.734	0.648	0.737
相違：	-	-	-	-	-	0.252	0.244	0.038	0.189	0.095	0.157
両側一標本t検定：累加と有意に異なるか？											
T値	-	-	-	-	-	7.719	4.577	0.559	16.182	1.827	15.687
DF	-	-	-	-	-	9	9	9	9	9	9
P値	-	-	-	-	-	<0.0001	0.0013	0.5901	<0.0001	0.1010	<0.0001

表9:腫瘍体積の抑制率

表9に示すように、両側1標本t検定の使用によって、多数のhuCBE11:アドリアマイシンの組み合わせ処置のhuCBE11と組み合わせた場合、4および6mg/kgアドリアマイシンの両方の用量により相乗効果が得られた（それぞれP < 0.0001およびP = 0.0013）。100µgまたは500µgの用量のhuCBE11のいずれかと組み合わせた場合、アドリアマイシン6mg/kgにより、相乗効果が得られた（P < 0.0001）。

01)。したがって、これらの組み合わせは、h u C B E 1 1 の抗腫瘍効果を有意に増強することが認められた。

#### 【0175】

本研究で使用したh u C B E 1 1 およびアドリアマイシンを使用した大多数の組み合わせ処置計画は、抗腫瘍効果の予想される累加と比較して抗腫瘍有効性を統計的に有意に増強した。W i D r ヒト結腸直腸腺癌を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスにおけるL T 受容体活性化m A b であるh u C B E 1 1 および化学療法剤であるアドリアマイシンの組み合わせ処置により、h u C B E 1 1 のみおよびアドリアマイシンのみの投与と比較して有意に改善された結果を示した。これらの組み合わせにより、h u C B E 1 1 の抗腫瘍効果が有意に増強された。

#### 【0176】

(実施例3：トポイソメラーゼI化学療法剤と組み合わせたL T R アゴニストの抗腫瘍効果)

(A . W i D r 異種移植片モデルにおけるh u C B E 1 1 / カンプトサール併用療法の抗腫瘍効果)

h u C B E 1 1 と組み合わせたトポイソメラーゼI化学療法剤(例えば、カンプトサール(イリノテカンともいわれる))の投与によって相乗的抗腫瘍活性(例えば、協力活性または増強活性)が得られるかどうかを決定するために、癌療法として試験するためのW i D r マウスモデルを使用してh u C B E 1 1 と組み合わせてカンプトサールを投与した。

#### 【0177】

適切なカンプトサールおよびh u C B E 1 1 の用量を決定するためおよび各薬物のみの個別の活性を決定するために用量範囲決定研究を行った。1 . 8 m g / k g から1 0 m g / k g までの漸増量のカンプトサールをW i D r 腫瘍細胞を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスに投与した(0日目)。1 0 m g / k g (P < 0 . 0 0 1)、6 m g / k g (P < 0 . 0 1)、および3 m g / k g (P < 0 . 0 5)のカンプトサールは、4 3 日目で、ビヒクルコントロールと比較してW i D r 腫瘍成長を統計的に有意に阻害した。2 4 ~ 3 1 日目にカンプトサール1 0 m g / k g 群で4 1 %に減少したことを除き、全ての用量群における全ての他の評価でのT / C 率は4 5 %超であった。投与研究由来の結果により、N ational C ancer I nstituteの活性基準(N C I ; 4 2 %またはそれ未満の試験 / コントロール率(T / C 率)が活性を構成する)によってW i D r モデルにおいてカンプトサールが不活性であると判断された。

#### 【0178】

並行研究では、5 0 0  $\mu$  g (P < 0 . 0 0 1)、5 0  $\mu$  g (P < 0 . 0 0 1)、および5  $\mu$  g (P < 0 . 0 5)の用量のh u C B E 1 1 は、4 3 日目で腫瘍成長を抑制することが見出された。h u C B E 1 1 5 0 0  $\mu$  g および5 0  $\mu$  g の群では、3 5 日目または3 8 日目~4 2 日目のT / C 率は4 2 %未満であった。ビヒクルコントロールと比較して、5 0 0  $\mu$  g (P < 0 . 0 0 1)、5 0  $\mu$  g (P < 0 . 0 0 1)、および5  $\mu$  g (P < 0 . 0 5)の用量ならびに研究終了時の1 0 m g / k g (P < 0 . 0 1)および6 m g / k g (P < 0 . 0 5)、および3 m g / k g (P < 0 . 0 5)のh u C B E 1 1 により、腫瘍成長が統計的に有意に抑制された。h u C B E 1 1 5 0 0  $\mu$  g の群および5 0  $\mu$  g の群における3 5 日目 / 3 8 日目~4 2 日目のT / C 率は4 2 %未満であった。結果は、h u C B E 1 1 は、N C I 活性基準(4 2 %またはそれ未満のT / C 率)に基づいたW i D r モデルで活性であることを証明した。

#### 【0179】

h u C B E 1 1 およびカンプトサールの組み合わせ活性の分析も行った。4 2 日目に、腫瘍重量は、h u C B E 1 1 5 0  $\mu$  g のみ(P < 0 . 0 0 1)での処置後よりもh u C B E 1 1 5 0  $\mu$  g とカンプトサール1 0 m g / k g との組み合わせでの処置後に有意に低かった(図1を参照のこと)。さらに、h u C B E 1 1 5 0  $\mu$  g とカンプトサール6 m g / k g との組み合わせ群(P < 0 . 0 1)およびh u C B E 1 1 5 0  $\mu$  g とカンプ

トサー<sup>ル</sup> 3 mg / kg との組み合わせ群 (P < 0.05) における平均腫瘍重量は、 hu CBE 11 50 µg のみの群における平均腫瘍重量と有意に異なった。 hu CBE 11 50 µg およびカンプトサー<sup>ル</sup> 10 mg / kg の群における T / C 率は、17日目で 42% 未満に下落し、42日目に 6.2% であった。さらに、T / C 率は、 hu CBE 11 50 µg およびカンプトサー<sup>ル</sup> 6 mg / kg の群における 17 日目～42 日目ならびに hu CBE 11 50 µg およびカンプトサー<sup>ル</sup> 3 mg / kg の群における 24～42 日目で 42% 未満であった。

#### 【0180】

42 日目の hu CBE 11 18 µg とカンプトサー<sup>ル</sup> 10 mg / kg、 hu CBE 11 10.5 µg とカンプトサー<sup>ル</sup> 6 mg / kg、または hu CBE 11 5.4 µg とカンプトサー<sup>ル</sup> 3 mg / kg との併用療法群と各カンプトサー<sup>ル</sup> 用量のみとの間での平均腫瘍重量の統計的に有意な差は認められなかった。T / C 率は、 hu CBE 11 18 µg とカンプトサー<sup>ル</sup> 10 mg / kg との群のみで 42% 未満であった (21～42 日目)。

。

#### 【0181】

要するに、 hu CBE 11 とカンプトサー<sup>ル</sup> との組み合わせは、NCI 活性基準 (42% またはそれ未満の T / C 率) に基づいて、WiDr モデルで活性であると判断された。予め確立された WiDr ヒト結腸直腸腫瘍の重量は、 hu CBE 11 のみよりも hu CBE 11 と化学療法剤であるカンプトサー<sup>ル</sup> との組み合わせを使用した 処置 後で統計的に有意に低かった。

(1) 50 µg hu CBE 11 および 10 mg / kg カンプトサー<sup>ル</sup> を 50 µg hu CBE 11 のみ (P < 0.001) と比較し、17 日目～42 日目の T / C 率は 42% 未満であった (6.2% という低さ)。

#### 【0182】

(2) 50 µg hu CBE 11 および 6 mg / kg カンプトサー<sup>ル</sup> を 50 µg hu CBE 11 のみ (P < 0.01) と比較し、17 日目～42 日目の T / C 率は 42% 未満であった。

#### 【0183】

(3) 50 µg hu CBE 11 および 3 mg / kg カンプトサー<sup>ル</sup> を 50 µg hu CBE 11 のみ (P < 0.05) と比較し、24 日目～42 日目の T / C 率は 42% 未満であった。

#### 【0184】

hu CBE 11 およびカンプトサー<sup>ル</sup> が協力性に作用することができるかどうかを決定するために、WiDr ヒト結腸直腸腫瘍成長モデルを移植した胸腺欠損ヌードマウスを使用して相乗作用研究を行った。これらの hu CBE 11 / カンプトサー<sup>ル</sup> 組み合わせ研究のために、10 mg / kg、6 mg / kg、または 3 mg / kg の 用量 のカンプトサー<sup>ル</sup> を選択した。Fa 値を計算するために使用する全ての腫瘍データを 21 日目にとった。各 処置 群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって抗腫瘍有効性を決定した。コントロール群と 処置 群との間の平均腫瘍体積の相違として平均腫瘍体積の減少を計算した。処置 群の平均腫瘍体積の減少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって、腫瘍体積の抑制率 (影響率 (Fa)) を計算した。1.000 の Fa は、腫瘍の完全な抑制を示す。表 10 は、個別の 処置 および組み合わせ 処置 の用量 - 効果の関係を示す。次いで、hu CBE 11 とカンプトサー<sup>ル</sup> との組み合わせ 処置 についての協力作用および増強の評価のために、得られた Fa 値を使用した。

#### 【0185】

## 【表10】

表 10: huCBE11とカンプトサールとの組み合わせ処置についての用量-効果の関係

処置	用量	単位	同時処置	用量	単位	腫瘍体積	体積の減少	Fa
コントロール						434.0	0.0	0.000
カンプトサール3	mg/kg					330.9	103.1	0.238
カンプトサール6	mg/kg					242.8	191.2	0.441
カンプトサール10	mg/kg					227.2	206.8	0.476
huCBE11 5	μg					319.0	115.0	0.265
huCBE11 50	μg					267.8	166.2	0.383
huCBE11 500	μg					252.5	181.5	0.418
huCBE11 5.4	μg	カンプトサール 3	mg/kg	283.1		150.9	0.348	
huCBE11 10.5	μg	カンプトサール 6	mg/kg	237.6		196.4	0.453	
huCBE11 18	μg	カンプトサール 10	mg/kg	135.5		298.5	0.688	
huCBE11 50	μg	カンプトサール 3	mg/kg	188.0		246.0	0.567	
huCBE11 50	μg	カンプトサール 6	mg/kg	103.2		330.8	0.762	
huCBE11 50	μg	カンプトサール 10	mg/kg	78.0		356.0	0.820	

本研究で薬物の増強を評価するために使用した用量は、固定された比の組み合わせに制限されなかった。統計的に有意な増強の試験には、各動物のFaの計算が必要である。各腫瘍体積（表41）を使用して、各動物の腫瘍体積の抑制率（Fa）を計算した（表42）。（コントロール群の平均腫瘍体積 - 個別の動物の腫瘍体積）÷コントロール群の平均腫瘍体積としてFaを計算した。組み合わせ処置についての予想される累加Faを、組み合わせのいずれかの成分を投与した群由来の平均Faの合計であると解釈する。組み合わせ処置の実際の効果と処置が単に累加であると予想される効果との間の相違も計算した（表42）。両側1標本t検定を使用して、組み合わせ処置により予想される累加値と統計的に有意に異なる平均Faが得られるかどうかを決定した（表42）。

## 【0186】

【表41】

表41: 各腫瘍体積

コントロール	カンプト サークル3	カンプト サークル6	カンプト サークル10	hCBE 50	hCBE 50 +カンプト サークル 3	hCBE 50 +カンプト サークル 6	hCBE 50 +カンプト サークル 10
607.4	463.6	177.9	363.3	171.3	137.9	175.0	102.2
588.4	265.8	197.8	209.9	356.5	150.7	136.3	123.1
356.7	211.5	386.4	137.2	440.3	112.9	93.0	118.8
239.1	343.5	167.6	252.0	254.0	124.4	81.7	34.3
353.0	393.6	313.8	152.8	326.6	261.7	16.7	80.3
352.7	288.0	246.9	232.5	170.5	288.5	70.8	31.8
638.2	297.6	303.1	283.6	244.3	230.1	73.3	49.2
573.4	400.1	228.8	184.4	231.8	197.0	77.0	37.4
508.8	317.4	207.9	271.4	178.1	163.6	81.5	65.2
365.5	327.6	197.8	185.4	304.5	213.3	226.8	137.6
625.5							
356.5							
394.0							
387.8							
576.4							
350.6							
346.0							
283.3							
351.9							
424.8							
平均:	434.0	330.9	242.8	227.2	267.8	188.0	103.2
							78.0

【0187】

【表42】

表42: 腫瘍体積の各抑制率

カンプト サール3	カンプト サール6	カンプト サール10	hCBE 50	hCBE 50 +カンプト +サール 3	hCBE 50 +カンプト +サール 6	hCBE 50 +カンプト +サール 10
-0.068	0.590	0.163	0.605	0.682	0.597	0.764
0.388	0.544	0.516	0.179	0.653	0.686	0.716
0.513	0.110	0.684	-0.015	0.740	0.786	0.726
0.208	0.614	0.419	0.415	0.713	0.812	0.921
0.093	0.277	0.648	0.247	0.397	0.962	0.815
0.336	0.431	0.464	0.607	0.335	0.837	0.927
0.314	0.302	0.347	0.437	0.470	0.831	0.887
0.078	0.473	0.575	0.466	0.546	0.823	0.914
0.269	0.521	0.375	0.590	0.623	0.812	0.850
0.245	0.544	0.573	0.298	0.508	0.477	0.683
平均:	0.238	0.441	0.476	0.383	0.567	0.762
累加:					0.621	0.824
相違:					-0.054	-0.061
	両側一標本 t 検定					
T 値:				-1.246	-1.404	-1.319
DF:				9	9	9
P 値:				0.2444	0.1940	0.2197

カンプトサールのみでの W i D r 腫瘍を保有するマウスの処置によって用量応答抗腫瘍有効性が得られるので、組み合わせ指数 ( C I ) の計算によって、h u C B E 1 1 + カンプトサールの組み合わせの協力作用を正式に評価することができた。m g / k g カンプトサール:  $\mu$  g h u C B E 1 1 の固定された比が 0 . 5 5 5 : 1 である協力性薬物作用の評価のために使用した用量を投与した。この比は、上記研究で決定した 2 つの薬剤の中央値効果用量の比に基づいた。協力作用の正式な評価には、W i n d d o w s ベースの用量効果分析のための C a l c u S y n V 1 . 1 ( B i o s o f t , C a m b r i d g e U K ) ソフトウェアを使用した組み合わせ指数 ( C I ) の計算を使用した。上記のように、組み合わせで投与した処置について、C I = 1 は累加有効性を示す。C I < 1 は協力作用を示す。C I > 1 は拮抗作用を示す。C I 計算で使用した用量 - 効果関係 ( F a 値 ) を、表 1 1 に示す。

## 【表11】

表 11: WiDr 異種移植片モデルにおけるカンプトサール - huCBE11 の

協力作用の計算のための用量-効果関係

個別投与				組み合わせ (0.555:1)		
カンプトサール 用量 (mg/kg)	影響率	huCBE11 用量 (μg)	影響率	カンプトサール 用量 (mg/kg)	huCBE11 用量 (μg)	影響率
5	0.238	5	0.265	3	5.4	0.348
6	0.441	50	0.383	6	10.8	0.453
10	0.476	500	0.418	10	18.0	0.688

カンプトサールおよびhuCBE11について計算したCI値に基づいて、カンプトサール / huCBE11組み合わせの固定された比の組み合わせ処置 (0.555 mg / kg : 1 μg) により協力性抗腫瘍有効性を示すと判断した。個別の処置および組み合わせ処置についての用量-応答関係の強さおよび形状を、それぞれ表12および13に示す。本研究で使用された正確な実験用量レベルについて計算したCI値を、表14に示す。本研究は完全に独立した作用様式を有すると考えられる薬物を使用するので、相互に排反しないCI値を適用した。3 mg / kg カンプトサール + 5.4 μg huCBE11、6 mg / kg カンプトサール + 10.5 μg huCBE11、および10 mg / kg カンプトサール + 18 μg huCBE11を使用した組み合わせ用量により協力効果が認められた。組み合わせの用量レベル範囲を超えるCIのシミュレーションを表15に示す。3.3 mg / kg カンプトサール + 6 μg huCBE11 (腫瘍体積が35%抑制される) から 31.3 mg / kg カンプトサール + 56.3 μg huCBE11 (腫瘍体積が99%抑制される)までの範囲の組み合わせ用量により、協力効果が認められた。CIによって示した協力作用または拮抗作用の程度の全解釈を表3に示す。影響率の関数としてのCIを図8に示す。要するに、カンプトサールおよびhuCBE11を使用した固定された比の組み合わせ処置 (0.555 : 1) により、21日目に評価した場合、WiDrヒト結腸直腸腺癌の確立された異種移植片に対して協力性抗腫瘍有効性が認められた。

## 【0189】

## 【表12】

表 12: 効果用量の中央値

薬剤	用量 単位	効果用量の中央値 (95% C.L.)	
		個別投与	組み合わせ (0.555:1)
カンプトサール	mg/kg	9.8 (6.1 - 15.6)	5.7 (4.2 - 7.7)
huCBE11	μg	2933 (157 - 54760)	10.2 (7.6 - 13.9)

## 【0190】

## 【表13】

表13: 用量-効果曲線の特徴

値	勾配	Y-切片	R
カンプトサール			
平均	0.913	-0.903	0.9510
SEM	0.297	0.232	
huCBE11			
平均	0.150	-0.519	0.9488
SEM	0.050	0.094	
カンプトサール + huCBE11			
平均	1.147	-0.866	0.9543
SEM	0.359	0.281	

## 【0191】

## 【表14】

表14: 実験値について計算した組み合わせ指數 (CI)

カンプトサール 用量 (mg/kg)	huCBE11 用量 (ug)	影響率	作用機構			
			相互排反		排反しない	
			CI	協力作用	CI	協力作用
3	5.4	0.348	0.734	++	0.809	+++
6	10.8	0.453	0.769	+++	0.779	+++
10	18.0	0.688	0.431	+++	0.431	+++

++ 中程度の協力作用

+++ 協力作用

## 【0192】

【表 15 - 1】

表 15: 組み合わせ指數 (CI) シミュレーション

Fa	CI	カンプトサール (mg/kg)	huCBE11 (μg)	記号
相互に排反する作用機構				
0.02	2.31E+07	0.191	0.344	-----
0.05	9.40E+04	0.44	0.79	-----
0.10	1224.405	0.8	1.5	-----
0.15	84.071	1.3	2.3	-----
0.20	11.792	1.7	3.1	-----
0.25	2.812	2.2	3.9	---
0.30	1.185	2.7	4.9	-
0.35	0.797	3.3	6.0	++
0.40	0.675	4.0	7.2	+++
0.45	0.621	4.8	8.6	+++
0.50	0.587	5.7	10.2	+++
0.55	0.559	6.8	12.2	+++
0.60	0.533	8.1	14.6	+++
0.65	0.508	9.8	17.6	+++
0.70	0.483	11.9	21.4	+++
0.75	0.456	14.8	26.7	+++
0.80	0.428	19.1	34.3	+++
0.85	0.396	25.8	46.5	+++
0.90	0.357	38.6	69.6	+++
0.95	0.302	74.1	133.4	+++
0.99	0.209	312.6	562.8	++++
排反しない (完全に独立した作用様式)				
0.02	5.53E+07	1.91E-01	0.3	-----

【0193】

【表15-2】

0.05	2.00E+05	0.437	0.8	-----
0.10	2390.925	0.837	1.5	-----
0.15	155.609	1.254	2.3	-----
0.20	20.537	1.698	3.1	-----
0.25	4.354	2.183	3.9	-----
0.30	1.523	2.717	4.9	---
0.35	0.883	3.316	6.0	+
0.40	0.699	3.994	7.2	+++
0.45	0.628	4.775	8.6	+++
0.50	0.589	5.688	10.2	+++
0.55	0.559	6.776	12.2	+++
0.60	0.533	8.101	14.6	+++
0.65	0.508	9.759	17.6	+++
0.70	0.483	11.908	21.4	+++
0.75	0.456	14.825	26.7	+++
0.80	0.428	19.052	34.3	+++
0.85	0.396	25.813	46.5	+++
0.90	0.357	38.639	69.6	+++
0.95	0.302	74.127	133.4	+++
0.99	0.209	312.642	562.8	++++

要するに、WiDrヒト結腸直腸腺癌を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスにおけるLT受容体活性化mAbであるhucBE11と化学療法剤であるカンプトサールとの組み合わせ処置により、hucBE11投与のみおよびカンプトサール投与のみと比較して有意に改善された結果が認められた。特に、hucBE11およびカンプトサールを使用した固定された比(0.555mg/kgカンプトサール:1μg hucBE11)での組み合わせ処置の効果は、組み合わせ指数分析によって協力性であると判断された。

## 【0194】

(B.KM-20L2異種移植片モデルにおける組み合わせhucBE11/カンプトサール療法の抗腫瘍効果)

カンプトサールをhucBE11と組み合わせて投与した場合にhucBE11と組み合わせたトポイソメラーゼI化学療法剤(例えば、カンプトサール)の投与によって協力性抗腫瘍活性(例えば、増強または協力性)を示すかどうかを決定するために、さらなるヒト結腸直腸腺癌マウスモデル系であるKM-20L2モデルも使用した。

## 【0195】

カンプトサールとhucBE11との組み合わせ抗腫瘍効果の研究のための適切なカンプトサールおよびhucBE11の用量を決定するために、用量範囲決定研究を行った。1.8mg/kgから10mg/kgまでの漸増用量のカンプトサールを、KM-20L2腫瘍細胞を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスに投与した(0日目)。33日目(研究終了時)での10mg/kg( $P < 0.001$ )、6mg/kg( $P < 0.01$ )、および3mg/kg( $P < 0.05$ )でのカンプトサール処置によって、KM-20L2腫瘍成長が統計的に有意に抑制された。11~14日目に最初に抑制が認められた。10mg/kgの群における18日目から33日目までのT/C率は42%またはそれ未満であるので、NCI活性基準を満たしていた。個別の研究では、生理食塩水コントロール群と比較して、55日目の終了時のカンプトサール群で有意な腫瘍抑制は認められないが、6mg/kgでは13日目~51日目(13日目~44日目に $P < 0.001$ ; 48日目に $P < 0.01$ ; 51日目に $P < 0.05$ )、3mg/kgでは13日目~48日目(13日目~44日目に $P < 0.001$ )に腫瘍抑制が認められた。

目～41日目にP<0.001；44日目にP<0.01；48日目にP<0.05)、1.8mg/kgでは9日目～44日目(16日目～27日目、41日目にP<0.001；13日目、30日目～37日目にP<0.01；9日目、44日目にP<0.05)に統計的に有意な腫瘍成長の抑制が認められた。6mg/kg群で16日目～30日目および3mg/kg群で20日目に42%またはそれ未満のT/C率であった。したがって、カンプトサールは、National Cancer Institute (NCI)の活性基準(42%またはそれ未満のT/C率)に基づいて、KM-20L2腫瘍モデルにおいて活性であると判断された。

#### 【0196】

KM-20L2異種移植片モデルにおけるhucBE11の抗腫瘍活性を評価するための並行投与研究では、腫瘍成長は、ビヒクルコントロール群と比較して、hucBE11 2mg/kg(28日目および33日目)および4mg/kg(21日目～28日目)の投与群で有意に(P<0.05)減少することが認められた。並行個別研究では(併用療法の有効性も試験される)、以下の用量のhucBE11によって腫瘍成長が有意に抑制された。

#### 【0197】

(1) 16日目～55日目で20mg/kg(20日目～48日目でP<0.001；16日目、51日目、55日目でP<0.01)、

(2) 16日目～55日目で2mg/kg(16日目～51日目でP<0.001；55日目でP<0.01)、および

(3) 20日目～55日目で0.2mg/kg(27日目～30日目でP<0.001；20日目～23日目、34日目～37日目、44～48日目でP<0.01；51日目～55日目でP<0.05)。

hucBE11用量群のT/C率は、一連の両研究を通して42%より高かった。第2の研究群で認められた最も低いT/C率は、27日目の20mg/kg群での42.4%であった。要するに、hucBE11は、NCIの活性基準(42%またはそれ未満のT/C率)に基づいて、KM-20L2腫瘍モデルにおいて不活性であると判断された。33日目の投与研究の終了時に、2mg/kgのhucBE11は、ビヒクルコントロールと比較して腫瘍成長を統計的に有意に抑制した。4mg/kg群の21日目～28日目および2mg/kg群の28日目でも抑制が認められた。個別の試験では、ビヒクルコントロールと比較して、16日目～55日目の20mg/kg、16日目～55日目の2mg/kg、および20日目～55日目の0.2mg/kgのhucBE11で腫瘍成長の有意な抑制が認められた。27日目の20mg/kg群のhucBE11におけるT/C率は42.4%という低さであった。

#### 【0198】

hucBE11とカンプトサールとの組み合わせ効果も試験した。hucBE11 20mg/kgとカンプトサール3mg/kgとの組み合わせにより、hucBE11 20mg/kgのみと比較して腫瘍成長が統計的に有意に減少した(16日目～41日目、48日目でP<0.001；13日目、44日目～55日目でP<0.01)(図8)。hucBE11 2mg/kgと組み合わせた場合、3mg/kg(16日目～44日目でP<0.001；48日目～55日目でP<0.01；13日目でP<0.05)または1.8mg/kg(20日目でP<0.001；23日目でP<0.01；16日目、27日目～37日目でP<0.05)のカンプトサール用量でもhucBE11 2mg/kgのみと比較して平均腫瘍重量が有意に低下した。hucBE11 0.2mg/kgと組み合わせた場合、hucBE11 0.2mg/kgのみと比較して、カンプトサール1.8mg/kgは13日目～23日目で腫瘍成長を統計的に有意に(P<0.05)抑制した。さらに、hucBE11 9.48mg/kgおよびカンプトサール6mg/kg(P<0.001)、hucBE11 4.74mg/kgおよびカンプトサール3mg/kg(P<0.001)、ならびにhucBE11 2.84mg/kgおよびカンプトサール1.8mg/kg(P<0.01)の組み合わせは、研究終了時に腫瘍成

長を統計的に有意に抑制した。これらの huCBE11とカンプトサールとの組み合わせ群の大部分のT/C率は、研究終了時に16日目または20日目で42%未満であった。したがって、huCBE11とカンプトサールとの組み合わせは、NCIの活性基準(42%またはそれ未満のT/C率)に基づいて、KM-20L2腫瘍モデルにおいて活性であると判断された。

#### 【0199】

huCBE11およびカンプトサールのいずれかが互いに増強されるか協力性に作用することができるかどうかを試験するために、上記のように腫瘍成長モデルにおいてKM-20L2ヒト結腸直腸腺癌を移植した胸腺欠損ヌードマウスを使用して、相乗作用研究を行った。これらのhuCBE11/カンプトサール組み合わせ研究のために、6mg/kg、3mg/kg、または1.8mg/kgのカンプトサール用量を選択した。9日目、13日目、16日目、20日目、23日目、27日目、30日目、34日目、37日目、および41日目でFa値の計算のために使用した腫瘍データを取った。各処置群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって抗腫瘍有効性を決定した。コントロール群と処置群との間の平均腫瘍体積の相違として平均腫瘍体積の減少を計算した。腫瘍体積の抑制率(すなわち、影響率(Fa))を、処置群の平均腫瘍体積の減少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって計算した。1.000のFaは、腫瘍の完全な抑制を示す。表15は、実験の経時変化にわたる個別の処置および組み合わせ処置の用量-効果の関係を示す。次いで、huCBE11とカンプトサールとの組み合わせ処置についての協力作用および強化の評価で得られたFa値を使用した。

#### 【0200】

【表 15 - 3】

表 15: huCBE11およびカンブトサール:予想される累加抑制対実際の腫瘍体積抑制

処置	用量 (mg/kg)	同時処置	用量 (mg/kg)	腫瘍体積の抑制: 平均影響率 (Fa)									
				9	13	16	20	23	27	30	34	37	41
腫瘍体積の抑制: 平均影響率 (Fa)													
カンブトサール	1.8			0.144	0.196	0.278	0.417	0.357	0.340	0.260	0.250	0.254	0.212
huCBE11	0.2			-0.026	0.003	0.125	0.249	0.294	0.377	0.369	0.345	0.372	0.381
huCBE11	0.2	カンブトサール	1.8	0.031	0.207	0.389	0.579	0.542	0.539	0.500	0.475	0.414	0.382
		累加:		0.118	0.199	0.403	0.666	0.651	0.718	0.629	0.595	0.626	0.592
		相違:		-0.087	0.009	-0.013	-0.087	-0.109	-0.178	-0.130	-0.119	-0.212	-0.210
		t:		-1.383	0.151	-0.300	-2.968	-2.916	-4.077	-2.570	-2.290	-4.262	-2.853
		DF:		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		P:		0.2093	0.8846	0.7729	0.0209	0.0225	0.0047	0.0370	0.0558	0.0037	0.0246
カンブトサール	1.8			0.144	0.196	0.278	0.417	0.357	0.340	0.260	0.250	0.254	0.212
huCBE11	2			0.101	0.137	0.322	0.458	0.497	0.542	0.524	0.541	0.485	0.541
huCBE11	2	カンブトサール	1.8	0.092	0.287	0.530	0.748	0.793	0.791	0.775	0.776	0.715	0.699
		累加:		0.246	0.332	0.600	0.875	0.854	0.882	0.785	0.791	0.739	0.752
		相違:		-0.154	-0.046	-0.070	-0.127	-0.061	-0.091	-0.009	-0.014	-0.023	-0.054
		t:		-2.193	-1.098	-1.732	-3.729	-1.252	-1.503	-0.135	-0.219	-0.294	-0.673
		DF:		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		P:		0.0644	0.3086	0.1269	0.0074	0.2507	0.1765	0.8961	0.8329	0.7775	0.5224

【0 2 0 1】

【表 15 - 4】

表 15: huCBE11およびカンプトサール: 予想される累加抑制対実際の腫瘍体積抑制 (続き)

処置	用量 (mg/kg)	同時処置	用量 (mg/kg)	腫瘍体積の抑制: 平均影響率 (Fa)								
				9	13	16	20	23	27	30	34	
日												
カンプトサール	3			0.098	0.327	0.466	0.593	0.521	0.463	0.406	0.381	
huCBE11	2			0.101	0.137	0.322	0.458	0.497	0.542	0.524	0.541	
huCBE11	2	カンプトサール	3	0.108	0.377	0.682	0.852	0.883	0.897	0.888	0.886	
累加:	0.199	0.464	0.739	1.051	1.018	1.005	0.930	0.922	0.853	0.859	0.852	
相違:	-0.091	-0.087	-0.107	-0.198	-0.136	-0.109	-0.042	-0.036	0.006	-0.023		
t:	-1.081	-1.585	-2.808	-6.581	-4.138	-2.642	-0.927	-0.719	0.141	-0.479		
DF:	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
				P: 0.3156	0.1569	0.0262	0.0003	0.0044	0.0333	0.3847	0.4954	
カンプトサール	3			0.098	0.327	0.466	0.593	0.521	0.463	0.406	0.381	
huCBE11	20			0.053	0.087	0.263	0.435	0.504	0.576	0.539	0.543	
huCBE11	20	カンプトサール	3	0.043	0.376	0.714	0.892	0.943	0.959	0.957	0.953	
累加:	0.151	0.413	0.730	1.028	1.026	1.039	0.945	0.924	0.893	0.872	0.909	
相違:	-0.108	-0.037	-0.016	-0.136	-0.083	-0.080	0.013	0.029	0.034	0.037		
t:	-1.521	-0.757	-0.515	-7.466	-7.095	-8.447	1.255	2.372	1.776	1.582		
DF:	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
				P: 0.1720	0.4737	0.6226	0.0001	0.0002	0.0001	0.2497	0.0494	0.1190
											0.1576	

huCBE11 およびカンプトサールの個別の処置および組み合わせ処置の抗腫瘍活性の観察およびFa値の計算後、協力作用について huCBE11 およびカンプトサールの間の関係を試験した。カンプトサールのみでのKM-20L2腫瘍を保有するマウスの処置により用量応答腫瘍有効性が得られるので、huCBE11 + カンプトサールの組み合わせの協力作用を、組み合わせ指数 (CI) の計算によって正式に評価することができた。CI計算で使用した用量 - 効果関係を表16に示し、中央値効果用量を表17にまとめた。固定された比が 1 : 0 . 63 (mg / kg huCBE11 : mg / kg カンプトサ

ール)である本研究で協力性薬物作用を評価するために使用した用量を投与した。この比は、上記研究で決定した2つの薬剤の中央値効果用量の比に基づいた。協力作用の正式な評価には、Windows(登録商標)ベースの用量-効果分析のためのCalcusyn V1.1(Biosoft, Cambridge UK)ソフトウェアを使用した組み合わせ指数(CI)の計算を使用した。上記のように、組み合わせで投与した処置について、CI = 1は累加有効性を示す。CI < 1は協力作用を示す。CI > 1は拮抗作用を示す。組み合せで投与した処置について、CI = 1は累加有効性を示した。1未満のCIは協力作用を示した。1を超えるCIは拮抗作用を示した。カンプトサールおよびh u C B E 1 1の組み合わせ指数試験を通して、1 : 0 . 6 3 (mg / kg h u C B E 1 1 : mg / kg カンプトサール)の固定された比の組み合わせ処置により協力性抗腫瘍有効性を示すことが認められた。カンプトサールおよびh u C B E 1 1の個別の処置および組み合わせ処置についての用量-応答関係の強さおよび形状を、それぞれ表18および19に示す。組み合わせ処置研究で使用された正確な実験用量レベルのために計算したCI値を、表19に示す。

【0202】

【表 16】

表 16: 組み合わせ指數計算のための huCBE11 およびカンプトサールの用量 - 効果の関係 (Fa 値)

処置	用量 (mg/kg)	同時処置	用量 (mg/kg)	日 影響率 (Fa)							
				13	16	20	23	27	30	34	37
個別投与											
huCBE11	0.2			0.003	0.125	0.249	0.294	0.377	0.369	0.345	0.372
	2.0			0.137	0.322	0.458	0.497	0.542	0.524	0.541	0.485
	20.0			0.086	0.264	0.435	0.504	0.576	0.539	0.543	0.525
カンプトサール	1.8			0.196	0.278	0.417	0.357	0.340	0.260	0.250	0.254
	3.0			0.327	0.467	0.593	0.521	0.463	0.406	0.381	0.368
	6.0			0.360	0.594	0.781	0.759	0.701	0.607	0.564	0.495
組み合わせ (1:0.63)											
huCBE11	2.84	カンプトサール	1.8	0.082	0.459	0.775	0.841	0.859	0.855	0.830	0.796
	4.74		3.0	0.363	0.747	0.901	0.936	0.953	0.938	0.933	0.901
	9.48		6.0	0.385	0.770	0.945	0.978	0.994	0.996	0.995	0.981

【0 2 0 3】

## 【表17】

表17: huCBE11およびカンプトサール:組み合わせ指数の計算のための効果用量中央値 (mg/kg)

日	huCBE11		カンプトサール	
	個別投与	組み合わせ (1:0.63)	個別投与	組み合わせ (1:0.63)
	効果用量中央値 (95% 信頼区間)			
13	174 (0 - 220250)	10.7 (3.5 - 32.7)	12.4 (3.2 - 47.7)	6.7 (2.2 - 20.6)
16	981 (0 - 1300300)	2.6 (1.0 - 6.7)	4.0 (3.1 - 5.0)	1.6 (0.6 - 4.2)
20	32.7 (0 - 3435)	1.0 (0.5 - 2.0)	2.3 (2.2 - 2.4)	0.6 (0.3 - 1.3)
23	9.0 (0.7 - 115)	1.1 (0.9 - 1.3)	2.7 (2.6 - 2.9)	0.7 (0.6 - 0.8)
27	2.1 (0.5 - 9)	1.5 (1.3 - 1.8)	3.2 (2.9 - 3.5)	1.0 (0.8 - 1.1)
30	3.8 (0.6 - 24)	1.8 (1.1 - 2.7)	4.2 (4.0 - 4.3)	1.1 (0.7 - 1.7)
34	3.6 (0.4 - 31)	1.8 (1.3 - 2.6)	4.7 (4.5 - 4.9)	1.1 (0.8 - 1.6)
37	6.6 (1.9 - 22)	1.6 (1.2 - 2.1)	6.0 (5.1 - 6.9)	1.0 (0.8 - 1.3)
41	3.0 (0.3 - 29)	1.5 (1.3 - 1.9)	7.3 (5.2 - 10.3)	1.0 (0.8 - 1.2)

【0204】

【表 18】

表 18: huCBE11 もよびカンプトサール (KM-20L2 異種移植片モデル) の用量 - 効果曲線の特徴

日	値	huCBE11				カンプトサール				huCBE11 + カンプトサール			
		勾配	Y-切片	R	勾配	Y-切片	R	勾配	Y-切片	勾配	Y-切片	R	勾配
13	平均	0.75	-1.67	0.7989	0.67	-0.73	0.9021	1.53	-1.57	0.8434			
	SEM	0.56	0.49	0.32	0.17			0.98		0.72			
16	平均	0.20	-0.60	0.7325	1.09	-0.65	0.9758	1.08	-0.45	0.8642			
	SEM	0.19	0.16	0.24	0.13			0.63		0.46			
20	平均	0.18	-0.28	0.8173	1.33	-0.48	0.9998	1.31	-0.01	0.9787			
	SEM	0.13	0.11	0.03	0.02			0.27		0.20			
23	平均	0.19	-0.18	0.8795	1.45	-0.64	0.9991	1.76	-0.05	0.9982			
	SEM	0.10	0.09	0.06	0.03			0.11		0.08			
27	平均	0.18	-0.06	0.9347	1.27	-0.63	0.9954	2.76	-0.50	0.9976			
	SEM	0.07	0.06	0.12	0.07			0.19		0.14			
30	平均	0.15	-0.09	0.9026	1.23	-0.76	0.9996	3.16	-0.77	0.9815			
	SEM	0.07	0.06	0.04	0.02			0.62		0.45			
34	平均	0.18	-0.10	0.8703	1.12	-0.76	0.9995	3.12	-0.81	0.9873			
	SEM	0.10	0.09	0.04	0.02			0.50		0.37			
37	平均	0.14	-0.11	0.9627	0.87	-0.68	0.9954	2.16	-0.43	0.9940			
	SEM	0.04	0.03	0.08	0.05			0.24		0.17			
41	平均	0.14	-0.07	0.8578	0.89	-0.77	0.9847	1.97	-0.37	0.9973			
	SEM	0.08	0.07	0.16	0.09			0.15		0.11			

【0205】

【表19】

表 19: huCBE11 およびカンプトサール (Cam) : 実験値についての組み合わせ指数 (CI)

日	用量 (mg/kg)		影響率	作用機構				
	huCBE11	Cam		相互排反		排反しない		
				CI	協力作用	CI	協力作用	
13	2.84	1.8	0.082	5.842	---	8.090	---	
	4.74	3.0	0.363	0.620	+++	0.653	+++	
	9.48	6.0	0.385	1.078	±	1.178	-	
16	2.84	1.8	0.459	0.532	+++	0.536	+++	
	4.74	3.0	0.747	0.279	++++	0.279	++++	
	9.48	6.0	0.770	0.497	+++	0.497	+++	
20	2.84	1.8	0.775	0.308	+++	0.308	+++	
	4.74	3.0	0.901	0.248	++++	0.248	++++	
	9.48	6.0	0.945	0.308	+++	0.308	+++	
23	2.84	1.8	0.841	0.206	++++	0.206	++++	
	4.74	3.0	0.936	0.170	++++	0.170	++++	
	9.48	6.0	0.978	0.158	++++	0.158	++++	
27	2.84	1.8	0.859	0.137	++++	0.137	++++	
	4.74	3.0	0.953	0.088	+++++	0.088	+++++	
	9.48	6.0	0.994	0.034	+++++	0.034	+++++	
30	2.84	1.8	0.855	0.101	++++	0.101	++++	
	4.74	3.0	0.938	0.078	+++++	0.078	+++++	
	9.48	6.0	0.996	0.016	+++++	0.016	+++++	
34	2.84	1.8	0.830	0.092	+++++	0.092	+++++	
	4.74	3.0	0.933	0.061	+++++	0.061	+++++	
	9.48	6.0	0.995	0.011	+++++	0.011	+++++	
37	2.84	1.8	0.796	0.063	+++++	0.063	+++++	
	4.74	3.0	0.901	0.040	+++++	0.040	+++++	
	9.48	6.0	0.981	0.011	+++++	0.011	+++++	
41	2.84	1.8	0.779	0.059	+++++	0.059	+++++	
	4.74	3.0	0.892	0.038	+++++	0.038	+++++	
	9.48	6.0	0.974	0.014	+++++	0.014	+++++	

+++++ 非常に強い協力作用

++++ 強い協力作用

+++ 協力作用

± ほぼ累加的

- わずかな拮抗作用

--- 強い拮抗作用

本研究は完全に独立した作用様式を有すると考えられる薬物を使用するので、相互に排反しないCI値をたいてい適用した。2.84 mg / kg huCBE11 + 1.8 mg / kg カンプトサール、4.74 mg / kg huCBE11 + 3 mg / kg カンプトサール、および9.48 mg / kg huCBE11 + 6 mg / kg カンプトサールを用いる組み合わせの用量は、16日目～41日目で協力効果を示した（表19）。組み合わせの用量レベル範囲を超えるCIのシミュレーションを表20および21に示し、CIによって示した協力作用または拮抗作用の程度の全解釈を表3に示す。全処置期間を通して協力効果が認められた。腫瘍抑制率の関数としてのCIを図10に示す。50%を超える腫瘍抑制レベルで協力作用が最も顕著であった。組み合わせの協力性効果のピークは、16日に示された。20%～80%の腫瘍抑制が得られる用量範囲は、1 mg / kg と100 mg / kgとの間の用量レベルでの2つの薬物の組み合わせであった。要するに、huCBE11 およびカンプトサールの固定された比の組み合わせ処置（1:0.63）により、協力性抗腫瘍有効性が認められた。

【0206】

【表20-1】

表20: 組み合わせ指数のシミュレーション: 相互排反作用様式

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	Cam			huCBE11	Cam			huCBE11	Cam	
13日目				16日目				20日目				
0.02	16	0.8	0.5	-----	21000	0.07	0.05	-----	2.8E+06	0.05	0.03	-----
0.05	7	1.6	1.0	----	440	0.2	0.1	-----	32000	0.1	0.1	-----
0.10	3.8	2.5	1.6	----	21	0.3	0.2	-----	954	0.2	0.1	-----
0.15	2.56	3.4	2.2	---	3.6	0.5	0.3	----	109	0.3	0.2	-----
0.20	1.918	4.3	2.7	---	1.18	0.7	0.5	-	21	0.4	0.2	-----
0.25	1.509	5.2	3.3	---	0.651	1.0	0.6	+++	5.7	0.4	0.3	-----
0.30	1.224	6.1	3.9	--	0.500	1.2	0.8	+++	1.94	0.5	0.3	---
0.35	1.012	7.1	4.5	±	0.449	1.5	0.9	+++	0.847	0.6	0.4	++
0.40	0.848	8.2	5.2	++	0.430	1.8	1.1	+++	0.486	0.7	0.5	+++
0.45	0.715	9.4	5.9	++	0.423	2.2	1.4	+++	0.358	0.9	0.5	+++
0.50	0.605	11	7	+++	0.419	2.6	1.6	+++	0.310	1.0	0.6	+++
0.55	0.512	12	8	+++	0.418	3.2	2.0	+++	0.292	1.2	0.7	++++
0.60	0.432	14	9	+++	0.418	3.8	2.4	+++	0.285	1.4	0.9	++++
0.65	0.362	16	10	+++	0.418	4.6	2.9	+++	0.283	1.6	1.0	++++
0.70	0.300	19	12	++++	0.418	5.7	3.6	+++	0.282	1.9	1.2	++++
0.75	0.243	22	14	++++	0.418	7.2	4.5	+++	0.283	2.4	1.5	++++
0.80	0.192	26	17	++++	0.418	9.4	5.9	+++	0.284	2.9	1.8	++++
0.85	0.144	33	21	++++	0.419	13	8	+++	0.285	3.8	2.4	++++
0.90	0.098	45	28	+++++	0.419	20	13	+++	0.287	5.4	3.4	++++
0.95	0.053	73	46	+++++	0.420	40	25	+++	0.290	10	6	++++
0.99	0.014	215	135	+++++	0.422	181	114	+++	0.296	34	21	++++
23日目				27日目				30日目				
0.02	7.0E+06	0.12	0.07	-----	7.4E+08	0.4	0.2	-----	2.3E+10	0.5	0.3	-----
0.05	9.0E+04	0.2	0.1	-----	4.7E+06	0.5	0.3	-----	5.8E+07	0.7	0.4	-----
0.10	2893	0.3	0.2	-----	88100	0.7	0.4	-----	512000	0.9	0.6	-----
0.15	346	0.4	0.3	-----	7477	0.8	0.5	-----	27400	1.0	0.6	-----
0.20	70	0.5	0.3	-----	1168	0.9	0.6	-----	3021	1.1	0.7	-----
0.25	19	0.6	0.4	-----	252	1.0	0.6	-----	489	1.2	0.8	-----
0.30	6.1	0.7	0.4	---	66	1.1	0.7	-----	100	1.3	0.8	-----
0.35	2.3	0.8	0.5	---	20	1.2	0.8	-----	24	1.4	0.9	-----
0.40	1.03	0.9	0.5	±	6.6	1.3	0.8	-----	6.4	1.5	1.0	-----
0.45	0.553	1.0	0.6	+++	2.4	1.4	0.9	---	2.0	1.6	1.0	---
0.50	0.366	1.1	0.7	+++	1.02	1.5	1.0	±	0.73	1.8	1.1	++
0.55	0.288	1.2	0.8	+++	0.525	1.6	1.0	+++	0.370	1.9	1.2	+++
0.60	0.253	1.4	0.9	+++	0.338	1.8	1.1	+++	0.252	2.0	1.3	++++
0.65	0.235	1.5	1.0	+++	0.259	1.9	1.2	+++	0.203	2.1	1.3	++++
0.70	0.224	1.7	1.1	+++	0.219	2.1	1.3	+++	0.175	2.3	1.4	++++
0.75	0.216	2.0	1.3	+++	0.192	2.3	1.4	+++	0.153	2.5	1.6	++++
0.80	0.208	2.4	1.5	+++	0.168	2.5	1.6	+++	0.132	2.7	1.7	++++
0.85	0.199	2.9	1.8	+++	0.145	2.8	1.8	+++	0.111	3.0	1.9	++++
0.90	0.188	3.8	2.4	+++	0.119	3.4	2.1	+++	0.088	3.5	2.2	++++
0.95	0.172	5.7	3.6	+++	0.087	4.4	2.8	++++	0.061	4.4	2.8	++++
0.99	0.141	15	9	+++	0.043	8.0	5.1	++++	0.027	7.5	4.7	++++

【0207】

## 【表20-2】

表20: 組み合わせ指標のシミュレーション: 相互排反作用様式 (続き)

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	Cam			huCBE11	Cam			huCBE11	Cam	
34日目			37日目			41日目						
0.02	5.5E+08	0.5	0.3	----	1.2E+11	0.3	0.2	----	1.2E+11	0.2	0.1	----
0.05	3.5E+06	0.7	0.4	----	1.7E+08	0.4	0.3	----	2.0E+08	0.3	0.2	----
0.10	64000	0.9	0.6	----	967000	0.6	0.4	----	1.3E+06	0.5	0.3	----
0.15	5409	1.0	0.7	----	39400	0.7	0.4	----	59000	0.6	0.4	----
0.20	842	1.2	0.7	-----	3533	0.8	0.5	-----	5687	0.8	0.5	-----
0.25	182	1.3	0.8	-----	483	1.0	0.6	-----	824	0.9	0.6	-----
0.30	48	1.4	0.9	-----	85	1.1	0.7	-----	153	1.0	0.6	-----
0.35	14	1.5	0.9	-----	18	1.2	0.7	-----	33	1.1	0.7	-----
0.40	4.8	1.6	1.0	-----	4.2	1.3	0.8	-----	8.0	1.3	0.8	-----
0.45	1.8	1.7	1.1	---	1.2	1.4	0.9	-	2.1	1.4	0.9	---
0.50	0.76	1.8	1.1	++	0.41	1.6	1.0	+++	0.65	1.5	1.0	+++
0.55	0.392	1.9	1.2	+++	0.205	1.7	1.1	++++	0.251	1.7	1.1	++++
0.60	0.252	2.1	1.3	++++	0.141	1.9	1.2	++++	0.137	1.9	1.2	++++
0.65	0.189	2.2	1.4	++++	0.113	2.1	1.3	++++	0.099	2.1	1.3	++++
0.70	0.155	2.4	1.5	++++	0.094	2.3	1.5	++++	0.080	2.4	1.5	++++
0.75	0.131	2.6	1.6	++++	0.079	2.6	1.7	++++	0.068	2.7	1.7	++++
0.80	0.111	2.8	1.8	++++	0.065	3.0	1.9	++++	0.056	3.1	2.0	++++
0.85	0.090	3.2	2.0	+++++	0.051	3.5	2.2	+++++	0.046	3.7	2.3	++++
0.90	0.069	3.7	2.3	+++++	0.037	4.4	2.8	+++++	0.034	4.7	3.0	++++
0.95	0.045	4.7	2.9	+++++	0.022	6.2	3.9	+++++	0.022	6.9	4.3	++++
0.99	0.018	7.9	5.0	+++++	0.007	13.2	8.3	+++++	0.008	15.9	10.0	++++

## 【0208】

【表21-1】

表21: huCBE11およびカンプトサール(Cam):組み合わせ指数のシミュレーション:

相互に排反しない(完全に独立した)作用様式

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	Cam			huCBE11	Cam			huCBE11	Cam	
13日目												
0.02	29	0.8	0.5	----	29600	0.07	0.05	----	3.5E+06	0.05	0.03	----
0.05	10	1.6	1.0	----	622	0.2	0.1	----	40600	0.1	0.1	----
0.10	4.7	2.5	1.6	----	30	0.3	0.2	----	1212	0.2	0.1	----
0.15	3.04	3.4	2.2	---	4.9	0.5	0.3	----	138	0.3	0.2	----
0.20	2.20	4.3	2.7	---	1.50	0.7	0.5	---	27	0.4	0.2	----
0.25	1.69	5.2	3.3	---	0.749	1.0	0.6	++	7.2	0.4	0.3	----
0.30	1.35	6.1	3.9	--	0.535	1.2	0.8	+++	2.41	0.5	0.3	---
0.35	1.099	7.1	4.5	±	0.463	1.5	0.9	+++	1.005	0.6	0.4	±
0.40	0.910	8.2	5.2	±	0.436	1.8	1.1	+++	0.544	0.7	0.5	+++
0.45	0.760	9.4	5.9	++	0.425	2.2	1.4	+++	0.380	0.9	0.5	+++
0.50	0.639	11	7	+++	0.420	2.6	1.6	+++	0.318	1.0	0.6	+++
0.55	0.537	12	8	+++	0.419	3.2	2.0	+++	0.295	1.2	0.7	++++
0.60	0.450	14	9	+++	0.418	3.8	2.4	+++	0.286	1.4	0.9	++++
0.65	0.375	16	10	+++	0.418	4.6	2.9	+++	0.283	1.6	1.0	++++
0.70	0.309	19	12	+++	0.418	5.7	3.6	+++	0.283	1.9	1.2	++++
0.75	0.250	22	14	++++	0.418	7.2	4.5	+++	0.283	2.4	1.5	++++
0.80	0.196	26	17	++++	0.418	9.4	5.9	+++	0.284	2.9	1.8	++++
0.85	0.146	33	21	++++	0.419	13	8	+++	0.285	3.8	2.4	++++
0.90	0.099	45	28	+++++	0.419	20	13	+++	0.287	5.4	3.4	++++
0.95	0.053	73	46	+++++	0.420	40	25	+++	0.290	10	6	++++
0.99	0.014	215	135	+++++	0.422	181	114	+++	0.296	34	21	++++
23日目												
					27日目				30日目			
0.02	9.7E+06	0.12	0.07	-----	1.9E+09	0.4	0.2	-----	6.6E+10	0.5	0.3	-----
0.05	1.2E+05	0.2	0.1	-----	9.8E+06	0.5	0.3	-----	1.3E+08	0.7	0.4	-----
0.10	3824	0.3	0.2	-----	156000	0.7	0.4	-----	917000	0.9	0.6	-----
0.15	451	0.4	0.3	-----	12200	0.8	0.5	-----	44600	1.0	0.6	-----
0.20	90	0.5	0.3	-----	1805	0.9	0.6	-----	4615	1.1	0.7	-----
0.25	24	0.6	0.4	-----	374	1.0	0.6	-----	713	1.2	0.8	-----
0.30	7.7	0.7	0.4	----	95	1.1	0.7	-----	140	1.3	0.8	-----
0.35	2.9	0.8	0.5	---	28	1.2	0.8	-----	32	1.4	0.9	-----
0.40	1.23	0.9	0.5	--	8.9	1.3	0.8	----	8.4	1.5	1.0	-----
0.45	0.629	1.0	0.6	+++	3.1	1.4	0.9	---	2.4	1.6	1.0	---
0.50	0.395	1.1	0.7	+++	1.24	1.5	1.0	--	0.85	1.8	1.1	++
0.55	0.299	1.2	0.8	++++	0.593	1.6	1.0	+++	0.401	1.9	1.2	+++
0.60	0.257	1.4	0.9	++++	0.359	1.8	1.1	+++	0.259	2.0	1.3	++++
0.65	0.237	1.5	1.0	++++	0.265	1.9	1.2	++++	0.205	2.1	1.3	++++
0.70	0.225	1.7	1.1	++++	0.221	2.1	1.3	++++	0.176	2.3	1.4	++++
0.75	0.216	2.0	1.3	++++	0.192	2.3	1.4	++++	0.153	2.5	1.6	++++
0.80	0.208	2.4	1.5	++++	0.168	2.5	1.6	++++	0.132	2.7	1.7	++++
0.85	0.199	2.9	1.8	++++	0.145	2.8	1.8	++++	0.111	3.0	1.9	++++
0.90	0.188	3.8	2.4	++++	0.119	3.4	2.1	++++	0.088	3.5	2.2	+++++
0.95	0.172	5.7	3.6	++++	0.087	4.4	2.8	+++++	0.061	4.4	2.8	+++++
0.99	0.141	15	9	++++	0.043	8.0	5.1	+++++	0.027	7.5	4.7	+++++

【0209】

## 【表21-2】

表21: huCBE11およびカンプトサール(Cam):組み合わせ指数のシミュレーション:

相互に排反しない (完全に独立した) 作用様式 (続き)

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	Cam			huCBE11	Cam			huCBE11	Cam	
34日目				37日目				41日目				
0.02	1.8E+09	0.5	0.3	----	4.1E+11	0.3	0.2	----	2.9E+11	0.2	0.1	----
0.05	8.0E+06	0.7	0.4	----	3.9E+08	0.4	0.3	----	3.6E+08	0.3	0.2	----
0.10	1.2E+05	0.9	0.6	----	1.7E+06	0.6	0.4	----	2.0E+06	0.5	0.3	----
0.15	8938	1.0	0.7	----	61000	0.7	0.4	----	81800	0.6	0.4	----
0.20	1293	1.2	0.7	----	5060	0.8	0.5	----	7463	0.8	0.5	----
0.25	264	1.3	0.8	----	654	1.0	0.6	----	1039	0.9	0.6	----
0.30	66	1.4	0.9	----	110	1.1	0.7	----	187	1.0	0.6	----
0.35	19	1.5	0.9	----	22	1.2	0.7	----	39	1.1	0.7	----
0.40	6.1	1.6	1.0	----	5.1	1.3	0.8	----	9.3	1.3	0.8	----
0.45	2.2	1.7	1.1	---	1.3	1.4	0.9	--	2.4	1.4	0.9	---
0.50	0.88	1.8	1.1	+	0.45	1.6	1.0	+++	0.72	1.5	1.0	++
0.55	0.430	1.9	1.2	+++	0.214	1.7	1.1	+++	0.267	1.7	1.1	++++
0.60	0.263	2.1	1.3	++++	0.143	1.9	1.2	++++	0.141	1.9	1.2	++++
0.65	0.193	2.2	1.4	++++	0.113	2.1	1.3	++++	0.099	2.1	1.3	+++++
0.70	0.156	2.4	1.5	++++	0.094	2.3	1.5	+++++	0.081	2.4	1.5	+++++
0.75	0.132	2.6	1.6	++++	0.079	2.6	1.7	+++++	0.068	2.7	1.7	+++++
0.80	0.111	2.8	1.8	++++	0.065	3.0	1.9	+++++	0.056	3.1	2.0	+++++
0.85	0.090	3.2	2.0	+++++	0.051	3.5	2.2	+++++	0.046	3.7	2.3	+++++
0.90	0.069	3.7	2.3	+++++	0.037	4.4	2.8	+++++	0.034	4.7	3.0	+++++
0.95	0.045	4.7	2.9	+++++	0.022	6.2	3.9	+++++	0.022	6.9	4.3	+++++
0.99	0.018	7.9	5.0	+++++	0.007	13.2	8.3	+++++	0.008	15.9	10.0	+++++

要するに、KM-20L2ヒト結腸直腸腺癌を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスにおけるLT受容体活性化mAbであるhuCBE11と化学療法剤であるカンプトサールとの組み合わせ処置により、huCBE11投与のみおよびカンプトサール投与のみと比較して有意に改善された結果が認められた。特に、huCBE11およびカンプトサールを使用した固定された比1:0.63 (mg/kg huCBE11 : mg/kg カンプトサール)での組み合わせ処置の効果は、同一の化合物を使用したWidrマウスモデルについての組み合わせ分析の結果と類似しており、組み合わせ指数分析によって協力性であると判断された。

## 【0210】

(実施例4: ヌクレオシドアナログである化学療法剤と組み合わせたLT-Rアゴニストの抗腫瘍効果)

(A. Widr異種移植片マウスモデルにおけるhuCBE11/ゲムシタビン併用療法の抗腫瘍効果)

huCBE11と組み合わせたヌクレオシドアナログ化学療法剤(例えば、ゲムシタビン)の投与によって相乗的(例えば、協力性)抗腫瘍活性が得られるかどうかを決定するために、Widrマウスモデルを使用してhuCBE11と組み合わせてゲムシタビンを投与した。

## 【0211】

ゲムシタビンおよびhuCBE11の組み合わせ抗腫瘍効果の研究のための適切なゲムシタビン用量を決定するために、用量範囲決定研究を行った。4つのゲムシタビン群(140、100、50、および25mg/kg)および生理食塩水コントロール群の平均(±平均の標準誤差(SEM))腫瘍重量を、一連の投与研究にわたって測定した(0~42日目)。移植による腫瘍獲得率(tumor take rate)は98%を超え、処置を開始するために狭いサイズ範囲の56頭のマウスを選択した。ゲムシタビン140mg/kg群(P=0.001)、100mg/kg群(P=0.0002)、50mg

/ kg 群 (  $P = 0.008$  ) 、および 25 mg / kg 群 (  $P = 0.006$  ) において、生理食塩水コントロール群と比較して 42 日目に腫瘍成長の有意な阻害が認められた。これらの用量群において、11 日目～14 日目までに最初に抑制が明らかとなった。従って、研究したゲムシタビンの全ての用量 ( 140、100、50、および 25 mg / kg ) は、予め確立された Wi Dr ヒト結腸直腸腫瘍を有する胸腺欠損ヌードマウスにおいて、生理食塩水コントロールと比較して腫瘍成長を有意に (  $P = 0.01$  ) 抑制した。

#### 【 0212 】

個別の研究では、50、25、12.5、および 6.25 mg / kg のゲムシタビン用量の効果を試験した。移植による腫瘍獲得率は 100 % であり、処置を開始するために狭いサイズ範囲の 180 頭のマウスを選択した。ゲムシタビン 50 mg / kg 群 (  $P < 0.001$  ) 、25 mg / kg 群 (  $P < 0.001$  ) 、および 6.25 mg / kg 群 (  $P < 0.05$  ) において、ビヒクルコントロール群と比較して 41 日目 ( 研究終了時 ) に腫瘍成長の有意な阻害が認められた。これらの用量群において、10 日目まで抑制が明らかであった。12.5 mg / kg 群においては、41 日目で有意な抑制は認められなかった。ゲムシタビン 50 mg / kg 群の 17 日目～28 日目ならびにゲムシタビン 25 mg / kg 群の 21 日目および 28 日日の T / C 率は 42 % という低さであった。これらの測定点とは別に、ゲムシタビンのみの投与の応答では、National Cancer Institute ( NCI ) の活性基準 ( 42 % またはそれ未満の試験 / コントロール率 ( T / C 率 ) ) を超えず、試験した全てのゲムシタビン処置は、41 日目 ( 研究終了時 ) で NCI ガイドラインによって不活性であると見なされた。要するに、50 mg / kg ～ 6.25 mg / kg のゲムシタビン用量は、NCI 活性基準 ( 42 % またはそれ未満の T / C 率 ) に基づいて 41 日目の第 2 の研究終了時に Wi Dr モデルにおいて不活性であると判断された。ゲムシタビン 50 mg / kg 群 (  $P < 0.001$  ) 、25 mg / kg 群 (  $P < 0.001$  ) 、および 6.25 mg / kg 群 (  $P < 0.05$  ) において、生理食塩水コントロール群と比較して 41 日目に腫瘍成長の有意な阻害が認められた。

#### 【 0213 】

並行研究では、Wi Dr ヒト結腸直腸腺癌異種移植片モデルにおいて huCBE11 活性も試験した。漸増用量 ( 5、50、および 100  $\mu$ g ) のゲムシタビンを投与した 3 つの群および生理食塩水群を、抗腫瘍活性についてアッセイした。腫瘍成長は、ビヒクルコントロール群と比較して huCBE11 50  $\mu$ g 群および 100  $\mu$ g 群で 41 日目で有意に (  $P < 0.001$  ) 減少した。この減少は、14 日目まで明らかであった。huCBE11 5  $\mu$ g での処置は、腫瘍成長を有意に抑制しなかった。T / C 率は、huCBE11 100  $\mu$ g では 41 日目に 40.0 % に低下し、50  $\mu$ g 群では 41 日目に 43.5 % という低さであった。従って、NCI 活性基準 ( 42 % またはそれ未満の T / C 率 ) に基づいて、Wi Dr モデルにおいて huCBE11 100  $\mu$ g は活性であると判断された。

#### 【 0214 】

Wi Dr ヒト結腸直腸腺癌異種移植片モデルにおける huCBE11 とゲムシタビンとの組み合わせ抗腫瘍効果も試験した。huCBE11 100  $\mu$ g とゲムシタビン 25 mg / kg または 12.5 mg / kg との組み合わせ処置 ( 図 2 ) は、huCBE11 100  $\mu$ g のみと比較して 41 日目に胸腺欠損ヌードマウスにおいて腫瘍成長を有意に (  $P < 0.01$  ) 抑制した。huCBE11 50  $\mu$ g とゲムシタビン 25 mg / kg または 12.5 mg / kg との組み合わせ処置は、huCBE11 50  $\mu$ g のみと比較して腫瘍成長を有意に ( それぞれ  $P < 0.01$  および  $P < 0.05$  ) 抑制した。この抑制は、2 つの用量の huCBE11 および全ての用量のゲムシタビンの投与後、17 日目までに全ての群で一貫して明らかであった。この結果は、研究を通して持続した。全てのこれらの huCBE11 およびゲムシタビン組み合わせ群における 17 日目または 21 日目から 41 日目までの T / C 率は 42 % 未満であった。41 日目に最も低い T / C 率が認められた ( 全用量群範囲で 20.1 ～ 26.8 % ) 。

#### 【 0215 】

さらに、88 µg / 50 mg / kg (P < 0.05)、44 µg / 25 mg / kg (P < 0.05)、22 µg / 12.5 mg / kg (P < 0.01)、11 µg / 6.25 mg / kg (P = 0.01)のhuCBE11とゲムシタビンの組み合わせ群において、研究終了時に腫瘍成長の有意な阻害が認められた。この阻害は、14日目と17日目との間で明らかとなった。huCBE11 88 µgとゲムシタビン 50 mg / kgとの群 (19.6%という低さ)ならびにhuCBE11 44 µgとゲムシタビン 25 mg / kgとの群 (24.5%という低さ)における14日目または17日目から41日目までのT/C率は42%未満であった。huCBE11 22 µgとゲムシタビン 12.5 mg / kgとの群 (37.9%という低さ)における28日目から41日目までのT/C率は42%またはそれ未満であった。huCBE11 11 µgおよびゲムシタビン 6.25 mg / kgにおける最も低いT/C率は、41日目の42.6%であった。huCBE11 およびゲムシタビンの最も低い用量の組み合わせのほとんどのT/C率が41日目で42%またはそれ未満であった (用量群の範囲: 20.1% ~ 38.1%)。したがって、huCBE11 およびゲムシタビンの組み合わせ処置は、NCI活性基準 (42%またはそれ未満のT/C率)に基づいて、WiDrモデルで活性であると判断された。

#### 【0216】

huCBE11 およびゲムシタビンが協力性に作用することができるかどうかを試験するために、上記のように腫瘍成長モデルにおいてWiDrヒト結腸腺癌を移植した胸腺欠損ヌードマウスを使用して相乗作用研究を行った。これらのhuCBE11 + ゲムシタビン組み合わせ研究のために、50、25、12.5、および6.25 mg / kgの用量のゲムシタビンならびに100、88、50、44、22、および11 µgの用量のhuCBE11を選択した。Fa値計算のために使用した全腫瘍データを、28日目にとった。各処置群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって、抗腫瘍有効性を決定した。コントロール群と処置群との間の平均腫瘍体積の相違として平均腫瘍体積の減少を計算した。腫瘍体積の抑制率 (影響率 (Fa)) を、処置群の平均腫瘍体積の減少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって計算した。1.000のFaは、腫瘍の完全な抑制を示す。表22は、個別の処置および組み合わせ処置の用量 - 効果の関係を示す。次いで、得られたFa値を、huCBE11とゲムシタビンとの組み合わせ処置についての協力作用の評価に使用した。

#### 【0217】

#### 【表22】

表22: ゲムシタビンおよびhuCBE11の個別処置および組み合わせ処置についての  
用量 - 効果の関係

処置	用量	単位	同時処置	用量	単位	腫瘍体積	体積の減少	Fa
コントロール						803.2	0.0	0.000
ゲムシタビン	6.25	mg/kg				545.6	257.6	0.321
ゲムシタビン	12.5	mg/kg				479.5	323.7	0.403
ゲムシタビン	25	mg/kg				318.9	484.3	0.603
ゲムシタビン	50	mg/kg				326.0	477.2	0.594
huCBE11	5	µg				688.4	114.8	0.143
huCBE11	50	µg				448.0	355.2	0.442
huCBE11	100	µg				386.1	417.1	0.519
huCBE11	11	µg	ゲムシタビン	6.25	mg/kg	342.7	460.5	0.573
huCBE11	22	µg	ゲムシタビン	12.5	mg/kg	304.5	498.7	0.621
huCBE11	44	µg	ゲムシタビン	25	mg/kg	196.9	606.3	0.755
huCBE11	88	µg	ゲムシタビン	50	mg/kg	157.8	645.4	0.804
huCBE11	50	µg	ゲムシタビン	12.5	mg/kg	206.9	596.3	0.742
huCBE11	50	µg	ゲムシタビン	25	mg/kg	171.8	631.4	0.786
huCBE11	100	µg	ゲムシタビン	12.5	mg/kg	217.0	586.2	0.730
huCBE11	100	µg	ゲムシタビン	25	mg/kg	196.5	606.7	0.755

これらの組み合わせ処置研究から得た腫瘍重量データを使用して、huCBE11とゲ

ムシタビンとの組み合わせがその作用様式で協力性であるかどうかを決定するために、統計的比較を行った。ゲムシタビンのみでのWiDr腫瘍を保有するマウスの処置により用量応答抗腫瘍有効性が得られるので、組み合わせ指数(CI)の計算によってhuCBE11+ゲムシタビン組み合わせの協力作用を正式に評価することができた(Chou, 1984)。協力作用の正式な評価には、Windowsベースの用量-効果分析のためのCalcuSyn V1.1(Biosoft, Cambridge UK)ソフトウェアを使用した組み合わせ指数(C.I.)の計算を使用した。上記のように、組み合わせで投与した処置について、C.I.=1は累加有効性を示す。C.I.<1は協力作用を示す。C.I.>1は拮抗作用を示す。本研究における協力性薬物作用の評価に使用した用量の固定された比は0.568:1(mg/kgゲムシタビン:μg huCBE11)であった。この比は、以前のバイロット研究で決定した2つの薬剤についての中央値効果用量の比を基本としていた。協力作用の正式な評価には、Windowsベースの用量効果分析のためのCalcuSyn V1.1(Biosoft, Cambridge UK)ソフトウェアを使用した組み合わせ指数(CI)の計算を使用した。組み合わせで投与した処置について、CI=1は累加有効性を示した。1未満のCIは協力作用を示した。1を超えるCIは拮抗作用を示した。CI計算で使用した用量-効果関係を、表23に示す。

【0218】

【表23】

表23: 協力作用計算のためのhuCBE11およびゲムシタビンの用量-効果の関係

個別投与				組み合わせ(0.568:1)		
ゲムシタビン 用量 (mg/kg)	影響率	huCBE11 用量 (μg)	影響率	ゲムシタビン 用量 (mg/kg)	huCBE11 用量 (μg)	影響率
6.25	0.321	5	0.143	6.25	11	0.573
12.5	0.403	50	0.442	12.5	22	0.621
25	0.603	100	0.519	25	44	0.755
				50	88	0.804

ゲムシタビンおよびhuCBE11の個別の処置および組み合わせ処置についての用量-応答関係の強さおよび形状を、それぞれ表24および25に示す。この研究で使用された正確な実験用量レベルのために計算したCI値を、表26に示す。

【0219】

本研究は完全に独立した作用様式を有すると考えられる薬物を使用するので、相互に排反しないCI値をたいてい適用した。6.25mg/kg ゲムシタビン+11.0μg huCBE11、12.5mg/kg ゲムシタビン+22.0μg huCBE11、および50mg/kg ゲムシタビン+88.0μg huCBE11の組み合わせの用量は、協力効果を示した。組み合わせの用量レベル範囲を超えるCIのシミュレーションを表27に示し、CIによって示した協力作用または拮抗作用の程度の全解釈を表3に示す。0.005mg/kg ゲムシタビン+0.008μg huCBE11(腫瘍体積が2%抑制される)から85mg/kg ゲムシタビン+150μg huCBE11(腫瘍体積が85%抑制される)までの範囲の組み合わせ用量が協力効果を示した。したがって、ゲムシタビン:huCBE11の固定された比が0.568:1の組み合わせ処置は協力性抗腫瘍有効性を示した。影響率の関数としてのCIを、図11に示す。

【0220】

## 【表24】

表 24: 協力作用の決定: huCBE11 およびゲムシタピンの協力作用についての

効果用量中央値

薬剤	用量 単位	効果用量中央値 (95% 信頼区間 )	
		個別投与	組み合わせ (0.568:1)
ゲムシタピン	mg/kg	16.7	4.2
		(12.6 – 22.0)	(2.6 – 6.6)
huCBE11	μg	81.1	7.3
		(65.2 – 100.8)	(4.6 – 11.6)

## 【0221】

## 【表25】

表 25: 協力作用の決定: 個別処置および組み合わせ処置についての用量 – 応答曲線の特徴

値	勾配	Y- 切片	R
ゲムシタピン			
平均	0.842	-1.028	0.9756
SEM	0.189	0.213	
huCBE11			
平均	0.636	-1.215	0.9977
SEM	0.043	0.068	
ゲムシタピン + huCBE11			
平均	0.575	-0.356	0.9804
SEM	0.082	0.106	

## 【0222】

## 【表26】

表 26: 協力作用の決定: huCBE11 + ゲムシタピン処置から得られた

実験値についての計算された組み合わせ指数

ゲムシタピン 用量 (mg/kg)	huCBE11 用量 (μg)	影響率	作用機構			
			相互排反		排反しない	
			CI	協力作用	CI	協力作用
6.25	11	0.573	0.350	+++	0.373	+++
12.5	22	0.621	0.543	+++	0.595	+++
25	44	0.755	0.487	+++	0.524	+++
50	88	0.804	0.680	+++	0.746	++

++ 中程度の協力作用  
+++ 協力作用

## 【0223】

【表27】

表27: 協力作用の決定:組み合わせ指数(CI)のシミュレーション

Fa	CI	ゲムシタビン (mg/kg)	huCBE11 (μg)	記号
相互排反作用機構				
0.02	0.076	0.005	0.008	+++++
0.05	0.104	0.025	0.044	++++
0.10	0.137	0.091	0.160	++++
0.15	0.163	0.2	0.4	++++
0.20	0.188	0.4	0.7	++++
0.25	0.211	0.6	1.1	++++
0.30	0.235	1.0	1.7	++++
0.35	0.259	1.4	2.5	++++
0.40	0.284	2.1	3.6	++++
0.45	0.311	2.9	5.2	+++
0.50	0.340	4.2	7.3	+++
0.55	0.373	5.9	10.4	++
0.60	0.409	8.4	14.8	++
0.65	0.452	12.2	21.5	++
0.70	0.503	18.2	32.0	++
0.75	0.567	28.2	49.5	++
0.80	0.652	46.4	81.7	++
0.85	0.773	85.1	149.8	+
0.90	0.972	190.4	335.1	±
0.95	1.419	698.6	1229.6	--
0.99	3.357	12347.0	21731.0	----
排反しない (完全に独立した作用様式)				
0.02	0.077	0.005	0.008	+++++
0.05	0.107	0.025	0.044	++++
0.10	0.141	0.091	0.160	++++
0.15	0.170	0.2	0.4	++++
0.20	0.196	0.4	0.7	++++
0.25	0.222	0.6	1.1	++++
0.30	0.247	1.0	1.7	++++
0.35	0.273	1.4	2.5	++++
0.40	0.301	2.1	3.6	+++
0.45	0.331	2.9	5.2	+++
0.50	0.363	4.2	7.3	++
0.55	0.399	5.9	10.4	++
0.60	0.440	8.4	14.8	++
0.65	0.487	12.2	21.5	++
0.70	0.545	18.2	32.0	++
0.75	0.617	28.2	49.5	++
0.80	0.713	46.4	81.7	+
0.85	0.851	85.1	149.8	+
0.90	1.082	190.4	335.1	±
0.95	1.608	698.6	1229.6	--
0.99	3.977	12347.0	21731.0	----

本研究で薬物の増強を評価するために使用した用量は、固定された比の組み合わせに制限されなかった。統計的に有意な増強の試験には、各動物のFaの計算が必要であった。各腫瘍体積(表43)を使用して、各動物の腫瘍体積の抑制率(Fa)を計算した(表44)。(コントロール群の平均腫瘍体積 - 個別の動物の腫瘍体積) ÷ コントロール群の平均腫瘍体積としてFaを計算した。組み合わせ処置についての予想される累加Faを、組み合わせのいずれかの成分を投与した群由来の平均Faの合計であると解釈した。組み合わせ処置の実際の効果と処置が単に累加であると予想される効果との間の相違も計算した(表44)。両側1標本t検定を使用して、組み合わせ処置により予想される累加値と統計的に有意に異なる平均Faが得られるかどうかを決定した(表44)。

【0224】

本研究は完全に独立した作用様式を有すると考えられる薬物を使用するので、相互に排反しないC.I.値をたいてい適用した。 6.25 mg / kg ゲムシタビン + 11 µg huCBE11、12.5 mg / kg ゲムシタビン + 22 µg huCBE11、25 mg / kg ゲムシタビン + 44 µg huCBE11、および 50 mg / kg ゲムシタビン + 88 µg huCBE11 の組み合わせ用量は、協力効果を示した。0.005 mg / kg ゲムシタビン + 0.008 µg huCBE11 (腫瘍体積が 2% 抑制される) から 85 mg / kg ゲムシタビン + 150 µg huCBE11 (腫瘍体積が 85% 抑制される) までの範囲の組み合わせ用量が協力効果を示した。C.I. によって示した協力作用または拮抗作用の程度の全解釈を表15に示す。50 または 100 µg の用量の huCBE11 と組み合わせた場合、12.5 または 25 mg / kg のゲムシタビンにより、累加未満の統計的に有意な効果が得られた (表44)。

【0225】

## 【表43-1】

表43: 各腫瘍体積

コントロール	ゲムシタピン 6.25	ゲムシタピン 12.5	ゲムシタピン 25	ゲムシタピン 50	hCBE 50	hCBE 100	hCBE 50 + ゲムシタピン 12.5	hCBE 50 + ゲムシタピン 25	hCBE 100 + ゲムシタピン 12.5	hCBE 100 + ゲムシタピン 25
854.1	777.9	295.5	238.8	181.8	606.1	356.8	335.7	232.2	392.7	263.8
1407.4	354.4	849.7	354.3	274.1	138.7	222.4	124.5	29.9	349.0	244.8
596.7	415.6	367.1	288.2	468.6	352.2	310.4	227.7	95.0	140.7	200.5
591.4	291.2	344.8	258.5	319.6	428.2	197.9	323.1	50.8	177.0	208.4
722.9	372.2	802.2	352.8	151.2	363.5	972.2	85.2	131.3	140.0	196.2
660.7	354.5	382.6	275.7	203.1	350.4	449.1	217.1	323.9	250.2	211.8
1084.2	460.8	409.5	450.0	400.1	431.3	329.2	194.2	275.5	198.4	167.2
856.5	1251.7	459.9	397.8	446.1	437.1	324.7	222.5	160.9	223.4	100.7
806.3	469.1	418.6	342.6	370.9	521.8	442.5	219.1	149.0	133.7	138.3
1860.8	708.9	465.3	230.9	444.1	851.1	255.6	120.6	270.1	165.1	233.8
818.6										
1250.8										
682.8										
815.7										
574.9										
576.4										
1034.9										
612.3										
829.1										
835.0										
511.6										
503.7										
613.1										

【0226】

【表43-2】

686.0											
305.0											
1004.2											
708.0											
967.9											
600.8											
724.3											
平均:	803.2	545.6	479.5	319.0	326.0	448.0	386.1	207.0	171.8	217.0	196.5

【0227】

【表44】

表44: 腫瘍体積の各抑制率

ゲムシタピン 6.25	ゲムシタピン 12.5	ゲムシタピン 25	ゲムシタピン 50	hCBE 50	hCBE 100	hCBE 50 + ゲムシタピン 12.5	hCBE 50 + ゲムシタピン 25	hCBE 100 + ゲムシタピン 12.5	hCBE 100 + ゲムシタピン 25	
0.032	0.632	0.703	0.774	0.245	0.556	0.582	0.711	0.511	0.672	
0.559	-0.058	0.559	0.659	0.827	0.723	0.845	0.963	0.566	0.695	
0.483	0.543	0.641	0.417	0.562	0.614	0.717	0.882	0.825	0.750	
0.637	0.571	0.678	0.602	0.467	0.754	0.598	0.937	0.780	0.741	
0.537	0.001	0.561	0.812	0.547	-0.210	0.894	0.837	0.826	0.756	
0.559	0.524	0.657	0.747	0.564	0.441	0.730	0.597	0.688	0.736	
0.426	0.490	0.440	0.502	0.463	0.590	0.758	0.657	0.753	0.792	
-0.558	0.427	0.505	0.445	0.456	0.596	0.723	0.800	0.722	0.875	
0.416	0.479	0.574	0.538	0.350	0.449	0.727	0.815	0.834	0.828	
0.117	0.421	0.712	0.447	-0.060	0.682	0.850	0.664	0.794	0.709	
平均:	0.321	0.403	0.603	0.594	0.442	0.519	0.742	0.786	0.730	0.755
累加:							0.845	1.045	0.922	1.122
相違:							-0.103	-0.259	-0.193	-0.367
	両側一標本 t 検定									
T 値 :							-3.186	-6.563	-5.425	-18.783
DF:							9	9	9	9
P 値 :							0.0111	0.0001	0.0004	<0.0001

要するに、WiDrヒト結腸直腸腺癌を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスにおけるL-T受容体活性化mAbであるhUCBE11と化学療法剤であるゲムシタピンとの組み

合わせ処置により、低濃度の huCBE11 およびゲムシタビンで協力性であると判断される huCBE11 とゲムシタビンの組み合わせ処置の効果が示された。

【0228】

(B.KM-20L2マウスモデルを使用した huCBE11 とゲムシタビンとの組み合わせの抗腫瘍効果)

huCBE11 と組み合わせたヌクレオシドアナログ化学療法剤（例えば、ゲムシタビン）の投与によって相乗的（例えば、増強または協力性）抗腫瘍活性を示すかどうかを決定するために、さらなるヒト結腸直腸腺癌マウスモデル系である KM-20L2 モデルも使用した。

【0229】

ゲムシタビンと huCBE11 との組み合わせ抗腫瘍効果の研究のための適切なゲムシタビンおよび huCBE11 の用量を決定するために、最初に用量範囲決定研究を行った。25 mg / kg から 140 mg / kg までの漸増用量のゲムシタビンを、KM-20L2 腫瘍細胞を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスに投与した（0 日目）。移植による腫瘍獲得率は 100 % であり、処置を開始するために狭いサイズ範囲の 110 頭のマウスを選択した。生理食塩水コントロール群と比較して、10 日目から研究最終日の 41 日目までに、140 mg / kg (10 日目に  $P < 0.05$  ; 14 日目～41 日目に  $P < 0.001$  )、100 mg / kg (10 日目に  $P < 0.05$  ; 14 日目～41 日目に  $P < 0.001$  )、50 mg / kg (10 日目～41 日目に  $P < 0.001$  )、および 25 mg / kg (19 日目および 41 日目に  $P < 0.01$  ; 14 日目～37 日目に  $P < 0.001$  ) のゲムシタビン群で統計的に有意な腫瘍成長の抑制が認められた。14 日目または 17 日目の T / C 率は 42 % またはそれ未満であり、140 mg / kg、100 mg / kg、および 50 mg / kg のゲムシタビン群での研究期間中この比率を維持した。25 mg / kg のゲムシタビン群の T / C 率は 17 日目に 42 % またはそれ未満であり、31 日目までこの比率を維持した。個別の研究では、KM-20L2 ヒト腺癌異種移植片モデルにおける抗腫瘍活性について、5、10、20 mg / kg のゲムシタビン用量を試験した。移植による腫瘍獲得率は 100 % であり、処置を開始するために狭いサイズ範囲の 129 頭のマウスを選択した。ビヒクルコントロール群における腫瘍成長は、十分にこのモデルを使用して本研究所で認められた典型的な範囲内であった。ビヒクルコントロール群と比較して、ゲムシタビン群 (20 mg / kg では 13 日目～55 日目 (13 日目～47 日目に  $P < 0.001$  、50 日目～55 日目に  $P < 0.01$  )、10 mg / kg では 16 日目～55 日目 (16 日目～50 日目に  $P < 0.01$  、55 日目に  $P < 0.05$  )、5 mg / kg では 13 日目～43 日目 (20 日目～23 日目に  $P < 0.01$  、13 日目～16 日目および 27 日目～43 日目に  $P < 0.05$  ) ) で有意な腫瘍成長の抑制が認められた。16 日目の T / C 率は 42 % またはそれ未満であり、20 mg / kg のゲムシタビン群で 34 日間この比率を維持した。したがって、ゲムシタビンは、NCI の活性基準 (42 % またはそれ未満の T / C 率) に基づいて、KM-20L2 腫瘍モデルにおいて活性であると判断された。

【0230】

並行用量範囲決定研究では、KM-20L2 ヒト腺癌異種移植片モデルにおける huCBE11 の活性を試験した。0.2、2、4、および 20 mg / kg の huCBE11 を投与した。移植による腫瘍獲得率は 99.5 % であり、処置を開始するために狭いサイズ範囲の 110 頭のマウスを選択した。ビヒクルコントロール群と比較して、2 mg / kg (28 日目～33 日目) および 4 mg / kg (21 日目～28 日目) の用量の huCBE11 群で腫瘍成長が有意に ( $P < 0.05$ ) 減少した。これらの用量群の最も低い T / C 率は 42 % を超えた。個別の研究では、0.2、2、および 4 mg / kg の用量のゲムシタビン群を、KM-20L2 モデルマウスに投与した。これらのマウスのために、ビヒクルコントロール群と比較して、20 日目～55 日目に 4 mg / kg (20 日目～23 日目で  $P < 0.01$  ; 27～55 日目で  $P < 0.001$  ) および 2 mg / kg (20 日目～23 日目で  $P < 0.01$  ; 27～55 日目で  $P < 0.001$  ) の huCBE11 群で腫瘍成

長が有意に減少した。T/C率は、4mg/kgのh u C B E 1 1群では50日目および55日目ならびに2mg/kgのh u C B E 1 1では41日目～55日目で42%またはそれ未満であった。したがって、h u C B E 1 1は、NCIの活性基準(42%またはそれ未満のT/C率)に基づいて、K M - 2 0 L 2腫瘍モデルにおいて活性であると判断された。

### 【0231】

h u C B E 1 1およびゲムシタビンの組み合わせ効果も試験した。コホート動物を、7日目から開始する単一の薬剤として以下の同一の投与計画を使用して処置した：生理食塩水コントロール(0.9%滅菌生理食塩水)、漸減量のゲムシタビン(20、10、5mg/kg)、漸減量のh u C B E 1 1(4、2、および0.2mg/kg)、またはh u C B E 1 1とゲムシタビンとの組み合わせ用量(4mg/kg h u C B E 1 1 + 20mg/kgゲムシタビン、0.2mg/kg h u C B E 1 1 + 20mg/kgゲムシタビン、0.2mg/kg h u C B E 1 1 + 10mg/kgゲムシタビン、4mg/kg h u C B E 1 1 + 10mg/kgゲムシタビン、および20mg/kg h u C B E 1 1 + 25mg/kgゲムシタビン)。腫瘍の長さが平均して5ミリメートル(mm)および幅が5mmに到達した場合、全ての処置を開始した。h u C B E 1 1 4mg/kgとゲムシタビン20mg/kgとの組み合わせ処置は、h u C B E 1 1 4mg/kgのみと比較して、10日目～55日目に腫瘍成長を有意に抑制した(10日目にP < 0.01; 13～55日目にP < 0.001)(図12)。この用量群のT/C率は、16日目から55日目までは42%またはそれ未満であり、37日目に13.6%という低さであった。h u C B E 1 1 4mg/kgとゲムシタビン10mg/kgとの組み合わせ処置は、h u C B E 1 1 4mg/kgのみと比較して、13日目～55日目に腫瘍成長を有意に抑制した(16日目～50日目にP < 0.001; 13日目および55日目にP < 0.01)。この用量群のT/C率は、20日目～55日目までは42%またはそれ未満であり、15.8%という低さであった。h u C B E 1 1 0.2mg/kgとゲムシタビン20mg/kgとの組み合わせ処置は、ゲムシタビン20mg/kgのみと比較して、27日目～55日目に腫瘍成長を有意に抑制した(27日目、37日目、および43日目にP < 0.05; 30日目～34日目、41日目、47～55日目にP < 0.01)。この用量群のT/C率は、16日目から55日目までは42%またはそれ未満であり、30日目に19.8%という低さであった。

h u C B E 1 1 0.2mg/kgとゲムシタビン10mg/kgとの組み合わせ処置は、ゲムシタビン10mg/kgのみと比較して、腫瘍成長を有意に抑制せず、T/C率は、いかなる期間においても42%またはそれ未満であった。h u C B E 1 1 4mg/kgとゲムシタビン5mg/kgとの組み合わせ処置は、h u C B E 1 1 4mg/kgのみと比較して、9日目～43日目、55日目に腫瘍成長を有意に抑制した(9日目、41日目、43日目、および55日目にP < 0.05; 13日目、20日目、27日目、34日目、および37日目にP < 0.01; 16日目、23日目、および30日目にP < 0.001)。この用量群のT/C率は、20日目～55日目に42%またはそれ未満であり、37日目に25.6%という低さであった。腫瘍成長の抑制についてh u C B E 1 1 8mg/kgおよびゲムシタビン10mg/kgとh u C B E 1 1 8mg/kgとの比較またはh u C B E 1 1 20mg/kgおよびゲムシタビン25mg/kgとh u C B E 1 1 20mg/kgとの比較は不可能であるが、これらの群で認められたT/C率は、16日目～55日目で42%またはそれ未満であった。要するに、h u C B E 1 1およびゲムシタビンの上記6つの組み合わせ処置は、NCIの活性基準(42%またはそれ未満のT/C率)に基づいて、K M - 2 0 L 2腫瘍モデルにおいて活性であると判断された。これらの6つのh u C B E 1 1 + ゲムシタビン併用療法はそれぞれ腫瘍成長を統計的に有意に減少させた。

### 【0232】

これらの組み合わせ処置研究から得た腫瘍重量データを使用して、h u C B E 1 1とゲムシタビンとの組み合わせがその作用様式で協力性であるかどうかを決定するための統計

的比較を行った。ゲムシタピンまたはh u C B E 1 1 のみでのK M - 2 0 L 2 腫瘍保有マウスの処置は用量応答抗腫瘍有効性を示したので、組み合わせ指数(C I)(C h o u, 1 9 8 4)の計算によってh u C B E 1 1 + ゲムシタピン組み合わせの協力作用を正式に評価することができた。

【0 2 3 3】

h u C B E 1 1 およびゲムシタピンの組み合わせ投与を使用して相乗効果が得られるかどうかを評価することができるために、各処置群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって抗腫瘍有効性を最初に決定した。コントロール群と処置群の間の平均腫瘍体積の相違として平均腫瘍体積の減少を計算した。腫瘍体積の抑制率(すなわち、影響率(F a))を、処置群の平均腫瘍体積の減少をコントロール群の平均腫瘍体積で割ることによって計算した。1.000のF aは、腫瘍の完全な抑制を示した。本研究における協力性薬物作用の評価に使用した用量の固定された比は4:5(mg/kg ゲムシタピン:μg h u C B E 1 1)であった。この比は、2つの薬剤の中央値効果用量の比に基づく。この比は、以前のパイロット研究で決定した2つの薬剤についての中央値効果用量の比を基本としていた。表28は、個別の処置および組み合わせ処置の用量-効果の関係を示す。

【0 2 3 4】

【表 28-1】

表 28. huCBE11 およびゲムシタビン (Gem) ゲムシタビンおよび huCBE11 の個別処置および組み合わせ処置についての処置および日数による平均腫瘍サイズおよび計算された抑制率

処置	用量 (mg/kg)	同時治療	用量 (mg/kg)	日								
				9	13	16	20	23	27	30	34	37
平均腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )												
ビヒカル				111.8	172.6	265.0	401.0	527.2	668.6	816.2	1050.3	1208.0
Gem	5			101.0	141.8	204.1	276.8	371.6	506.7	616.2	740.4	877.5
Gem	10			102.4	140.9	169.0	231.7	311.2	417.4	499.5	642.3	723.7
Gem	20			105.9	111.0	99.8	101.1	147.3	225.1	322.6	443.0	522.1
huCBE11	0.2			104.8	160.4	250.5	371.9	518.7	673.8	792.1	926.4	1048.5
huCBE11	2			100.3	162.7	233.5	263.7	339.2	388.7	450.1	519.9	580.1
huCBE11	4			125.8	180.9	247.6	278.0	344.3	385.8	480.1	558.9	591.1
huCBE11	0.2	Gem	10	97.2	113.6	143.0	174.5	241.5	348.4	456.2	574.9	689.4
huCBE11	4	Gem	10	106.5	125.6	114.8	106.6	113.3	122.0	135.6	171.1	204.3
huCBE11	0.2	Gem	20	110.8	110.7	107.4	101.7	109.6	138.1	164.5	221.7	272.9
huCBE11	4	Gem	20	97.7	102.2	103.2	101.5	106.4	99.4	127.0	147.4	168.5
huCBE11	4	Gem	5	103.7	130.7	137.4	155.0	160.9	191.7	216.2	279.0	318.0
huCBE11	8	Gem	10	94.8	103.6	98.4	82.0	87.9	98.7	125.3	155.0	199.7
huCBE11	20	Gem	25	99.5	110.9	93.3	77.0	83.5	85.1	96.7	124.2	165.4
												204.8
												264.0

【0235】

【表 28-2】

表 28: huCBE11およびゲムシタビン (Gem) デムシタビンおよびhuCBE11の個別処置および組み合わせ処置についての処置および日数による平均腫瘍サイズおよび計算された抑制率

(続き)

処置	用量 (mg/kg)	同時治療	用量 (mg/kg)	日								平均腫瘍体積減少 (mm <sup>3</sup> )
				9	13	16	20	23	27	30	34	
ビヒクル				0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gem	5			10.8	30.8	60.9	124.2	155.6	161.9	200.0	309.9	330.5
Gem	10			9.4	31.7	96.0	169.3	216.0	251.2	316.7	408.0	484.3
Gem	20			5.9	61.6	165.2	299.9	379.9	443.5	493.6	607.3	685.9
huCBE11	0.2			7.0	12.2	14.5	29.1	8.5	-5.2	24.1	123.9	159.5
huCBE11	2			11.5	9.9	31.5	137.3	188.0	279.9	366.1	530.4	627.9
huCBE11	4			-14.0	-8.3	17.4	123.0	182.9	282.8	336.1	491.4	616.9
huCBE11	0.2	Gem	10	14.6	59.0	122.0	226.5	285.7	320.2	360.0	475.4	518.6
huCBE11	4	Gem	10	5.3	47.0	150.2	294.4	413.9	546.6	680.6	879.2	1003.7
huCBE11	0.2	Gem	20	1.0	61.9	157.6	299.3	417.6	530.5	651.7	828.6	935.1
huCBE11	4	Gem	20	14.1	70.4	161.8	299.5	420.8	569.2	689.2	902.9	1039.5
huCBE11	4	Gem	5	8.1	41.9	127.6	246.0	366.3	476.9	600.0	771.3	890.0
huCBE11	8	Gem	10	17.0	69.0	166.6	319.0	439.3	569.9	690.9	895.3	1008.3
huCBE11	20	Gem	25	12.3	61.7	171.7	324.0	443.7	583.5	719.5	926.1	1042.6

【0236】

## 【表 28-3】

表 28: huCBE11 およびゲムシタビン (Gem) グルタビンおよび huCBE11 の個別処置および組み合わせ処置についての処置および日数による平均腫瘍サイズ および計算された抑制率 (続き)

処置	用量 (mg/kg)	同時治療	用量 (mg/kg)	日								平均影響率 (Fa)
				9	13	16	20	23	27	30	34	
ビヒクル				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Gem	5			0.097	0.178	0.230	0.310	0.295	0.242	0.245	0.295	0.274
Gem	10			0.084	0.184	0.362	0.422	0.410	0.376	0.388	0.388	0.401
Gem	20			0.053	0.357	0.623	0.748	0.721	0.663	0.605	0.578	0.568
huCBE11	0.2			0.063	0.071	0.055	0.073	0.016	-0.008	0.030	0.118	0.132
huCBE11	2			0.103	0.057	0.119	0.342	0.357	0.419	0.449	0.505	0.520
huCBE11	4			-0.125	-0.048	0.066	0.307	0.347	0.423	0.412	0.468	0.511
huCBE11	0.2	Gem	10	0.131	0.342	0.460	0.565	0.542	0.479	0.441	0.453	0.429
huCBE11	4	Gem	10	0.047	0.272	0.567	0.734	0.785	0.818	0.834	0.837	0.831
huCBE11	0.2	Gem	20	0.009	0.359	0.595	0.746	0.792	0.793	0.798	0.789	0.774
huCBE11	4	Gem	20	0.126	0.408	0.611	0.747	0.798	0.851	0.844	0.860	0.861
huCBE11	4	Gem	5	0.072	0.243	0.482	0.613	0.695	0.713	0.735	0.734	0.737
huCBE11	8	Gem	10	0.152	0.400	0.629	0.796	0.833	0.852	0.846	0.852	0.827
huCBE11	20	Gem	25	0.110	0.357	0.648	0.808	0.842	0.873	0.882	0.863	0.858

## 【0237】

【表 28 - 4】

表 28: huCBE11 およびゲムシタビン (Gem) ゲムシタビンおよび huCBE11 の固別処置および組み合わせ処置についての処置および組み合わせ処置における平均影響率/非影響率 (Fa/Fu) および計算された抑制率 (続き)

処置	用量 (mg/kg)	同時治療	用量 (mg/kg)	日								
				9	13	16	20	23	27	30	34	37
平均影響率 / 非影響率 (Fa/Fu)												
ビヒクル				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Gem	5			0.107	0.217	0.298	0.449	0.419	0.320	0.325	0.419	0.377
Gem	10			0.092	0.225	0.568	0.731	0.694	0.602	0.634	0.635	0.669
Gem	20			0.056	0.555	1.655	2.966	2.579	1.970	1.530	1.371	1.314
huCBE11	0.2			0.067	0.076	0.058	0.078	0.016	-0.008	0.030	0.134	0.152
huCBE11	2			0.115	0.061	0.135	0.521	0.554	0.720	0.813	1.020	1.082
huCBE11	4			-0.111	-0.046	0.070	0.442	0.531	0.733	0.700	0.879	1.044
huCBE11	0.2	Gem	10	0.150	0.519	0.853	1.298	1.183	0.919	0.789	0.827	0.752
huCBE11	4	Gem	10	0.050	0.374	1.308	2.762	3.653	4.480	5.019	5.139	4.913
huCBE11	0.2	Gem	20	0.009	0.559	1.467	2.943	3.810	3.841	3.962	3.737	3.427
huCBE11	4	Gem	20	0.144	0.689	1.568	2.951	3.955	5.726	5.427	6.126	6.169
huCBE11	4	Gem	5	0.078	0.321	0.929	1.587	2.277	2.488	2.775	2.765	2.799
huCBE11	8	Gem	10	0.179	0.666	1.693	3.880	4.998	5.774	5.514	5.776	5.049
huCBE11	20	Gem	25	0.124	0.556	1.840	4.208	5.314	6.857	7.441	7.457	6.304
												5.086

Windows (登録商標) ベースの用量効果分析のための CalcuSyn V1.1 (Biosoft, Cambridge UK) ソフトウェアを使用した CI の計算によって、表 28 に示す huCBE11 + ゲムシタビン組み合わせ療法の固定された比のデータによって協力作用を正式に評価した。組み合わせで投与した処置について、CI = 1 は累加有効性を示した。1 未満の CI は協力作用を示した。1 を超える CI は拮抗作用を

示した。

C I 計算で使用した用量 - 効果関係を、表 2 9 に示す。

【0 2 3 8】

【表 2 9】

表 29: 誘力作用計算のための huCBE11 およびゲムシタビンの用量 - 効果の関係

処置	用量 (mg/kg)	同時処置	用量 (mg/kg)	日							
				16	20	23	27	30	34	37	41
個別投与											
huCBE11	0.2			0.055	0.073	0.016	0.000	0.030	0.118	0.132	0.120
	2.0			0.119	0.342	0.357	0.419	0.449	0.505	0.520	0.567
	4.0			0.120	0.307	0.347	0.423	0.412	0.468	0.511	0.512
Gem	5			0.230	0.310	0.295	0.242	0.245	0.295	0.274	0.253
	10			0.362	0.422	0.410	0.376	0.388	0.388	0.401	0.399
	20			0.623	0.748	0.721	0.663	0.605	0.578	0.568	0.532
組み合わせ (4:5)											
huCBE11	4		5	0.482	0.613	0.695	0.713	0.735	0.734	0.737	0.718
	8		Gem	10	0.629	0.796	0.833	0.852	0.846	0.852	0.835
	20			25	0.648	0.808	0.842	0.873	0.882	0.882	0.863

huCBE11 とゲムシタビンとの個別の処置および組み合わせ処置の中央値効果用量を表 3 0 に示す。ゲムシタビンおよび huCBE11 の個別の処置および組み合わせ処置についての用量 - 応答関係の強さおよび形状を、それぞれ表 3 1 および 3 2 に示す。この研究で使用された正確な実験用量レベルのために計算した C I 値を、表 3 2 に示す。

## 【0239】

本研究は完全に独立した作用様式を有すると考えられる薬物を使用するので、相互に排反しないC I値をたいてい適用した（表3および32～34を参照のこと）。4mg/kg huCBE11+5mg/kgゲムシタビン、8mg/kg huCBE11+10mg/kgゲムシタビン、および20mg/kg huCBE11+25mg/kgゲムシタビン（すなわち、4:5の固定された比の組み合わせ）を使用する組み合わせの用量は、34日目～37日目で協力効果を示した。より低いこれらの2用量組み合わせがほとんどの処置日数で協力作用を示した（表32）。組み合わせの用量レベル範囲を超えるC Iのシミュレーションを表33および34に示し、C Iによって示した協力作用または拮抗作用の程度の全解釈を表3に示す。全処置期間を通して協力効果が認められた。腫瘍抑制率の関数としてのC Iを、図13に示す。60%未満の腫瘍抑制レベルで協力作用が最も顕著であった。組み合わせの協力性効果のピークは、34日目に示された。有効性に対する協力効果を超える用量範囲を、図14に示す。20%～80%の腫瘍抑制が得られる用量範囲は、0.1mg/kgと10mg/kgとの間の用量レベルでの2つの薬物の組み合わせであった（図14）。この分析結果は、huCBE11+ゲムシタビンを使用した固定された比の組み合わせ処置（4:5）により、協力性抗腫瘍有効性を示すことが証明された。

## 【0240】

【表 30】

表 30: 協力作用の決定: huCBE11 およびゲムシタビンの協力作用についての効果用量中央値 (mg/kg; 効力)

日	huCBE11		ゲムシタビン	
	個別投与	組み合わせ(4:5)	個別投与	組み合わせ(4:5)
	効果用量中央値(95%信頼区間)			
16	2077	3.6	14.1	4.5
	(83 - 51942)	(1.1 - 11.4)	(11.7 - 17.0)	(1.4 - 14.2)
20	9.5	1.3	10.1	1.7
	(2.2 - 42.0)	(0.1 - 13.2)	(7.4 - 13.7)	(0.2 - 16.5)
23	4.8	0.6	10.8	0.7
	(2.0 - 11.7)	(0.1 - 4.2)	(8.1 - 14.3)	(0.1 - 5.3)
27	3.3	0.7	12.8	0.9
	(1.6 - 6.7)	(0.1 - 4.1)	(10.4 - 15.8)	(0.1 - 5.1)
30	3.8	0.6	14.1	0.8
	(1.5 - 9.6)	(0.2 - 1.8)	(12.7 - 15.6)	(0.3 - 2.3)
34	3.2	0.6	14.8	0.8
	(1.3 - 8.4)	(0.2 - 2.2)	(11.7 - 18.7)	(0.2 - 2.7)
37	2.7	0.4	15.0	0.5
	(1.3 - 5.6)	(0.2 - 1.1)	(14.1 - 16.0)	(0.2 - 1.3)
41	2.4	0.6	16.8	0.7
	(1.0 - 6.2)	(0.2 - 1.8)	(15.3 - 18.5)	(0.2 - 2.2)
43	2.4	0.4	16.9	0.6
	(0.9 - 6.1)	(0.1 - 1.5)	(14.5 - 19.7)	(0.2 - 1.9)

【0241】

【表31】

表31:協力作用の決定: huCBE11およびゲムシタビンの個別の処置および組み合わせ処置についての用量-効果曲線の特徴

日	値	huCBE11			ゲムシタビン			huCBE11 + ゲムシタビン		
		勾配	Y-切片	R	勾配	Y-切片	R	勾配	Y-切片	R
16	平均	0.30	-1.01	0.9774	1.23	-1.42	0.9898	0.41	-0.23	0.8811
	SEM	0.07	0.04		0.18	0.18		0.22		0.21
20	平均	0.64	-0.62	0.9556	1.36	-1.37	0.9629	0.58	-0.07	0.8608
	SEM	0.20	0.11		0.38	0.39		0.34		0.34
23	平均	1.26	-0.86	0.9728	1.31	-1.35	0.9688	0.50	0.12	0.8611
	SEM	0.30	0.17		0.34	0.35		0.30		0.29
27	平均	3.19	-1.64	0.9756	1.31	-1.45	0.9852	0.61	0.09	0.9049
	SEM	0.72	0.40		0.23	0.24		0.29		0.28
30	平均	1.14	-0.66	0.9654	1.12	-1.29	0.9969	0.60	0.12	0.9568
	SEM	0.31	0.17		0.09	0.09		0.18		0.18
34	平均	0.69	-0.35	0.9587	0.86	-1.00	0.9854	0.60	0.13	0.9401
	SEM	0.21	0.12		0.15	0.15		0.22		0.21
37	平均	0.70	-0.30	0.9716	0.90	-1.06	0.9989	0.49	0.19	0.9430
	SEM	0.17	0.09		0.04	0.04		0.17		0.17
41	平均	0.76	-0.29	0.9518	0.87	-1.07	0.9979	0.52	0.13	0.9433
	SEM	0.24	0.14		0.06	0.06		0.18		0.18
43	平均	0.86	-0.32	0.9484	0.98	-1.20	0.9949	0.45	0.16	0.9216
	SEM	0.29	0.16		0.10	0.10		0.19		0.18

【0242】

【表32】

表32: 協力作用の決定: 実験値についての組み合わせ指数 (C1)

日	用量 (mg/kg)		影響率	作用機構			
				相互排反		排反しない	
	huCBE11	デルシタビン		CI	協力作用	CI	協力作用
16	4	5	0.482	0.378	+++	0.379	+++
	8	10	0.629	0.463	+++	0.463	+++
	20	25	0.648	1.082	±	1.084	±
20	4	5	0.613	0.559	+++	0.631	+++
	8	10	0.796	0.465	+++	0.501	+++
	20	25	0.808	1.085	±	1.276	--
23	4	5	0.695	0.679	+++	0.786	++
	8	10	0.833	0.735	++	0.862	+
	20	25	0.842	1.746	---	2.458	---
27	4	5	0.713	1.115	-	1.295	--
	8	10	0.852	1.620	---	1.911	---
	20	25	0.873	3.795	----	5.297	----
30	4	5	0.735	0.569	+++	0.630	+++
	8	10	0.846	0.623	+++	0.695	+++
	20	25	0.882	1.186	-	1.448	--
34	4	5	0.734	0.387	+++	0.417	+++
	8	10	0.852	0.284	++++	0.301	+++
	20	25	0.882	0.498	+++	0.552	+++
37	4	5	0.737	0.441	+++	0.476	+++
	8	10	0.835	0.396	+++	0.428	+++
	20	25	0.863	0.738	++	0.851	+
41	4	5	0.718	0.578	+++	0.626	+++
	8	10	0.827	0.513	+++	0.554	+++
	20	25	0.858	0.949	±	1.092	±
43	4	5	0.708	0.726	++	0.799	++
	8	10	0.813	0.748	++	0.829	++
	20	25	0.836	1.560	---	1.918	---

++++ 強い協力作用

+++ 協力作用

++ 中程度の協力作用

+ わずかな協力作用

± ほぼ累加的

- わずかな拮抗作用

-- 中程度の拮抗作用

--- 拮抗作用

---- 強い拮抗作用

【0243】

## 【表33-1】

表33: 協力作用の決定: 組み合わせ指数(CI)のシミュレーション: 相互排反作用様式

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン	
16日目				20日目				23日目				
0.02	0.043	0.00025	0.00031	+++++	0.079	0.00161	0.00201	+++++	0.002	0.00025	0.00032	+++++
0.05	0.022	0.0026	0.0032	+++++	0.097	0.0082	0.0103	+++++	0.005	0.0017	0.0021	+++++
0.10	0.019	0.0161	0.0202	+++++	0.117	0.0299	0.0374	++++	0.013	0.0073	0.0091	+++++
0.15	0.025	0.0504	0.0630	+++++	0.135	0.0664	0.0830	++++	0.023	0.0183	0.0229	+++++
0.20	0.038	0.119	0.148	+++++	0.154	0.121	0.151	++++	0.035	0.037	0.046	+++++
0.25	0.056	0.241	0.301	+++++	0.172	0.199	0.249	++++	0.049	0.065	0.081	+++++
0.30	0.082	0.447	0.559	+++++	0.193	0.307	0.384	++++	0.067	0.106	0.133	+++++
0.35	0.118	0.784	0.980	++++	0.215	0.455	0.569	++++	0.088	0.167	0.209	+++++
0.40	0.166	1.33	1.66	++++	0.240	0.66	0.82	++++	0.114	0.26	0.32	++++
0.45	0.231	2.19	2.74	++++	0.269	0.94	1.17	++++	0.145	0.38	0.48	++++
0.50	0.320	3.59	4.49	+++	0.303	1.32	1.65	+++	0.185	0.57	0.71	++++
0.55	0.445	5.89	7.36	+++	0.344	1.87	2.34	+++	0.235	0.85	1.06	++++
0.60	0.623	9.75	12.18	+++	0.394	2.66	3.33	+++	0.301	1.28	1.60	+++
0.65	0.886	16.5	20.6	+	0.457	3.8	4.8	+++	0.389	2.0	2.4	+++
0.70	1.290	28.9	36.1	--	0.539	5.7	7.1	+++	0.511	3.1	3.8	+++
0.75	1.953	53.6	67.1	--	0.653	8.8	11.0	+++	0.691	5.1	6.3	+++
0.80	3.138	109	136	--	0.822	14	18	+	0.977	9	11	±
0.85	5.574	256	321	----	1.099	26	33	±	1.484	18	22	---
0.90	11.957	800	1001	----	1.646	59	73	---	2.587	45	56	---
0.95	41.022	5032	6290	----	3.260	213	266	---	6.347	197	246	----
0.99	624.821	292040	365040	----	15.883	3666	4583	----	46.123	5200	6499	----

## 【0244】

## 【表33-2】

表33: 協力作用の決定: 組み合わせ指数(CI)のシミュレーション: 相互排反作用様式(続き)

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン	
27日目				30日目				34日目				
0.02	0.003	0.00118	0.00148	+++++	0.011	0.00097	0.00121	+++++	0.088	0.00095	0.00119	+++++
0.05	0.009	0.0056	0.0070	+++++	0.022	0.0047	0.0058	+++++	0.111	0.0046	0.0057	++++
0.10	0.022	0.0190	0.0238	+++++	0.039	0.0162	0.0202	+++++	0.134	0.0159	0.0198	++++
0.15	0.036	0.0407	0.0509	+++++	0.057	0.0349	0.0436	+++++	0.151	0.0342	0.0428	++++
0.20	0.054	0.072	0.090	+++++	0.074	0.062	0.078	+++++	0.165	0.061	0.076	++++
0.25	0.076	0.116	0.144	+++++	0.093	0.100	0.126	+++++	0.178	0.098	0.123	++++
0.30	0.102	0.174	0.218	+++	0.113	0.153	0.191	+++	0.190	0.149	0.187	+++
0.35	0.134	0.254	0.317	+++	0.135	0.223	0.279	+++	0.202	0.218	0.273	+++
0.40	0.173	0.36	0.45	+++	0.159	0.32	0.40	+++	0.215	0.31	0.39	+++
0.45	0.222	0.50	0.63	+++	0.187	0.45	0.56	+++	0.227	0.44	0.55	+++
0.50	0.283	0.70	0.88	+++	0.219	0.62	0.78	+++	0.240	0.61	0.76	+++
0.55	0.361	0.97	1.22	++	0.256	0.87	1.09	++	0.254	0.85	1.07	++
0.60	0.465	1.36	1.70	++	0.300	1.23	1.53	++	0.269	1.20	1.50	++
0.65	0.605	1.9	2.4	++	0.355	1.7	2.2	++	0.285	1.7	2.1	++
0.70	0.804	2.8	3.5	+	0.424	2.6	3.2	++	0.305	2.5	3.1	++
0.75	1.101	4.3	5.3	-	0.515	3.9	4.9	++	0.328	3.8	4.7	++
0.80	1.582	7	9	--	0.645	6	8	++	0.357	6	8	++
0.85	2.459	12	15	--	0.846	11	14	++	0.396	11	14	++
0.90	4.435	26	32	----	1.214	24	30	--	0.456	24	29	++
0.95	11.599	88	110	----	2.174	84	104	--	0.577	82	102	++
0.99	99.562	1319	1648	----	7.879	1301	1626	----	1.008	1267	1584	±

【 0 2 4 5 】

【表 3 3 - 3 】

表 33: 協力作用の決定: 組み合わせ指数 (CI) のシミュレーション: 相互排反作用様式 (続き)

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	グムシタピン			huCBE11	グムシタピン			huCBE11	グムシタピン	
37日目				41日目				43日目				
0.02	0.015	0.00014	0.00018	+++++	0.025	0.00032	0.00040	+++++	0.003	0.00007	0.00009	+++++
0.05	0.027	0.0010	0.0012	+++++	0.044	0.0020	0.0025	+++++	0.009	0.0006	0.0008	+++++
0.10	0.044	0.0045	0.0057	+++++	0.069	0.0083	0.0103	+++++	0.020	0.0032	0.0040	+++++
0.15	0.059	0.0117	0.0146	+++++	0.092	0.0200	0.0250	+++++	0.033	0.0091	0.0113	+++++
0.20	0.073	0.024	0.030	+++++	0.114	0.039	0.049	++++	0.048	0.020	0.025	+++++
0.25	0.089	0.043	0.054	+++++	0.136	0.068	0.085	++++	0.066	0.038	0.047	+++++
0.30	0.104	0.072	0.090	++++	0.159	0.110	0.137	++++	0.086	0.066	0.083	+++++
0.35	0.121	0.114	0.143	++++	0.183	0.170	0.212	++++	0.111	0.110	0.138	++++
0.40	0.139	0.18	0.22	++++	0.208	0.26	0.32	++++	0.140	0.18	0.22	++++
0.45	0.160	0.27	0.34	++++	0.237	0.38	0.47	++++	0.176	0.28	0.35	++++
0.50	0.182	0.40	0.51	++++	0.268	0.55	0.69	++++	0.219	0.44	0.55	++++
0.55	0.209	0.61	0.76	++++	0.304	0.81	1.02	+++	0.273	0.69	0.86	++++
0.60	0.239	0.93	1.16	++++	0.345	1.21	1.51	+++	0.343	1.09	1.37	+++
0.65	0.276	1.4	1.8	+++	0.394	1.8	2.3	+++	0.433	1.8	2.2	+++
0.70	0.323	2.3	2.9	+++	0.454	2.8	3.5	+++	0.557	2.9	3.7	+++
0.75	0.383	3.8	4.8	+++	0.531	4.5	5.7	+++	0.735	5.2	6.4	++
0.80	0.467	7	9	+++	0.636	8	10	+++	1.009	10	12	±
0.85	0.595	14	17	+++	0.791	15	19	++	1.482	21	27	---
0.90	0.825	36	45	++	1.059	37	47	±	2.469	60	75	---
0.95	1.410	166	207	--	1.699	156	195	---	5.643	321	402	---
0.99	4.851	4830	6037	----	4.882	3675	4594	----	35.251	12948	16185	----

【 0 2 4 6 】

## 【表34-1】

表34: 協力作用の決定: 組み合わせ指標 (CI) のシミュレーション:  
相互に排反しない (完全に独立した) 作用様式

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	ガムシタビン			huCBE11	ガムシタビン			huCBE11	ガムシタビン	
16日目				20日目				23日目				
0.02	0.043	0.00025	0.00031	+++++	0.079	0.00161	0.00201	+++++	0.002	0.00025	0.00032	+++++
0.05	0.022	0.0026	0.0032	+++++	0.097	0.0082	0.0103	+++++	0.005	0.0017	0.0021	+++++
0.10	0.019	0.0161	0.0202	+++++	0.119	0.0299	0.0374	++++	0.013	0.0073	0.0091	+++++
0.15	0.026	0.0504	0.0630	+++++	0.139	0.0664	0.0830	++++	0.023	0.0183	0.0229	+++++
0.20	0.038	0.119	0.148	+++++	0.158	0.121	0.151	++++	0.035	0.037	0.046	+++++
0.25	0.057	0.241	0.301	+++++	0.179	0.199	0.249	+++	0.050	0.065	0.081	+++++
0.30	0.082	0.447	0.559	+++++	0.201	0.307	0.384	+++	0.068	0.106	0.133	+++++
0.35	0.118	0.784	0.980	+++	0.226	0.455	0.569	+++	0.090	0.167	0.209	+++++
0.40	0.166	1.33	1.66	+++	0.255	0.66	0.82	+++	0.117	0.26	0.32	++++
0.45	0.231	2.19	2.74	+++	0.288	0.94	1.17	+++	0.150	0.38	0.48	++++
0.50	0.321	3.59	4.49	++	0.326	1.32	1.65	++	0.193	0.57	0.71	++++
0.55	0.446	5.89	7.36	++	0.373	1.87	2.34	++	0.248	0.85	1.06	+++
0.60	0.624	9.75	12.18	++	0.430	2.66	3.33	++	0.322	1.28	1.60	++
0.65	0.887	16.5	20.6	+	0.503	3.8	4.8	++	0.424	2.0	2.4	++
0.70	1.291	28.9	36.1	--	0.600	5.7	7.1	++	0.572	3.1	3.8	++
0.75	1.954	53.6	67.1	--	0.734	8.8	11.0	++	0.803	5.1	6.3	++
0.80	3.140	109	136	--	0.934	14	18	±	1.199	9	11	-
0.85	5.576	256	321	----	1.266	26	33	--	1.999	18	22	---
0.90	11.961	800	1001	----	1.930	59	73	---	4.158	45	56	----
0.95	41.028	5032	6290	----	3.930	213	266	----	15.863	197	246	----
0.99	624,846	292040	365040	----	20,339	3666	4583	----	555.03	9	5200	6499
												----

## 【0247】

## 【表34-2】

表34: 協力作用の決定: 組み合わせ指數 (CI) のシミュレーション:  
相互に排反しない (完全に独立した) 作用様式 (続き)

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン	
27日目			30日目			34日目						
0.02	0.003	0.00118	0.00148	+++++	0.011	0.00097	0.00121	+++++	0.089	0.00095	0.00119	+++++
0.05	0.009	0.0056	0.0070	+++++	0.022	0.0047	0.0058	+++++	0.112	0.0046	0.0057	++++
0.10	0.022	0.0190	0.0238	+++++	0.040	0.0162	0.0202	+++++	0.136	0.0159	0.0198	++++
0.15	0.037	0.0407	0.0509	+++++	0.057	0.0349	0.0436	+++++	0.154	0.0342	0.0428	++++
0.20	0.055	0.072	0.090	+++++	0.075	0.062	0.078	+++++	0.169	0.061	0.076	++++
0.25	0.077	0.116	0.144	+++++	0.095	0.100	0.126	+++++	0.183	0.098	0.123	++++
0.30	0.104	0.174	0.218	++++	0.115	0.153	0.191	++++	0.196	0.149	0.187	++++
0.35	0.138	0.254	0.317	++++	0.138	0.223	0.279	++++	0.209	0.218	0.273	++++
0.40	0.179	0.36	0.45	++++	0.164	0.32	0.40	++++	0.222	0.31	0.39	++++
0.45	0.231	0.50	0.63	++++	0.194	0.45	0.56	++++	0.235	0.44	0.55	++++
0.50	0.297	0.70	0.88	++++	0.228	0.62	0.78	++++	0.249	0.61	0.76	++++
0.55	0.384	0.97	1.22	+++	0.268	0.87	1.09	+++	0.265	0.85	1.07	+++
0.60	0.501	1.36	1.70	+++	0.317	1.23	1.53	+++	0.281	1.20	1.50	+++
0.65	0.663	1.9	2.4	+++	0.378	1.7	2.2	+++	0.300	1.7	2.1	+++
0.70	0.899	2.8	3.5	+	0.457	2.6	3.2	+++	0.322	2.5	3.1	+++
0.75	1.267	4.3	5.3	- - -	0.565	3.9	4.9	+++	0.349	3.8	4.7	+++
0.80	1.894	7	9	- - -	0.723	6	8	++	0.383	6	8	+++
0.85	3.132	12	15	- - -	0.980	11	14	±	0.429	11	14	+++
0.90	6.304	26	32	- - - -	1.488	24	30	- - -	0.502	24	29	+++
0.95	21.318	88	110	- - - -	3.050	84	104	- - -	0.656	82	102	++
0.99	470.496	1319	1648	- - - -	19.243	1301	1626	- - -	1.262	1267	1584	--

## 【0248】

## 【表34-3】

表34: 協力作用の決定: 組み合わせ指數 (CI) のシミュレーション:  
相互に排反しない (完全に独立した) 作用様式 (続き)

Fa	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号	CI	用量 (mg/kg)		記号
		huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン			huCBE11	ゲムシタビン	
37日目			41日目			43日目						
0.02	0.015	0.00014	0.00018	+++++	0.025	0.00032	0.00040	+++++	0.003	0.00007	0.00009	+++++
0.05	0.027	0.0010	0.0012	+++++	0.044	0.0020	0.0025	+++++	0.009	0.0006	0.0008	+++++
0.10	0.044	0.0045	0.0057	+++++	0.070	0.0083	0.0103	+++++	0.020	0.0032	0.0040	+++++
0.15	0.059	0.0117	0.0146	+++++	0.093	0.0200	0.0250	+++++	0.033	0.0091	0.0113	+++++
0.20	0.074	0.024	0.030	+++++	0.115	0.039	0.049	+++	0.048	0.020	0.025	+++++
0.25	0.089	0.043	0.054	+++++	0.138	0.068	0.085	+++	0.066	0.038	0.047	+++++
0.30	0.106	0.072	0.090	+++	0.162	0.110	0.137	+++	0.087	0.066	0.083	+++++
0.35	0.123	0.114	0.143	+++	0.187	0.170	0.212	+++	0.113	0.110	0.138	+++
0.40	0.142	0.18	0.22	+++	0.214	0.26	0.32	+++	0.143	0.18	0.22	+++
0.45	0.163	0.27	0.34	+++	0.244	0.38	0.47	+++	0.180	0.28	0.35	+++
0.50	0.187	0.40	0.51	+++	0.277	0.55	0.69	+++	0.225	0.44	0.55	+++
0.55	0.215	0.61	0.76	+++	0.316	0.81	1.02	+++	0.283	0.69	0.86	+++
0.60	0.249	0.93	1.16	+++	0.361	1.21	1.51	+++	0.358	1.09	1.37	+++
0.65	0.289	1.4	1.8	+++	0.416	1.8	2.3	++	0.458	1.8	2.2	++
0.70	0.341	2.3	2.9	++	0.484	2.8	3.5	++	0.600	2.9	3.7	++
0.75	0.410	3.8	4.8	++	0.573	4.5	5.7	++	0.810	5.2	6.4	++
0.80	0.509	7	9	++	0.698	8	10	++	1.155	10	12	-
0.85	0.667	14	17	++	0.891	15	19	++	1.807	21	27	---
0.90	0.972	36	45	±	1.246	37	47	--	3.411	60	75	----
0.95	1.874	166	207	--	2.216	156	195	--	10.872	321	402	----
0.99	10.732	4830	6037	----	9.792	3675	4594	----	266.201	12948	16185	----

要するに、KM-20L2ヒト結腸直腸腺癌を皮下移植した胸腺欠損ヌードマウスにおけるLT受容体活性化mAbであるhucBE11と化学療法剤であるゲムシタビンとの組み合わせ処置により、hucBE11とゲムシタビンとの組み合わせ処置の効果は協力性であると判断された。

#### 【0249】

(実施例5：植物アルカロイドである化学療法剤と組み合わせたLTRアゴニストの抗腫瘍効果)

(hucBE11とタキソールの組み合わせの抗腫瘍効果)

植物アルカロイド化学療法剤（例えば、タキソール）とLT受容体活性化mAbであるhucBE11との組み合わせ処置を使用して癌処置で相乗効果が得られるかどうかを決定するために、WiDr異種移植片モデルにおいて抗体/化学療法剤組み合わせを使用して、潜在的な協力性抗腫瘍活性および抗腫瘍活性の増強を試験した。

#### 【0250】

組み合わせ抗腫瘍効果の研究のための適切なタキソールおよびhucBE11の用量を決定するために、用量範囲決定研究を最初に行った。各薬剤の研究により、腫瘍成長抑制に対する各薬剤の抗腫瘍効果も試験した。確立されたWiDr腫瘍を保有する胸腺欠損ヌードマウスを、生理食塩水（コントロール）、hucBE11（5μg、50μg、100μg、または500μg）、またはタキソール（3.13mg/kgから25mg/kgまでの用量範囲）のいずれかで処置した（生理食塩水コントロールはn=30/用量、実験群はn=10/用量）。3日目に腫瘍サイズを測定し、その後悪性度分類日まで定期的に測定した。

#### 【0251】

タキソールのみの実験群で腫瘍成長が阻害された。50日目に、25mg/kgの用量のタキソールは、ヌードマウスのWiDrヒト結腸直腸腫瘍成長を有意に阻害した（P<0.0001）。25mg/kg群の21日目から50日目までのT/C率は42%またはそれ未満であった。12.5mg/kg、6.25mg/kg、および3.13mg/kgのタキソール用量群の腫瘍成長は、ビヒクルコントロール群と有意に異ならず、これらの用量群における研究を通してT/C率は82%を超えた。さらに、タキソールにより、25mg/kg（P<0.0001）、18.75mg/kg（P<0.001）、および6.25mg/kgの群では39日目および12.5mg/kg（P<0.05）の群では13日目～32日目に腫瘍成長が有意に抑制された。T/C率は、25mg/kg群では13日目～39日目および18.75mg/kg群では21日目～34日目に42%またはそれ未満であった。

#### 【0252】

hucBE11実験群の腫瘍成長も抑制された。45日目に、500μg（P<0.01）、100μg（P<0.001）、50μg（P<0.001）、および5μg（P<0.05）の用量のhucBE11は、腫瘍成長を有意に抑制した。39日目に類似の結果が認められ、500μg（P<0.001）および50μg（P<0.01）のhucBE11での処置後の腫瘍重量はビヒクルよりも有意に低かった。500μg群における31日目～45日目のT/C率は42%未満であった。

#### 【0253】

タキソールとhucBE11との組み合わせ処置が腫瘍成長抑制に有効であるかどうかを決定するために、上記のように確立された腫瘍を有する確立されたWiDr腫瘍細胞を保有する胸腺欠損ヌードマウスに対して組み合わせ研究を行った。hucBE11とタキソールとの組み合わせは、NCI活性基準に基づいて、WiDrモデルにおいて活性であると判断された。（T/C率は42%またはそれ未満であった。）hucBE11 500μgとタキソール12.5mg/kgとの組み合わせは、39日目にhucBE11（500μg）のみよりも有意にWiDr腫瘍成長を大幅に抑制した（P<0.05）。hucBE11 500μgおよびタキソール12.5mg/kgの24日目～39日目、hucBE11 75μgおよびタキソール25mg/kgの13日目～39日目、huc

C B E 1 1 5 6 . 2 5  $\mu$  g およびタキソール 1 8 . 7 5 mg / kg の 1 8 日目～3 4 日目、および huCBE11 3 7 . 5  $\mu$  g およびタキソール 1 2 . 5 mg / kg の 2 7 日目、3 4 日目および 3 9 日目での T / C 率は 4 2 % 未満であった（図 3）。

## 【 0 2 5 4 】

組み合わせ研究の結果（表 3 5 ～ 3 9 および図 3 および 1 5 に示す）は、タキソールと組み合わせた huCBE11 が 処置マウスで腫瘍体積を有意に減少させることを証明する。各 処置群の腫瘍体積とコントロール群の腫瘍体積との比較によって抗腫瘍有効性を決定した。1 . 0 0 0 の Fa は、腫瘍の完全な抑制を示す。表 3 5 は、3 4 日目の huCBE11 およびタキソールの個別の 処置および組み合わせ 処置の用量 - 効果の関係を示す。

## 【 0 2 5 5 】

## 【 表 3 5 】

表 35: huCBE11 とタキソールとの間の用量効果関係

処置	用量	単位	同時処置	用量	単位	腫瘍体積	体積の減少	Fa
コントロール						1376.4	0.0	0.000
タキソール	6.25	mg/kg				1045.2	331.2	0.241
タキソール	18.75	mg/kg				567.5	808.9	0.588
タキソール	25	mg/kg				259.1	1117.3	0.812
huCBE11	5	ug				1024.0	352.4	0.256
huCBE11	50	ug				880.1	496.3	0.361
huCBE11	500	ug				735.6	640.8	0.466
huCBE11	18.75	ug	タキソール	6.25		639.9	736.5	0.535
huCBE11	37.5	ug	タキソール	12.5	mg/kg	539.2	837.2	0.608
huCBE11	75	ug	タキソール	25	mg/kg	157.7	1218.7	0.885
huCBE11	50	ug	タキソール	6.25	mg/kg	1019.8	356.6	0.259
huCBE11	50	ug	タキソール	12.5	mg/kg	689.7	686.7	0.499
huCBE11	500	ug	タキソール	6.25	mg/kg	652.6	723.8	0.526
huCBE11	500	ug	タキソール	12.5	mg/kg	555.0	821.4	0.597

タキソールのみでの W i D r 腫瘍を保有するマウスの 処置が用量応答抗腫瘍有効性を示すので、組み合わせ指數の計算によって huCBE11 とタキソールとの組み合わせの協力作用を正式に評価することができた。本研究における協力性薬物作用の評価に使用した用量の固定された比は 0 . 3 3 3 : 1 ( mg / kg タキソール :  $\mu$  g huCBE11 ) であった。この比は、以前のパイロット研究で決定した 2 つの薬剤についての中央値効果用量の比を基本としていた。協力作用の正式な評価には、W i n d o w s ( 登録商標 ) ベースの用量効果分析のための C a l c u S y n V 1 . 1 ( B i o s o f t , C a m b r i d g e U K ) ソフトウェアを使用した組み合わせ指數 ( C I ) の計算を使用した。組み合わせで投与した 処置について、 C I = 1 は累加有効性を示した。1 未満の C I は協力作用を示した。1 を超える C I は拮抗作用を示した。 C I 計算で使用した用量 - 効果関係を、表 3 6 に示す。

## 【 0 2 5 6 】

## 【表36】

表36: 協力作用計算のための huCBE11 の用量 - 効果の関係

個別投与				組み合わせ (0.333:1)		
タキソール 用量 (mg/kg)	影響率	huCBE11 用量 (μg)	影響率	タキソール 用量 (mg/kg)	huCBE11 用量 (μg)	影響率
6.25	0.241	5	0.256	6.25	18.8	0.535
18.75	0.588	50	0.361	12.5	37.5	0.608
25	0.812	500	0.466	25	75.0	0.885

34日目の腫瘍体積を使用して、組み合わせ指数の使用にて協力作用を評価した。タキソールおよびhuCBE11の個別の処置および組み合わせ処置についての用量 - 応答関係の可能性および形状を、それぞれ表37および38に示す。この研究で使用された正確な実験用量レベルのために計算した組み合わせ指数を、表39に示す。

## 【0257】

## 【表37】

表37: 協力作用の決定: huCBE11 およびタキソールの協力作用についての効果用量中央値

薬剤	用量 単位	効果用量中央値 (95% 信頼区間)	
		個別投与	組み合わせ (0.333:1)
タキソール	mg/kg	12.6 (9.4 - 16.8)	6.6 (3.4 - 12.8)
huCBE11	μg	932.9 (720.7 - 1207.6)	19.8 (10.2 - 38.4)

## 【0258】

## 【表38】

表38: 個別の処置および組み合わせ処置についての用量 - 応答の形状

用量 - 応答曲線の特徴			
値	勾配	Y-切片	R
タキソール			
平均	1.740	-1.914	0.9717
SEM	0.423	0.501	
huCBE11			
平均	0.202	-0.600	0.9993
SEM	0.008	0.014	
タキソール + huCBE11			
平均	1.371	-1.125	0.9298
SEM	0.542	0.610	

## 【0259】

## 【表39】

表39: 実験用量について計算した組み合わせ指数

実験値についての組み合わせ指数(CI)						
タキソール 用量 (mg/kg)	huCBE11 用量 (ug)	影響率	作用機構			
			相互排反		排反しない	
			CI	協力作用	CI	協力作用
6.25	18.75	0.535	0.468	+++	0.473	+++
12.5	37.5	0.608	0.777	++	0.780	++
25	75	0.885	0.615	+++	0.615	+++

++ 中程度の協力作用

+++ 協力作用

本研究は完全に独立した作用様式を有すると考えられる薬物を使用するので、相互に排反しないCI値をたいてい適用した。6.25 mg / kg タキソール + 18.75  $\mu$ g huCBE11、12.5 mg / kg タキソール + 37.5  $\mu$ g huCBE11、および25 mg / kg タキソール + 75  $\mu$ g huCBE11を使用した組み合わせ用量が協力効果を示した。組み合わせの用量レベル範囲を超えるCIのシミュレーションを表40に示す。4.9 mg / kg タキソール + 14.7  $\mu$ g huCBE11（腫瘍体積が40%抑制される）から57 mg / kg タキソール + 170  $\mu$ g huCBE11（腫瘍体積が95%抑制される）までの範囲の組み合わせ用量が協力効果を示した。影響率の関数としての組み合わせ指数を、図12に示す。

【0260】

## 【表40-1】

表40: 組み合わせ指數(CI) シミュレーション

Fa	CI	タキソール (mg/kg)	huCBE11 (μg)	記号
相互排反作用 機構				
0.02	287000	0.39	1.16	-----
0.05	5278	0.77	2.32	-----
0.10	226	1.33	3.99	-----
0.15	32	1.87	5.60	-----
0.20	7.796	2.40	7.22	----
0.25	2.634	2.97	8.90	---
0.30	1.219	3.56	10.69	--
0.35	0.767	4.21	12.63	++
Fa	CI	タキソール (mg/kg)	huCBE11 (μg)	記号
0.40	0.611	4.92	14.76	+++
0.45	0.559	5.71	17.13	+++
0.50	0.547	6.61	19.83	+++
0.55	0.551	7.65	22.96	+++
0.60	0.563	8.89	26.66	+++
0.65	0.580	10.38	31.16	+++
0.70	0.600	12.27	36.80	+++
0.75	0.623	14.73	44.20	+++
0.80	0.651	18.17	54.53	+++
0.85	0.687	23.43	70.30	+++
0.90	0.738	32.84	98.52	++
0.95	0.829	56.63	169.91	++
0.99	1.070	188.80	566.46	±
0.02	370000	0.39	1.16	-----
0.05	7036	0.77	2.32	-----
0.10	310	1.33	3.99	-----
0.15	45	1.87	5.60	-----
0.20	10	2.40	7.22	----
0.25	3.604	2.97	8.90	----

## 【0261】

【表40-2】

0.30	1.569	3.56	10.69	---
0.35	0.905	4.21	12.63	±
0.40	0.669	4.92	14.76	+++
0.45	0.584	5.71	17.13	+++
0.50	0.558	6.61	19.83	+++
0.55	0.556	7.65	22.96	+++
0.60	0.565	8.89	26.66	+++
0.65	0.581	10.38	31.16	+++
0.70	0.600	12.27	36.80	+++
0.75	0.623	14.73	44.20	+++
0.80	0.651	18.17	54.53	+++
0.85	0.687	23.43	70.30	+++
0.90	0.738	32.84	98.52	++
0.95	0.829	56.63	169.91	++
0.99	1.070	188.80	566.46	±

本研究で薬物の増強を評価するために使用した用量は、固定された比の組み合わせを制限しなかった。統計的に有意な増強の試験には、各動物のFaの計算が必要である。各腫瘍体積（表45）を使用して、各動物の腫瘍体積の抑制率（Fa）を計算した（表46）。（コントロール群の平均腫瘍体積 - 個別の動物の腫瘍体積）÷コントロール群の平均腫瘍体積としてFaを計算した。組み合わせ処置についての予想される累加Faを、組み合わせのいずれかの成分を投与した群由来の平均Faの合計であると解釈する。組み合わせ処置の実際の効果と処置が単に累加であると予想される効果との間の相違も計算した（表46）。両側1標本t検定を使用して、組み合わせ処置により予想される累加値と統計的に有意に異なる平均Faが得られるかどうかを決定した（表46）。

【0262】

【表45】

表 45: 各腫瘍体積

コントロール	タキソール 6.25	タキソール 12.5	hCBE 50	hCBE 500	hCBE 50 +タキソール 6.25	hCBE 50 +タキソール 12.5	hCBE 500 +タキソール 6.25	hCBE 500 +タキソール 12.5
1302.1	616.0	1112.7	794.0	832.1	995.6	697.0	553.6	464.5
2573.3	985.1	1554.9	448.6	541.3	564.3	231.8	501.0	297.4
1410.2	1675.4	1104.0	1698.4	1059.8	953.2	111.8	647.5	624.6
1348.2	1144.5	914.1	531.6	751.2	1868.1	463.3	401.3	483.8
1020.3	1058.1	201.1	1322.2	1136.7	906.8	188.0	591.6	725.8
1268.8	1425.5	1113.1	638.5	881.2	960.2	1271.4	923.2	494.1
1321.9	796.7	1183.1	798.8	685.7	763.9	1221.9	613.8	664.2
1318.2	860.4	1325.2	754.3	648.1	1801.1	983.6	726.4	488.5
1629.6	730.5	1759.5	838.2	430.1	762.2	884.1	716.5	730.8
1458.9	1159.9	1143.0	976.8	389.8	623.0	844.0	850.8	576.6
1165.3								
781.6								
1540.0								
1196.5								
1198.1								
1279.7								
975.4								
1079.5								
1666.2								
1994.8								
平均:	1376.4	1045.2	1141.1	880.1	735.6	1019.8	689.7	652.6
								555.0

【0263】

## 【表46】

表46:腫瘍体積の各抑制率

タキソール 6.25	タキソール 12.5	hCBE 50	hCBE 500	hCBE 50 +タキソール 6.25	hCBE 50 +タキソール 12.5	hCBE 500 +タキソール 6.25	hCBE 500 + タキソール 12.5
0.552	0.192	0.423	0.395	0.277	0.494	0.598	0.663
0.284	-0.130	0.674	0.607	0.590	0.832	0.636	0.784
-0.217	0.198	-0.234	0.230	0.307	0.919	0.530	0.546
0.168	0.336	0.614	0.454	-0.357	0.663	0.708	0.649
0.231	0.854	0.039	0.174	0.341	0.863	0.570	0.473
-0.036	0.191	0.536	0.360	0.302	0.076	0.329	0.641
0.421	0.140	0.420	0.502	0.445	0.112	0.554	0.517
0.375	0.037	0.452	0.529	-0.309	0.285	0.472	0.645
0.469	-0.278	0.391	0.688	0.446	0.358	0.479	0.469
0.157	0.170	0.290	0.717	0.547	0.387	0.382	0.581
平均:	0.241	0.171	0.361	0.466	0.259	0.499	0.526
累加:					0.601	0.532	0.706
相違:					-0.342	-0.033	-0.180
	両側一標本 t 検定						
T値:					-3.286	-0.340	-4.981
DF:					9	9	9
P値:					0.0094	0.7418	0.0008
							0.2289

要するに、タキソールおよびh u C B E 1 1を使用した固定された比の組み合わせ処置(0.333:1)は、W i D rヒト結腸直腸腺癌に対して協力性抗腫瘍有効性を示した。

## 【0264】

(同等物)

本発明は、特に、L T - - Rアゴニストを含む組み合わせ治療薬を提供する。本発明の特定の実施形態を考察しているが、上記明細書は例示であり、本発明を制限しない。本発明の多数の変形形態は、本明細書の再検討により、当業者に明らかとなる。本発明の全範囲は、特許請求の範囲およびその等価物の全範囲ならびに明細書およびこのような変形形態を参照して決定すべきである。

## 【0265】

以下に列挙した項目を含む本明細書中に記載の全ての刊行物および特許は、各刊行物または特許が具体的且つ個別に参考として援用されるように示されるかのようにその全体が本明細書中で参考として援用される。矛盾する場合、本明細書に記載のすべての定義を含め、本出願が支配する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0266】

【図1】図1は、生理食塩水コントロール（クロス）、イリノテカンのみ（円）、およびh u C B E 1 1のみ（三角）と比較した、一連の処置におけるWiDrヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1と組み合わせたイリノテカン（カンプトサール）（四角）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の最初の投与を矢印で示す。

【図2】図2は、生理食塩水コントロール（クロス）、ゲムシタбинのみ（円）、およびh u C B E 1 1のみ（三角）と比較した、一連の処置におけるWiDrヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1と組み合わせたゲムシタбин（四角）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の最初の投与を矢印で示す。

【図3】図3は、生理食塩水コントロール（クロス）、タキソールのみ（円）、およびh u C B E 1 1のみ（三角）と比較した、一連の処置におけるWiDrヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1と組み合わせたタキソール（四角）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の最初の投与を矢印で示す。

【図4】図4は、生理食塩水コントロール（クロス）、シスプラチンのみ（円）、およびh u C B E 1 1のみ（三角）と比較した、一連の処置におけるWiDrヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1と組み合わせたシスプラチン（CDDP）（四角）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の最初の投与を矢印で示す。

【図5】図5は、生理食塩水コントロール（クロス）、アドリアマイシンのみ（円）、およびh u C B E 1 1のみ（三角）と比較した、一連の処置におけるWiDrヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1と組み合わせたアドリアマイシン（四角）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の最初の投与を矢印で示す。

【図6】図6は、生理食塩水コントロール（クロス）、シスプラチンのみ（黒塗りの四角）、およびh u C B E 1 1のみ（白抜きの四角）と比較した、一連の処置におけるWiDrヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1（三角；500μg）と組み合わせたシスプラチン（1mg/kg）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の投与を矢印で示す。

【図7】図7は、生理食塩水コントロール（黒塗りの三角）、アドリアマイシンのみ（黒塗りの円）、およびh u C B E 1 1のみ（白抜きの四角）と比較した、一連の処置におけるWiDrヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1（黒塗りの四角；500μg）と組み合わせたアドリアマイシン（6mg/kg）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の投与を矢印で示す。

【図8】図8は、生理食塩水コントロール（四角）、カンプトサールのみ（三角）、およびh u C B E 1 1のみ（円）と比較した、一連の処置におけるKM-20L2ヒト結腸直腸腺腫重量に対するh u C B E 1 1（菱形；20mg/kg）と組み合わせたカンプトサール（3mg/kg）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の投与を矢印で示す。

【図9】図9は、WiDr腺癌モデルにおける腫瘍体積の減少に対するh u C B E 1 1およびカンプトサールの組み合わせの各効果レベルでの組み合わせ指數のプロットを示す。組み合わせ指數（CI）を、影響率（Fa）に対してプロットした。1未満の組み合わせ指數が相乗効果を示す。

【図10】図10は、KM-20L2腺癌モデルにおける複数の処置時点での腫瘍体積の減少に対するh u C B E 1 1およびカンプトサール（固定された投与比はh u C B E 1 1 : カンプトサール = 1 : 0 . 6 3）の組み合わせの各効果レベルでの組み合わせ指數のプロットを示す。組み合わせ指數（CI）を、認められた腫瘍抑制率に対してプロットした。1未満の組み合わせ指數が相乗効果を示す。

【図11】図11は、WiDr腺癌モデルにおける腫瘍体積の減少に対するh C B E 1 1およびゲムシタбинの組み合わせの各効果レベルでの組み合わせ指數のプロットを示す。組み合わせ指數（CI）を、影響率（Fa）に対してプロットした。1未満の組み合わせ指數が相乗効果を示す。

【図12】図12は、生理食塩水コントロール（クロス）、ゲムシタбинのみ（円）、およびh u C B E 1 1のみ（三角）と比較した、一連の処置におけるKM-20L2ヒト結

腸直腸腺腫重量に対する huCBE11（四角；4 mg / kg）と組み合わせたゲムシタビン（20 mg / kg）の効果を示すグラフを示す。各薬剤の投与を矢印で示す。

【図13】図13は、KM-20L2腺癌モデルにおける複数の処置時点での腫瘍体積の減少に対するhuCBE11およびゲムシタビン（固定投与比はhuCBE11：ゲムシタビン=4：5）の組み合わせの各効果レベルでの組み合わせ指数のプロットを示す。組み合わせ指数（CI）を、認められた腫瘍抑制率に対してプロットした。1未満の組み合わせ指数が相乗効果を示す。

【図14】図14は、KM-20L2腺癌モデルマウスに固定された比4：5で投与した場合のhuCBE11：ゲムシタビン組み合わせ処置についての用量-応答範囲の三次元グラフを示す。

【図15】図15は、腫瘍体積の減少に対するhuCBE11およびタキソールの組み合わせの各効果レベルでの組み合わせ指数のプロットを示す。組み合わせ指数（CI）を、影響率（Fa）に対してプロットした。1未満の組み合わせ指数が相乗効果を示す。