

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-511257

(P2016-511257A)

(43) 公表日 平成28年4月14日 (2016. 4. 14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 Y	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/4745 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 33/24 (2006. 01)	A 6 1 K 31/4745	4 C O 8 6
A 6 1 K 31/282 (2006. 01)	A 6 1 K 33/24	4 C 2 O 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 204 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-560312 (P2015-560312)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月27日 (2014. 2. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月30日 (2015. 9. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/019034
 (87) 国際公開番号 W02014/134311
 (87) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014. 9. 4)
 (31) 優先権主張番号 61/770, 802
 (32) 優先日 平成25年2月28日 (2013. 2. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/892, 854
 (32) 優先日 平成25年10月18日 (2013. 10. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500287639
 ミレニアム ファーマシューティカルズ、
 インコーポレイテッド
 MILLENNIUM PHARMACE
 UTICALS, INC.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, ランズダウン
 ストリート 40
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

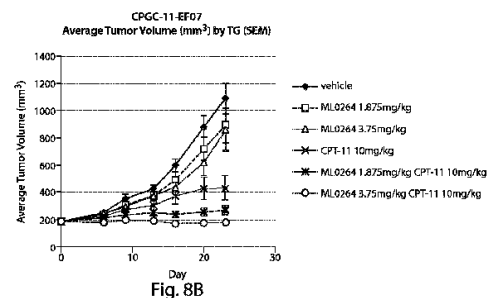
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療における抗G C C抗体-薬物複合体及びDNA損傷剤の投与

(57) 【要約】

本発明は、消化器癌の治療のための方法に関する。具体的には、本発明は、抗G C C抗体分子を含む免疫複合体をDNA損傷剤と組み合わせて投与することによる、消化器癌の治療のための方法を提供する。一態様において、本発明は、癌、例えば、消化器癌を治療するための方法であって、プロテアーゼ切断可能リンカーを介して強力な微小管阻害剤であるモノメチルオーリスタチンE (MMA E) に複合体化された抗G C C抗体分子を含む免疫複合体を、DNA損傷剤と組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行う方法に関する。免疫複合体及びDNA損傷剤のそれぞれは、2つの薬剤を組み合わせ投与した場合に治療的に有効な量で投与される。

【選択図】 図 8 B

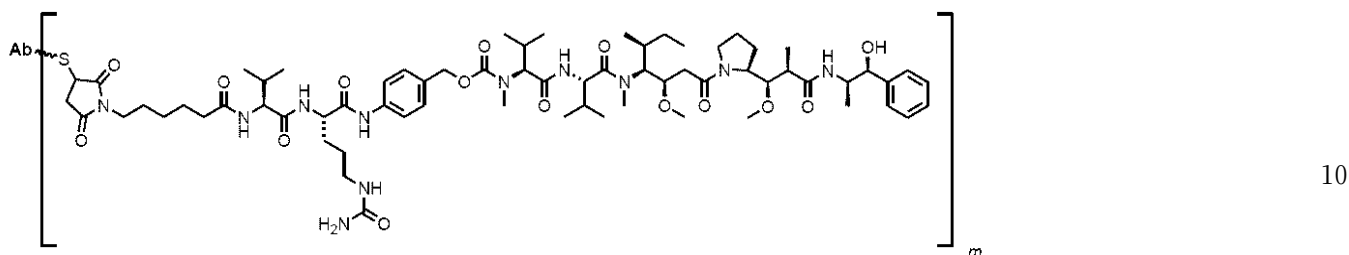


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

消化器癌の治療方法であって、前記方法は、そのような治療を必要とする患者に、式（I-5）の免疫複合体またはその薬学的に許容される塩であって、

【化 2 4】



式中、A bは、抗G C C抗体分子またはその抗原結合フラグメントであり、mは1～8の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、

DNA 損傷剤と組み合わせて投与することを含み、前記免疫複合体及び前記 DNA 損傷剤の量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である、前記方法。

【請求項2】

前記抗 G C C 抗体分子は、

a) 次のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域(CDR)：

V H C D R 1 G Y Y W S （配列番号 2 5）

VH CDR2 E I N H R G N T N D N P S L K S (配列番号26)、及び

VH CDR3 E R G Y T Y G N F D H (配列番号27)、

ならびに

b) 次のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖CDR:

V L C D R 1 R A S Q S V S R N L A (配列番号 28)、

V L C D R 2 G A S T R A T (配列番号29)、及び

V L C D R 3 Q Q Y K T W P R T (配列番号 30) を含む、請求項 1 に記載の前

記方法。

【請求項3】

mは、3～5である、請求項1に記載の前記方法。

【請求項4】

mは、約4である、請求項3に記載の前記方法。

【請求項5】

前記消化器癌は、GCC発現癌である、請求項1に記載の前記方法。

【請求項 6】

前記消化器癌は、単一の薬剤として投与される場合に前記免疫複合体の活性に耐性である、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 7】

前記消化器癌は、結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、及び食道癌、またはそれらの転移からなる群から選択される、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 8】

前記DNA損傷剤は、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アルキル化剤、アルキル化様剤、アントラサイクリン、DNAインターカレーター、DNA副溝アルキル化剤、及び抗代謝剤からなる群から選択される、請求項1に記載の前記方法。

【請求項 9】

前記DNA損傷剤は、トポイソメラーゼI阻害剤、アントラサイクリン（anthracycine）、または抗代謝剤である、請求項8に記載の前記方法。

【請求項 10】

DNA 損傷剤は、イリノテカン、トポテカン、及びカンプトテシンからなる群から選択されるトポイソメラーゼ I 阻害剤である、請求項 8 に記載の前記方法。

【請求項 11】

前記トポソメラーゼ I 阻害剤は、イリノテカンである、請求項 10 に記載の前記方法。

【請求項 12】

前記消化器癌は、原発性または転移性結腸直腸癌である、請求項 10 に記載の前記方法。

【請求項 13】

前記 DNA 損傷剤は、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、サトラプラチン、トリプラチンからなる群から選択されるアルキル化様剤である、請求項 8 に記載の前記方法。

【請求項 14】

前記アルキル化様剤は、シスプラチンである、請求項 13 に記載の前記方法。

【請求項 15】

前記消化器癌 (gastrointestinal cancer) は、原発性または転移性結腸直腸癌である、請求項 14 に記載の前記方法。

【請求項 16】

前記前記 DNA 損傷剤は、フルオロウラシル (5-FU)、フロクスウリジン (5-FUdR)、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン (6-TG)、メルカプトプリン (6-MP)、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン (2-CDA)、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、及びペメトレキセドからなる群から選択される抗代謝剤である、請求項 8 に記載の前記方法。

【請求項 17】

前記抗代謝剤は、ゲムシタビンである、請求項 16 に記載の前記方法。

【請求項 18】

前記消化器癌は、原発性または転移性膵臓癌である、請求項 17 に記載の前記方法。

【請求項 19】

前記抗代謝剤は、5-フルオロウラシルである、請求項 16 に記載の前記方法。

【請求項 20】

前記消化器癌は、原発性または転移性結腸直腸癌である、請求項 19 に記載の前記方法。

【請求項 21】

前記免疫複合体及び前記 DNA 損傷剤は、同時に投与される、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 22】

前記免疫複合体及び前記 DNA 損傷剤は、逐次的に投与される、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 23】

前記免疫複合体及び前記 DNA 損傷剤は、別個の製剤に含まれる、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 24】

前記抗 G C C 抗体分子は、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 25】

前記抗 G C C 抗体分子は、IgG1 抗体である、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 26】

前記抗 G C C 抗体分子は、ヒトまたはヒト由来の軽鎖及び重鎖可変領域フレームワークをさらに含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 27】

原発性または転移性結腸直腸癌の治療方法であって、前記方法は、そのような治療を必

10

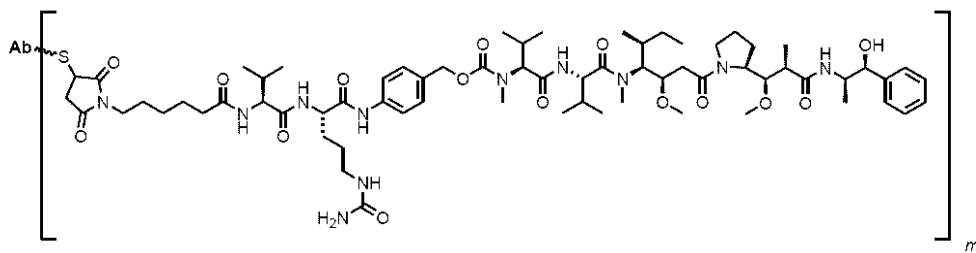
20

30

40

50

要とする患者に、式（I-5）の免疫複合体またはその薬学的に許容される塩であって、
【化25】



式中、Abは、抗GCC抗体分子またはその抗原結合フラグメントであり、mは1～8
の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、

トポイソメラーゼI阻害剤と組み合わせて投与することを含み、前記免疫複合体及び前
記トポイソメラーゼI阻害剤の量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である、
前記方法。

【請求項28】

前記抗GCC抗体分子は、

a) 次のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR）：

VH CDR1 GYYWS（配列番号25）、

VH CDR2 EINHRGNTNDNPSLKS（配列番号26）、及び

VH CDR3 ERGYTYGNFDH（配列番号27）、

ならびに

b) 次のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖CDR：

VL CDR1 RASQSVSRNLA（配列番号28）、

VL CDR2 GASTRAT（配列番号29）、及び

VL CDR3 QQYKTWPRT（配列番号30）を含む、請求項27に記載

の前記方法。

【請求項29】

mは、3～5である、請求項27に記載の前記方法。

【請求項30】

mは、約4である、請求項27に記載の前記方法。

【請求項31】

前記原発性または転移性結腸直腸癌は、GCC発現癌である、請求項27に記載の前記
方法。

【請求項32】

前記癌は、単一の薬剤として投与される場合に前記免疫複合体の活性に耐性である、請
求項27に記載の前記方法。

【請求項33】

前記トポイソメラーゼI阻害剤は、イリノテカン、トポテカン、及びカンプトテシンか
らなる群から選択される、請求項27に記載の前記方法。

【請求項34】

前記トポイソメラーゼI阻害剤は、イリノテカンである、請求項33に記載の前記方法
。

【請求項35】

前記免疫複合体及びトポイソメラーゼI阻害剤は、同時に投与される、請求項27に記
載の前記方法。

【請求項36】

前記免疫複合体及びトポイソメラーゼI阻害剤は、逐次的に投与される、請求項27に
記載の前記方法。

【請求項37】

前記免疫複合体及びトポイソメラーゼI阻害剤は、別個の製剤に含まれる、請求項27

10

20

30

40

50

に記載の前記方法。

【請求項 38】

前記抗 G C C 抗体分子は、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 27 に記載の前記方法。

【請求項 39】

前記抗 G C C 抗体分子は、I g G 1 抗体である、請求項 27 に記載の前記方法。

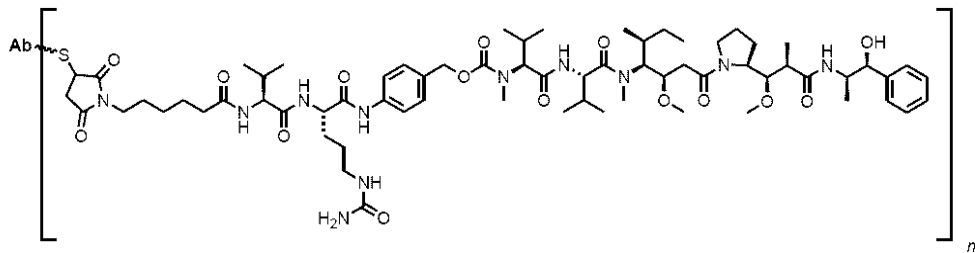
【請求項 40】

前記抗 G C C 抗体分子は、ヒトまたはヒト由来の軽鎖及び重鎖可変領域フレームワークをさらに含む、請求項 27 に記載の前記方法。

【請求項 41】

原発性または転移性結腸直腸癌の治療方法であって、前記方法は、そのような治療を必要とする患者に、式 (I-5) の免疫複合体またはその薬学的に許容される塩であって、

【化 26】



式中、A b は、抗 G C C 抗体分子またはその抗原結合フラグメントであり、m は 1 ~ 8 の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、

アルキル化様剤と組み合わせて投与することを含み、前記免疫複合体及びアルキル化様剤の量は、組み合わせて投与した場合に治療的に有効である、前記方法。

【請求項 42】

前記抗 G C C 抗体分子は、

a) 次のアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖相補性決定領域 (C D R) :

V H C D R 1 G Y Y W S (配列番号 25)、

V H C D R 2 E I N H R G N T N D N P S L K S (配列番号 26)、及び

V H C D R 3 E R G Y T Y G N F D H (配列番号 27)、ならびに

b) 次のアミノ酸配列を含む 3 つの軽鎖 C D R :

V L C D R 1 R A S Q S V S R N L A (配列番号 28)、

V L C D R 2 G A S T R A T (配列番号 29)、及び

V L C D R 3 Q Q Y K T W P R T (配列番号 30) を含む、請求項 41 に記載

の前記方法。

【請求項 43】

m は、3 ~ 5 である、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 44】

m は、約 4 である、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 45】

前記原発性または転移性結腸直腸癌は、G C C 発現癌である、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 46】

前記癌は、単一の薬剤として投与した場合に前記免疫複合体の活性に耐性である、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 47】

前記アルキル化様剤は、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、サトラプラチン、及びトリプラチンからなる群から選択される、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 48】

10

20

30

40

50

前記アルキル化様剤は、シスプラチンである、請求項 47 に記載の前記方法。

【請求項 49】

前記免疫複合体及びアルキル化様剤は、同時に投与される、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 50】

前記免疫複合体及びアルキル化様剤 (alkylating-like agent) は、逐次的に投与される、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 51】

前記免疫複合体及びアルキル化様剤は、別個の製剤に含まれる、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 52】

前記抗 G C C 抗体分子は、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 53】

前記抗 G C C 抗体分子は、I g G 1 抗体である、請求項 41 に記載の前記方法。

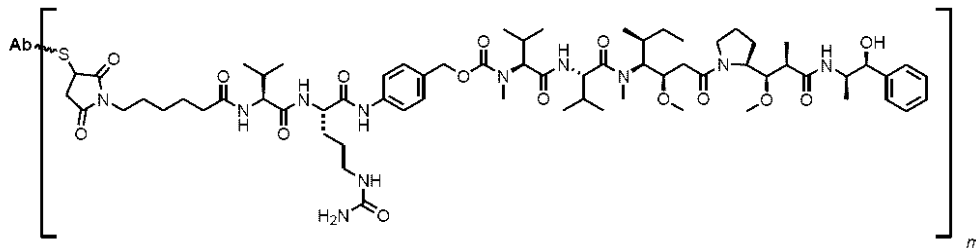
【請求項 54】

前記抗 G C C 抗体分子は、ヒトまたはヒト由来の軽鎖及び重鎖可変領域フレームワークをさらに含む、請求項 41 に記載の前記方法。

【請求項 55】

原発性または転移性結腸直腸癌の治療方法であって、前記方法は、そのような治療を必要とする患者に、式 (I-5) の免疫複合体またはその薬学的に許容される塩であって、

【化 27】



式中、A b は、抗 G C C 抗体分子またはその抗原結合フラグメントであり、m は 1 ~ 8 の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、

抗代謝剤と組み合わせて投与することを含み、前記免疫複合体及び抗代謝剤の量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である、前記方法。

【請求項 56】

前記抗 G C C 抗体分子は、

a) 次のアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖相補性決定領域 (C D R) :

V H C D R 1 G Y Y W S (配列番号 25)、

V H C D R 2 E I N H R G N T N D N P S L K S (配列番号 26)、及び

V H C D R 3 E R G Y T Y G N F D H (配列番号 27)、ならびに

b) 次のアミノ酸配列を含む 3 つの軽鎖 C D R :

V L C D R 1 R A S Q S V S R N L A (配列番号 28)、

V L C D R 2 G A S T R A T (配列番号 29)、及び

V L C D R 3 Q Q Y K T W P R T (配列番号 30) を含む、請求項 55 に記載

の前記方法。

【請求項 57】

m は、3 ~ 5 である、請求項 55 に記載の前記方法。

【請求項 58】

m は、約 4 である、請求項 55 に記載の前記方法。

【請求項 59】

前記原発性または転移性結腸直腸癌は、G C C 発現癌である、請求項 55 に記載の前記

方法。

【請求項 60】

前記癌は、単一の薬剤として投与した場合に免疫複合体の活性に耐性である、請求項 55 に記載の前記方法。

【請求項 61】

前記抗代謝剤は、フルオロウラシル（5-FU）、フロクスウリジン（5-FUdR）、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン（6-TG）、メルカプトプリン（6-MP）、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン（2-CD4）、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、及びペメトレキセドからなる群から選択される、請求項 55 に記載の前記方法。

10

【請求項 62】

前記抗代謝剤は、5-フルオロウラシルである、請求項 61 に記載の前記方法。

【請求項 63】

前記免疫複合体及び抗代謝剤は、同時に投与される、請求項 58 に記載の前記方法。

【請求項 64】

前記免疫複合体及び抗代謝剤は、逐次的に投与される、請求項 55 に記載の前記方法。

【請求項 65】

前記免疫複合体及び抗代謝剤は、別個の製剤に含まれる、請求項 55 に記載の前記方法。

20

【請求項 66】

前記抗 G C C 抗体分子は、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 55 に記載の前記方法。

【請求項 67】

前記抗 G C C 抗体分子は、IgG1 抗体である、請求項 55 に記載の前記方法。

【請求項 68】

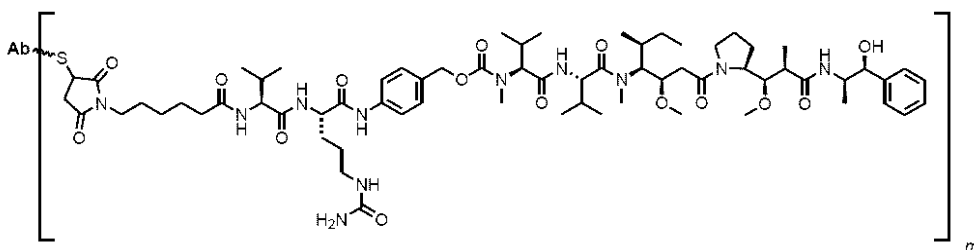
前記抗 G C C 抗体分子は、ヒトまたはヒト由来の軽鎖及び重鎖可変領域フレームワークをさらに含む、請求項 55 に記載の前記方法。

【請求項 69】

原発性または転移性膵臓癌の治療方法であって、前記方法は、そのような治療を必要とする患者に、式（I-5）の免疫複合体またはその薬学的に許容される塩であって、

30

【化 28】



式中、Ab は、抗 G C C 抗体分子またはその抗原結合フラグメントであり、m は 1 ~ 8 の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、

40

抗代謝剤と組み合わせて投与することを含み、前記免疫複合体及び抗代謝剤の量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である、前記方法。

【請求項 70】

前記抗 G C C 抗体分子は、

a) 次のアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖相補性決定領域（CDR）：

VH CDR1 GYYWS（配列番号 25）、

VH CDR2 EINHRGNTNDNPSLKS（配列番号 26）、及び

VH CDR3 ERGYTYGNFDH（配列番号 27）、ならびに

b) 次のアミノ酸配列を含む 3 つの軽鎖 CDR：

50

V L C D R 1 R A S Q S V S R N L A (配列番号 28)、
 V L C D R 2 G A S T R A T (配列番号 29)、及び
 V L C D R 3 Q Q Y K T W P R T (配列番号 30)を含む、請求項 69 に記載

の前記方法。

【請求項 71】

m は、3～5である、請求項 69 に記載の前記方法。

【請求項 72】

m は、約 4である、請求項 69 に記載の前記方法。

【請求項 73】

前記原発性または転移性膵臓癌は、G C C 発現癌である、請求項 69 に記載の前記方法 10

【請求項 74】

前記抗代謝剤は、フルオロウラシル (5-FU)、フロクスウリジン (5-FUdR)、
 メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン (6-TG)、メル
 カプトプリン (6-MP)、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラド
 リビン (2-CD A)、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリ
 ン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、及びペメトレキセドか
 らなる群から選択される、請求項 69 に記載の前記方法。

【請求項 75】

前記抗代謝剤は、ゲムシタビンである、請求項 74 に記載の前記方法。 20

【請求項 76】

前記免疫複合体及び抗代謝剤は、同時に投与される、請求項 73 に記載の前記方法。

【請求項 77】

前記免疫複合体及び抗代謝剤は、逐次的に投与される、請求項 69 に記載の前記方法。

【請求項 78】

前記免疫複合体及び抗代謝剤は、別個の製剤に含まれる、請求項 69 に記載の前記方法 。

【請求項 79】

前記抗 G C C 抗体分子は、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである
 、請求項 69 に記載の前記方法。 30

【請求項 80】

前記抗 G C C 抗体分子は、I g G 1 抗体である、請求項 69 に記載の前記方法。

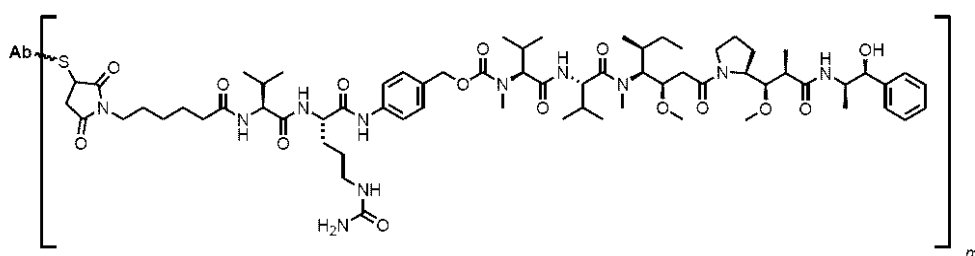
【請求項 81】

前記抗 G C C 抗体分子は、ヒトまたはヒト由来の軽鎖及び重鎖可変領域フレームワーク
 をさらに含む、請求項 69 に記載の前記方法。

【請求項 82】

式 (I-5) の免疫複合体、

【化 29】



40

またはその薬学的に許容される塩であって、式中、A b は、

a) 次のアミノ酸配列を含む 3 つの重鎖相補性決定領域 (C D R) :

V H C D R 1 G Y Y W S (配列番号 25)、

V H C D R 2 E I N H R G N T N D N P S L K S (配列番号 26)、及び

50

VH CDR3 ERGYTYGNFDH (配列番号27)、ならびに

b) 次のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖CDR:

VL CDR1 RASQSVSRNLA (配列番号28)、

VL CDR2 GASTRAT (配列番号29)、及び

VL CDR3 QQYKTWPRT (配列番号30)を含む、抗GCC抗体、

またはその抗原結合フラグメントであり、mは約4である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩と、消化器癌の治療のために前記免疫複合体をDNA損傷剤と組み合わせて投与するための説明書と、を含む、キット。

【請求項83】

前記消化器癌は、GCC発現癌である、請求項82に記載の前記キット。

10

【請求項84】

前記消化器癌は、単一の薬剤として投与される場合に免疫複合体の能力に耐性である、請求項82に記載の前記キット。

【請求項85】

前記消化器癌は、結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、及び食道癌、またはそれらの転移からなる群から選択される、請求項82に記載の前記キット。

【請求項86】

トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アルキル化剤、アルキル化様剤、アントラサイクリン、DNAインターカレーター、DNA副溝アルキル化剤、及び抗代謝剤からなる群から選択されるDNA損傷剤をさらに含む、請求項82に記載の前記キット。

20

【請求項87】

前記DNA損傷剤は、トポイソメラーゼI阻害剤、アルキル化様剤、または抗代謝剤である、請求項86に記載の前記キット。

【請求項88】

前記DNA損傷剤は、イリノテカン、トポテカン、及びカンプトテシンからなる群から選択されるトポイソメラーゼI阻害剤である、請求項86に記載の前記キット。

【請求項89】

前記トポイソメラーゼI阻害剤は、イリノテカンである、請求項88に記載の前記キット。

30

【請求項90】

前記消化器癌は、原発性または転移性結腸直腸癌である、請求項89に記載の前記キット。

【請求項91】

前記DNA損傷剤は、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、サトラプラチン、及びトリプラチンからなる群から選択されるアルキル化様剤である、請求項82に記載の前記キット。

【請求項92】

前記アルキル化様剤は、シスプラチンである、請求項91に記載の前記キット。

【請求項93】

前記消化器癌は、原発性または転移性結腸直腸癌である、請求項92に記載の前記キット。

40

【請求項94】

前記DNA損傷剤は、フルオロウラシル(5-FU)、フロクスウリジン(5-FUdR)、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン(6-TG)、メルカプトプリン(6-MP)、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン(2-CD4)、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、及びペメトレキセドからなる群から選択される抗代謝剤である、請求項82に記載の前記キット。

【請求項95】

50

前記抗代謝剤は、５－フルオロウラシルである、請求項 9 4 に記載の前記キット。

【請求項 9 6】

前記消化器癌は、原発性または転移性結腸直腸癌である、請求項 9 5 に記載の前記キット。

【請求項 9 7】

前記抗代謝剤は、ゲムシタビンである、請求項 9 4 に記載の前記キット。

【請求項 9 8】

前記消化器癌は、原発性または転移性膵臓癌である、請求項 9 7 に記載の前記キット。

【請求項 9 9】

前記免疫複合体及び前記 DNA 損傷剤の投与は、相乗的有効性をもたらす、請求項 1 のいずれかに記載の前記方法。 10

【請求項 1 0 0】

前記免疫複合体及び前記トポイソメラーゼ I 阻害剤の投与は、相乗的有効性をもたらす、請求項 2 7 に記載の前記方法。

【請求項 1 0 1】

前記免疫複合体及び前記アルキル化様剤の投与は、相乗的有効性をもたらす、請求項 4 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 0 2】

前記免疫複合体及び前記抗代謝剤の投与は、相乗的有効性をもたらす、請求項 5 5 に記載の前記方法。 20

【請求項 1 0 3】

前記癌は、単一の薬剤として投与した場合に免疫複合体の活性に耐性である、請求項 6 9 に記載の前記方法。

【請求項 1 0 4】

前記癌は、比較的高度または中等度の G C C 抗原密度を有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 0 5】

前記癌は、比較的高度または中等度の G C C 抗原密度を有する、請求項 2 7 に記載の前記方法。

【請求項 1 0 6】

前記癌は、比較的高度または中等度の G C C 抗原密度を有する、請求項 4 1 に記載の前記方法。 30

【請求項 1 0 7】

前記癌は、比較的高度または中等度の G C C 抗原密度を有する、請求項 5 5 に記載の前記方法。

【請求項 1 0 8】

前記癌は、比較的高度または中等度の G C C 抗原密度を有する、請求項 6 9 に記載の前記方法。

【請求項 1 0 9】

前記癌は、低度な G C C 抗原密度を有する、請求項 1 に記載の前記方法。 40

【請求項 1 1 0】

前記癌は、低度な G C C 抗原密度を有する、請求項 2 7 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 1】

前記癌は、低度な G C C 抗原密度を有する、請求項 4 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 2】

前記癌は、低度な G C C 抗原密度を有する、請求項 5 5 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 3】

前記癌は、低度な G C C 抗原密度を有する、請求項 6 9 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 4】

前記癌の前記 G C C 抗原密度を判定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の前記 50

方法。

【請求項 1 1 5】

前記癌の前記 G C C 抗原密度を判定するステップをさらに含む、請求項 2 7 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 6】

前記癌の前記 G C C 抗原密度を判定するステップをさらに含む、請求項 4 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 7】

前記癌の前記 G C C 抗原密度を判定するステップをさらに含む、請求項 5 5 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 8】

前記癌の前記 G C C 抗原密度を判定するステップをさらに含む、請求項 6 9 に記載の前記方法。

【請求項 1 1 9】

前記免疫複合体単独に対する前記癌の感受性を判定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 2 0】

前記免疫複合体単独に対する前記癌の感受性を判定するステップをさらに含む、請求項 2 7 に記載の前記方法。

【請求項 1 2 1】

前記免疫複合体単独に対する前記癌の感受性を判定するステップをさらに含む、請求項 4 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 2 2】

前記免疫複合体単独に対する前記癌の感受性を判定するステップをさらに含む、請求項 5 5 に記載の前記方法。

【請求項 1 2 3】

前記免疫複合体単独に対する前記癌の感受性を判定するステップをさらに含む、請求項 6 9 に記載の前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、配列表を含む。2 0 1 4 年 2 月 2 0 日に作成された該 A S C I I コピーは、M 2 0 5 1 - 7 0 3 4 W O _ S L . t x t という名称であり、サイズが 7 5 , 8 1 7 バイトである。

【0 0 0 2】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 3 年 2 月 2 8 日に提出された米国仮出願第 6 1 / 7 7 0 , 8 0 2 号及び 2 0 1 3 年 1 0 月 1 8 日に提出された米国仮出願第 6 1 / 8 9 2 , 8 5 4 号の利益を主張し、これらの米国仮出願の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 3】

本発明は、腫瘍学の分野に関し、癌、例えば、消化器癌を治療するための方法を提供する。より具体的には、本発明は、切断可能なリンカーによってモノメチルオーリスタチン E に複合体化された抗 G C C 抗体分子を D N A 損傷剤と組み合わせて投与することによって、癌、例えば消化器癌を治療するための方法に関する。本発明はまた、D N A 損傷剤と組み合わせて、切断可能なリンカーによってモノメチルオーリスタチン E に複合体化された抗 G C C 抗体分子を含む、薬学的組成物及びキットを提供する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

10

20

30

40

50

消化器癌には、結腸、直腸、胃、膵臓、食道、肛門、胆嚢、肝臓、及び胆管の腫瘍が含まれる。結腸直腸癌、胃癌、及び膵臓癌は、米国で最も一般的な消化器癌である。毎年275,000人を超える人々が、消化器癌と診断され、ほぼ136,000人がこれらの疾患により死亡する。American Cancer Societyは、消化器癌が、2009年に、新しい癌診断のうち19%を占め、すべての癌による死亡の24%超を占めたと推定する。

【0005】

多数の化学療法剤が、消化器癌を有する患者の治療に使用されている。しかしながら、薬物耐性の発生により、結腸直腸癌、胃癌、及び膵臓癌の多数の症例において、治療の成功が妨げられている。ほとんどの消化器癌による死亡は、肝臓及び他の器官への化学療法耐性（「化学耐性」）細胞の転移拡散によるものであり、したがって、転移は、予後不良の指標のままである。薬物耐性の2つの主要な形態は、以前に治療を受けていない腫瘍細胞が本質的に化学療法剤に非感受性である本質的耐性、及び治療を受けた腫瘍細胞が薬物曝露後に非感受性となる獲得耐性である。現在のところ、多くの研究グループが、化学療法におけるこの主要な問題の克服を目指し、薬物耐性の様々な機序について研究している。研究者らは、獲得薬物耐性が、宿主要因ならびに遺伝的及び遺伝子以外の変化、ならびに多数の分子事象が関与するという点で、多要因性であると判断した。耐性そのものは、薬物蓄積の低下、細胞内薬物分布の変化、薬物-標的相互作用の低減、解毒応答の増加、細胞周期の脱制御、損傷したDNAの修復の増加、及びアポトーシス応答の低減に起因する可能性がある。

【0006】

化学耐性の克服は、依然として治療上の課題のままである。グアニリルシクラーゼC（GCC）は、腸液の維持、電解質恒常性、及び細胞増殖において機能を果たす膜貫通細胞表面受容体であり、例えば、Carrithers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3018-3020 (2003)を参照されたい。GCCは、小腸、大腸、及び直腸を覆う粘膜細胞で発現される（Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39:171-181 (1996)）。GCC発現は、腸上皮細胞の悪性形質転換の際、すべての原発性及び転移性結腸直腸腫瘍（Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39:171-181 (1996)、Buc et al., Eur J Cancer 41:1618-1627 (2005)、Carrithers et al., Gastroenterology 107:1653-1661 (1994)）、原発性及び転移性胃癌及び食道腫瘍の大半、ならびに原発性及び転移性膵臓癌のサブセットにおける発現とともに、維持される。GCCは、消化器悪性腫瘍の大半におけるその解剖学的に区分化された表面発現のため、新しい標的治療薬の発見のための魅力的な標的である。は、転移性結腸直腸癌患者に由来する原発性ヒト腫瘍外植片のマウス異種移植片モデルにおいて単一剤活性を有することが示されている、抗GCC抗体-薬物複合体（「ADC」、本明細書においてしばしば「免疫複合体」と称される）について記載している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許出願公開第2011/0110936号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Carrithers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3018-3020 (2003)

【非特許文献2】Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39:171-181 (1996)

【非特許文献3】Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39:171-181 (1996)

【非特許文献4】Buc et al. Eur J Cancer 41:1618-1627 (2005)

【非特許文献5】Carrithers et al., Gastroenterology 107:1653-1661 (1994)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

切断可能なリンカー、例えば、プロテアーゼ切断可能リンカーによって強力な微小管阻害剤であるモノメチルオーリスタチンE (MMAE) に複合体化された抗GCC抗体分子を有し、DNA損傷剤と組み合わせて投与される免疫複合体が、消化器悪性腫瘍に対する相乗的活性を提供することが発見された。驚くべきことに、そのような抗GCC免疫複合体は、消化器腫瘍を、単独で投与される場合のそのような免疫複合体に対するその腫瘍の感受性に関わらず、DNA損傷剤活性に対して感受性にする。組み合わせ治療は、腫瘍体積を相乗的に低減させ、さらに、いずれかの薬剤単独での活性と比較して、予想外に長期間にわたって腫瘍の再成長を防止し、単一剤としての免疫複合体活性に耐性である腫瘍に、そのような耐性が本質的なものか獲得されたものかに関係なく、魅力的な治療の選択肢を提供する。

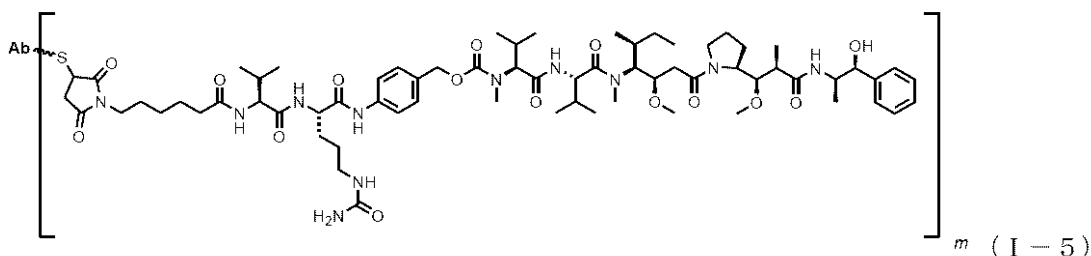
【0010】

一態様において、本発明は、癌、例えば、消化器癌を治療するための方法であって、プロテアーゼ切断可能リンカーを介して強力な微小管阻害剤であるモノメチルオーリスタチンE (MMAE) に複合体化された抗GCC抗体分子を含む免疫複合体を、DNA損傷剤と組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行う方法に関する。免疫複合体及びDNA損傷剤のそれぞれは、2つの薬剤を組み合わせる場合に治療的に有効な量で投与される。ある特定の実施形態において、本明細書に提供される方法によって治療される癌、例えば、消化器癌は、プロテアーゼ切断可能リンカーを介してMMAEに複合体化された抗GCC抗体分子を含む免疫複合体の活性に耐性であるか、またはそれが無効であるものである。

【0011】

本発明の一実施形態において、DNA損傷剤と組み合わせて投与される免疫複合体は、以下の式I-5

【化1】



を有するか、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

Abは、抗GCC抗体分子であり、

mは、1～8の整数である。本発明の実施形態において、mは、3～5の整数である。具体的な実施形態において、mは、約4である。

ある特定の実施形態において、式(I-5)の免疫複合体は、抗GCC抗体分子を含み、これは、

a) 次のアミノ酸配列を含む3つの重鎖相補性決定領域(CDR)：

VH CDR1 GYYWS (配列番号25)、

VH CDR2 EINHRGNTNDNPSLKS (配列番号26)、及び

VH CDR3 ERGYTYGNFDH (配列番号27)、

ならびに

b) 次のアミノ酸配列を含む3つの軽鎖CDR:

VL CDR1 RASQSVSRNLA (配列番号28)、

VL CDR2 GASTRAT (配列番号29)、及び

VL CDR3 QQYKTWPRT (配列番号30)を含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、抗GCC抗体分子は、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、抗体分子である。いくつかの実施形態において、抗GCC抗体分子は、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、軽鎖k定常領域、またはそのフラグメント、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び重鎖IgG1もしくはIgG2定常領域またはそのフラグメントを含む、抗体分子である。

10

【0013】

一実施形態において、抗GCC抗体分子は、本明細書に記載される5F9抗体分子である。

【0014】

式(I-5)の免疫複合体と組み合わせて投与されるDNA損傷剤は、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アルキル化剤、アルキル化様剤、アントラサイクリン、DNAインターカレーター、DNA副溝アルキル化剤、または抗代謝剤であり得る。本発明の免疫複合体及びDNA損傷剤を含む組み合わせ治療は、癌に対して治療的相乗効果を有し得、これらの化学療法剤と関連する副作用を低減させ得る。

20

【0015】

本発明の方法における使用に好適なトポイソメラーゼI阻害剤の例としては、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン、SN-38、ラメラリンD (lame llarin D)、及びそれらの任意の類似体、誘導体、または代謝産物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0016】

本発明の方法における使用に好適なトポイソメラーゼII阻害剤の例としては、エトポシド、テニポシド、アムサクリン、及びミトキサントロン、ならびにそれらの任意の類似体、誘導体、及び代謝産物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0017】

アルキル化剤は、アルキル基を水素イオンと置換する能力を有する多官能性化合物である。アルキル化剤の例としては、ビスクロロエチルアミン (ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタード)、アジリジン (例えば、チオテパ)、アルキルアルコンスルホン酸塩 (例えば、プスルファン)、ニトロソ尿素 (例えば、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、セムスチン、ウラムスチン)、非古典的アルキル化剤 (アルトレタミン、ダカルバジン、及びプロカルバジン)、ならびに白金化合物 (カルボプラチン及びシスプラチン) が挙げられるがこれらに限定されない。これらの化合物は、リン酸基、アミノ基、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基、カルボキシル基、及びイミダゾール基と反応する。生理学的条件下において、これらの薬物は、電離し、正に荷電したイオンを産生し、これが感受性の核酸及びタンパク質に結合し、細胞周期の停止及び/または細胞死をもたらす。本発明の方法における使用に好適なアルキル化剤 (ak l y l a t i n g a g e n t) の他の例としては、マイトマイシンC、ジプロモマンニトール、四硝酸塩、ミトゾロミド、テモゾロミド、及びそれらの任意の類似体、誘導体、または代謝産物が挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

【0018】

本発明の方法における使用に好適なアルキル化様剤の例としては、白金化合物、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、トリプラチン、及びそれらの任意の類似体、誘導体、または代謝産物が挙げられるがこれらに限定されない。

50

【0019】

本発明の方法における使用に好適なアントラサイクリンの例としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン、及びそれらの任意の類似体、誘導体、または代謝産物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0020】

本発明の方法における使用に好適なDNAインターカレーター及びフリーラジカル生成物質の例としては、ブレオマイシンが挙げられるがこれに限定されない。

【0021】

本発明の方法における使用に好適なDNA副溝アルキル化剤の例としては、デュオカルマイシン、及びその任意の類似体または誘導体、例えば、米国特許第5,101,038号、同第5,641,780号、同第5,187,186号、同第5,070,092号、同第5,703,080号、同第5,070,092号、同第5,641,780号、同第5,101,038号、同第5,084,468号、同第5,739,350号、同第4,978,757号、同第5,332,837号、同第4,912,227号、同第5,985,908号、同第6,060,608号、同第6,262,271号、同第6,281,354号、同第6,310,209号、同第6,486,326号、及び同第6,548,530号、PCT公開第WO96/10405号、同第WO97/32850号、同第WO97/45411号、同第WO98/52925号、同第WO99/19298号、同第WO99/29642号、同第WO01/83482号、同第WO97/12862号、同第WO03/022806号、及び同第WO04/101767号、ならびに欧州出願公開第0537575A1号に記載されるもの（これらのそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、ならびにピロロベンゾジアゼペン（pyrrol benzodiazepene）化合物（「PBD」）、例えば、国際公開第WO2000/012508号、同第WO2011/130598号、同第WO2011/130616号、同第WO2005/085251号、同第WO2010/043880号、同第WO2012/003266号、同第WO2000/012506号、同第WO2005/023814号に記載されるもの（これらのそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0022】

抗代謝剤は、癌細胞の生理学及び増殖に不可欠な代謝プロセスを遮断する薬物群である。活発に増殖している癌細胞は、大量の核酸、タンパク質、脂質、及び他の肝要な細胞構成要素の継続的な合成を必要とする。抗代謝剤の多くは、プリンもしくはピリミジンヌクレオシドの合成を阻害するか、またはDNA複製の酵素を阻害する。一部の抗代謝剤は、リボヌクレオシド及びRNAの合成、ならびに／またはアミノ酸代謝及びタンパク質合成も同様に遮断する。肝要な細胞構成要素の合成を遮断することによって、抗代謝剤は、癌細胞の成長を遅延または停止させることができる。本発明の方法における使用に好適な抗代謝剤の例としては、フルオロウラシル（5-FU）、フロクスウリジン（5-FUdR）、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン（6-TG）、メルカプトプリン（6-MP）、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン（2-CDA）、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、ペメトレキセド、及びそれらの任意の類似体、誘導体、または代謝産物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0023】

いくつかの実施形態において、消化器癌は、GCC発現消化器癌である。GCC発現消化器癌の例としては、原発性または転移性結腸直腸癌、原発性または転移性胃癌、原発性または転移性膵臓癌、及び原発性または転移性食道癌が挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態において、消化器癌は、単一剤として投与した場合に式（I-5）の免疫複合体に耐性である。

10

20

30

40

50

【0024】

1つの具体的な実施形態において、本発明は、消化器癌の治療を、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば5F9であり、 m が3～5の整数（例えば4）である、免疫複合体を、DNA損傷剤と組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、DNA損傷剤はトポイソメラーゼI阻害剤であり、免疫複合体及びトポイソメラーゼI阻害剤のそれぞれは、2つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。

【0025】

別の具体的な実施形態において、本発明は、消化器癌の治療を、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば5F9であり、 m が3～5の整数（例えば4）である、免疫複合体を、トポイソメラーゼI阻害剤と組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、トポイソメラーゼI阻害剤はイリノテカンであり、免疫複合体及びイリノテカンのそれぞれは、2つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。

10

【0026】

さらに別の具体的な実施形態において、本発明は、原発性または転移性結腸直腸癌の治療を、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば5F9であり、 m が3～5の整数（例えば4）である、免疫複合体を、イリノテカンと組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、免疫複合体及びイリノテカンのそれぞれは、2つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。具体的な実施形態において、免疫複合体及びイリノテカンは、同時または逐次的に投与される別個の製剤に含まれる。

20

【0027】

さらに別の具体的な実施形態において、本発明は、消化器癌の治療を、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9であり、 m が3～5の整数（例えば4）である、免疫複合体を、アルキル化様剤と組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、免疫複合体及びアルキル化様剤のそれぞれは、2つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。例えば、アルキル化様剤は、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、またはトリプラチンである。

30

【0028】

具体的な実施形態において、本発明は、原発性または転移性結腸直腸癌の治療を、式（I-5）による免疫複合体（ここで、抗GCC抗体分子は、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9であり、 m は、3～5の整数（例えば、4）であるを、シスプラチンまたはオキサリプラチンと組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、免疫複合体及びシスプラチンもしくはオキサリプラチンいずれかはそれぞれ、2つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。具体的な実施形態において、免疫複合体及びシスプラチンまたはオキサリプラチンは、同時または逐次的に投与される別個の製剤に含まれる。

40

【0029】

さらに別の具体的な実施形態において、本発明は、消化器癌の治療を、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9であり、 m が3～5の整数（例えば4）である、免疫複合体を、抗代謝剤と組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、免疫複合体及び抗代謝剤のそれぞれは、2つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。例えば、抗代謝剤は、フルオロウラシ

50

ル（５－ＦＵ）、フロクスウリジン（５－ＦＵｄＲ）、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン（６－ＴＧ）、メルカプトプリン（６－ＭＰ）、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン（２－ＣＤＡ）、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、またはペメトレキセドである。

【００３０】

１つの具体的な実施形態において、本発明は、原発性または転移性結腸直腸癌の治療を、式（Ｉ－５）による免疫複合体であって、抗ＧＣＣ抗体分子が本明細書に記載される抗ＧＣＣ抗体分子、例えば５Ｆ９であり、 m が３～５の整数（例えば４）である、免疫複合体を、５－フルオロウラシルと組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、免疫複合体及び５－フルオロウラシルのそれぞれは、２つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。具体的な実施形態において、免疫複合体及び５－フルオロウラシルは、同時または逐次的に投与される別個の製剤に含まれる。

10

【００３１】

別の具体的な実施形態において、本発明は、原発性または転移性結腸直腸癌の治療を、式（Ｉ－５）による免疫複合体であって、抗ＧＣＣ抗体分子が本明細書に記載される抗ＧＣＣ抗体分子、例えば５Ｆ９であり、 m が３～５の整数（例えば４）である、免疫複合体を、ゲムシタビンと組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することによって行うための方法に関し、ここで、免疫複合体及びゲムシタビンのそれぞれは、２つの薬剤を組み合わせて使用した場合に治療的に有効である量で投与される。具体的な実施形態において、免疫複合体及びゲムシタビンは、同時または逐次的に投与される別個の製剤に含まれる。

20

【００３２】

本発明の実施形態において、免疫複合体の抗ＧＣＣ抗体分子は、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである。別の実施形態において、免疫複合体の抗ＧＣＣ抗体分子は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ２抗体である。さらに別の実施形態において、免疫複合体の抗ＧＣＣ抗体分子は、ヒトまたはヒト由来の軽鎖及び重鎖可変領域フレームワークを含む。具体的な実施形態において、本発明の抗ＧＣＣ抗体分子は、ヒトまたはヒト由来の軽鎖及び重鎖可変領域フレームワークを含む、単離モノクローナルＩｇＧ１抗体またはその抗原結合フラグメントである。

30

【００３３】

ある特定の実施形態において、免疫複合体及びＤＮＡ損傷剤は、同時に投与される。他の特定の実施形態において、免疫複合体及びＤＮＡ損傷剤は、逐次的に投与される。免疫複合体及びＤＮＡ損傷剤は、別個の製剤として投与され得る。あるいは、免疫複合体及びＤＮＡ損傷剤は、各剤の治療的に有効な合計量の単一剤形として共製剤化される。

【００３４】

一実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって３週間に１回、例えば、同じ期間にわたって週１回、週２回、または週３回投与されるＤＮＡ損傷剤と組み合わせて投与される。

40

【００３５】

一実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって３週間に１回、例えば、同じ期間にわたって３週間に１回投与されるＤＮＡ損傷剤と組み合わせて投与される。

【００３６】

一実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって３週間に１回、例えば、同じ期間にわたって毎週３日投薬／４日休薬で投与されるＤＮＡ損傷剤と組み合わせて投与される。

【００３７】

一実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって３週間に１回、例えば、同じ期間にわたって毎週２日投薬／５日休薬で投与されるＤＮＡ損傷剤と組み合わせて

50

投与される。

【0038】

別の実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって2週間に1回、例えば、同じ期間にわたって週2回または3回投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

【0039】

さらに別の実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば、同じ期間にわたって週2回投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

【0040】

なおも別の実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば、同じ期間にわたって毎週1日目及び3日目に投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

10

【0041】

さらに別の実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば、同じ期間にわたって週3回投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

【0042】

別の実施形態において、免疫複合体 (immunoc conjugate) は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば同じ期間の第1週目に1回投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

【0043】

別の実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば同じ期間の第1及び第2週目に週1回投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

20

【0044】

一実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば、同じ期間にわたって毎週3日投薬／4日休薬で投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

【0045】

一実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば、同じ期間にわたって毎週2日投薬／5日休薬で投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

30

【0046】

一実施形態において、免疫複合体は、ある特定の期間にわたって週1回、例えば、同じ期間にわたって3週間に1回投与されるDNA損傷剤と組み合わせて投与される。

【0047】

さらに別の実施形態において、DNA損傷剤の投薬スケジュールは、1週間につき少なくとも1回、免疫複合体の投薬スケジュールと重なる。他の実施形態において、DNA損傷剤の投薬スケジュールは、免疫複合体の投薬スケジュールとは重ならず、結果として各剤は週の異なる日に投与される。

【0048】

一態様において、本発明は、癌、例えば消化器癌の治療を、そのような治療を必要とする対象において行うことに使用するための、少なくとも1つの医薬品を含むキットに関する。一実施形態において、キットは、式(I-5)による免疫複合体を含む医薬品と、免疫複合体を、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アルキル化剤、アルキル化様剤、アントラサイクリン、DNAインターカレーター、DNA副溝アルキル化剤、または抗代謝剤から選択されるDNA損傷剤と組み合わせて投与するための説明書とを含む。ある実施形態において、DNA損傷剤は、本明細書に記載されるDNA損傷剤である。ある特定の実施形態において、キットは、式(I-5)による免疫複合体を含む医薬品と、消化器癌を治療するために免疫複合体をトポイソメラーゼI阻害剤と組み合わせて投与するための説明書とを含む。具体的な実施形態において、免疫複合体と組み合わせて投与するためのトポイソメラーゼI阻害剤は、イリノテカンである。例えば、キット

40

50

は、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば5F9であり、 m が3～5の整数（例えば、4）である、免疫複合体を含む医薬品と、消化器癌、例えば、結腸直腸癌を治療するために免疫複合体をイリノテカンと組み合わせて投与するための説明書とを含む。いくつかの実施形態において、説明書は、本明細書に記載される用量または投薬スケジュールを含む。いくつかの実施形態において、キットは、イリノテカンをさらに含む。

【0049】

別のある特定の実施形態において、キットは、式（I-5）による免疫複合体を含む医薬品と、消化器癌を治療するために免疫複合体をアルキル化様剤と組み合わせて投与するための説明書とを含む。具体的な実施形態において、免疫複合体と組み合わせて投与するためのアルキル化様剤は、シスプラチンまたはオキサリプラチンである。例えば、キットは、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば5F9であり、 m が3～5の整数（例えば、4）である、免疫複合体を含む医薬品と、消化器癌、例えば、結腸直腸癌を治療するために免疫複合体をシスプラチンまたはオキサリプラチンと組み合わせて投与するための説明書とを含む。いくつかの実施形態において、説明書は、本明細書に記載される用量または投薬スケジュールを含む。いくつかの実施形態において、キットは、シスプラチンまたはオキサリプラチンをさらに含む。

10

【0050】

さらに別のある特定の実施形態において、キットは、式（I-5）による免疫複合体を含む医薬品と、消化器癌を治療するために免疫複合体を抗代謝剤と組み合わせて投与するための説明書とを含む。具体的な実施形態において、免疫複合体と組み合わせて投与するための抗代謝剤は、5-フルオロウラシルである。例えば、キットは、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば5F9であり、 m が3～5の整数（例えば、4）である、免疫複合体を含む医薬品と、消化器癌、例えば、結腸直腸癌の治療のために免疫複合体を5-フルオロウラシルと組み合わせて投与するための説明書とを含む。いくつかの実施形態において、説明書は、本明細書に記載される用量または投薬スケジュールを含む。いくつかの実施形態において、キットは、5-フルオロウラシルをさらに含む。

20

【0051】

さらに別のある特定の実施形態において、キットは、式（I-5）による免疫複合体を含む医薬品と、消化器癌を治療するために免疫複合体を抗代謝剤と組み合わせて投与するための説明書とを含む。具体的な実施形態において、免疫複合体と組み合わせて投与するための抗代謝剤は、ゲムシタビンである。例えば、キットは、式（I-5）による免疫複合体であって、抗GCC抗体分子が本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば5F9であり、 m が3～5の整数（例えば、4）である、免疫複合体を含む医薬品と、膵臓癌の治療のために免疫複合体をゲムシタビンと組み合わせて投与するための説明書とを含む。いくつかの実施形態において、説明書は、本明細書に記載される用量または投薬スケジュールを含む。いくつかの実施形態において、キットは、ゲムシタビンをさらに含む。

30

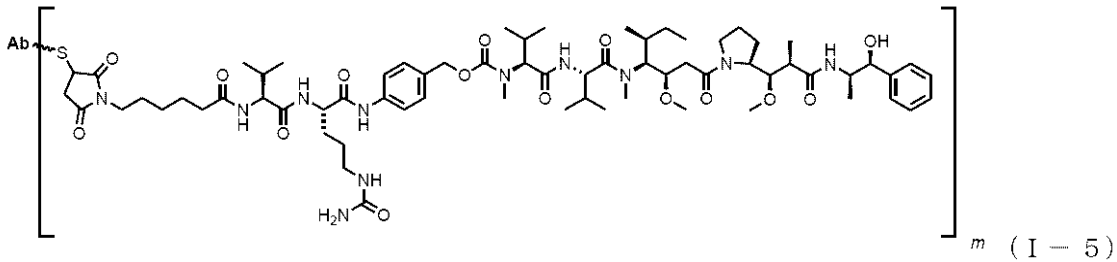
【0052】

いくつかの態様において、本開示は、結腸直腸癌を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に、式（I-5）の免疫複合体

40

【0053】

【化 2】



10

【0054】

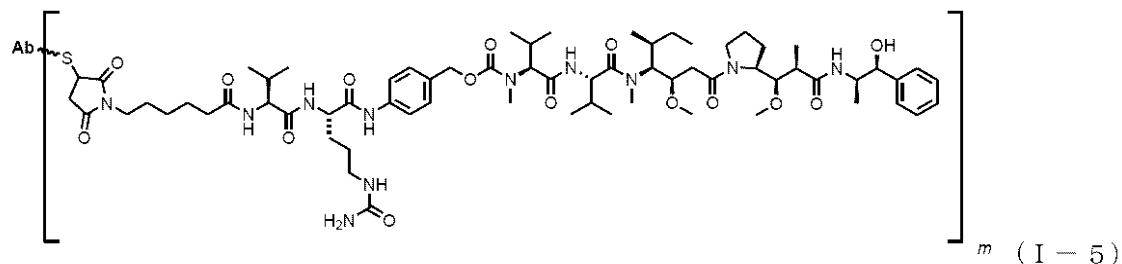
またはその薬学的に許容される塩であって、式中、Abは、a) 以下のアミノ酸配列：VH CDR1 GYYWS (配列番号25)；VH CDR2 EINHRGNTND NPSLKS (配列番号26)；及びVH CDR3 ERGYTYGNFDH (配列番号27)を含む3つの重鎖相補性決定領域(CDR)、ならびにb) 以下のアミノ酸配列：VL CDR1 RASQSVSRNLA (配列番号28)；VL CDR2 GAS TRAT (配列番号29)；及びVL CDR3 QQYKTWPRT (配列番号30)を含む3つの軽鎖CDRを含む、抗GCC抗体分子、例えば、5F9であり、mは、1～8、例えば、3～5の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、イリノテカンと組み合わせて投与することを含み、免疫複合体及びイリノテカンの量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である(例えば、相乗的である)、方法を提供する。結腸直腸癌は、免疫複合体単独に対して強力から中等度の感受性もしくは強力な感受性を有し得るか、または免疫複合体単独に耐性であり得る。結腸直腸癌は、比較的高度、中等度、または低度なGCC抗原密度を有し得る。

20

【0055】

いくつかの態様において、本開示は、結腸直腸癌を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に、式(I-5)の免疫複合体

【化 3】



30

【0056】

またはその薬学的に許容される塩であって、式中、Abは、a) 以下のアミノ酸配列：VH CDR1 GYYWS (配列番号25)；VH CDR2 EINHRGNTND NPSLKS (配列番号26)；及びVH CDR3 ERGYTYGNFDH (配列番号27)を含む3つの重鎖相補性決定領域(CDR)；ならびにb) 以下のアミノ酸配列：VL CDR1 RASQSVSRNLA (配列番号28)；VL CDR2 GAS TRAT (配列番号29)；及びVL CDR3 QQYKTWPRT (配列番号30)を含む3つの軽鎖CDRを含む、抗GCC抗体分子、例えば、5F9であり、mは、1～8、例えば、3～5の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、シスプラチンと組み合わせて投与することを含み、免疫複合体及びシスプラチンの量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である(例えば、相加的である)、方法を提供する。結腸直腸癌は、免疫複合体単独に対して強力な感受性を有し得る。結腸直腸癌は、比較的高度なGCC抗原密度を有し得る。

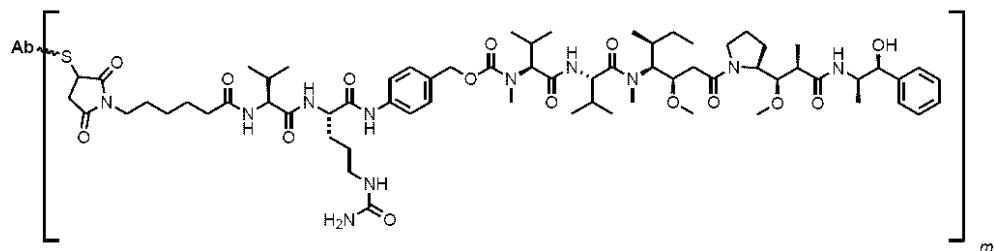
40

50

【0057】

いくつかの態様において、本開示は、結腸直腸癌を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に、式（I-5）の免疫複合体

【化4】



10

(I-5)

【0058】

またはその薬学的に許容される塩であって、式中、Abは、a) 以下のアミノ酸配列：VH CDR1 GYYWS（配列番号25）；VH CDR2 EINHRGNTND NPSLKS（配列番号26）；及びVH CDR3 ERGYTYGNFDH（配列番号27）を含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR）、ならびにb) 以下のアミノ酸配列：VL CDR1 RASQSVSRNLA（配列番号28）；VL CDR2 GAS TRAT（配列番号29）；及びVL CDR3 QQYKTWPRT（配列番号30）を含む3つの軽鎖CDRを含む、抗GCC抗体分子、例えば、5F9であり、mは、1～8、例えば、3～5の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、5-フルオロウラシルと組み合わせて投与することを含み、免疫複合体及び5-フルオロウラシルの量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である（例えば、相乗的である）、方法を提供する。結腸直腸癌は、免疫複合体単独に対して強力から中等度の感受性を有し得る。結腸直腸癌は、低度なGCC抗原密度を有し得る。

20

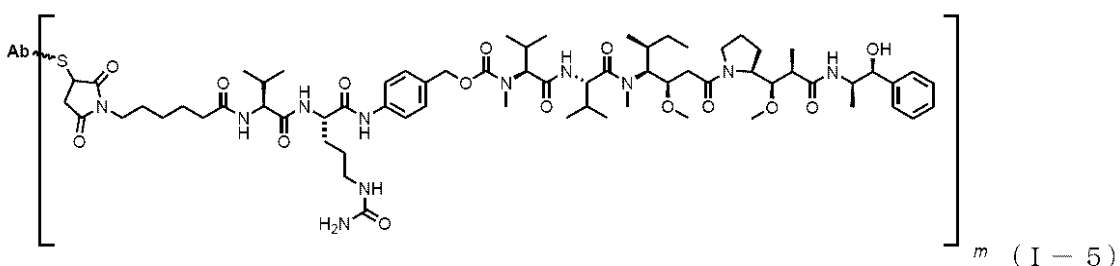
【0059】

いくつかの態様において、本開示は、膵臓癌を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に、式（I-5）の免疫複合体

【0060】

30

【化5】



40

【0061】

またはその薬学的に許容される塩であって、式中、Abは、a) 以下のアミノ酸配列：VH CDR1 GYYWS（配列番号25）；VH CDR2 EINHRGNTND NPSLKS（配列番号26）；及びVH CDR3 ERGYTYGNFDH（配列番号27）を含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR）；ならびにb) 以下のアミノ酸配列：VL CDR1 RASQSVSRNLA（配列番号28）；VL CDR2 GAS TRAT（配列番号29）；及びVL CDR3 QQYKTWPRT（配列番号30）を含む3つの軽鎖CDRを含む、抗GCC抗体分子、例えば、5F9であり、mは、1～8、例えば、3～5の整数である、免疫複合体またはその薬学的に許容される塩を、ゲム

50

シタピンと組み合わせて投与することを含み、免疫複合体及びゲムシタピンの量は、組み合わせて使用した場合に治療的に有効である（例えば、相加的である）、方法を提供する。結腸直腸癌は、免疫複合体単独に対して感受性であり得る。

【0062】

本明細書に記載されるすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0063】

本明細書に開示される本発明の利点は、以下の説明、添付の図面、及び特許請求の範囲から明らかとなるであろう。さらに、本明細書に記載される種々の実施形態の特徴は、相互排他的でなく、種々の組み合わせ及び順序で存在し得ることを理解されたい。

10

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】14日に1回のスケジュールにおいて5F9v c-MMAF、-DM1、及び-DM4で処置した293-GCC#2保持SCIDマウスにおける腫瘍成長を示す。

【図2】0.9%NaCl、209抗体(40mg/kg)、または5F9抗体(10もしくは40mg/kg)で処置したマウスの接種後(p.i)41日目における肺重量を示す。

【図3】5F9抗体で処置したCT26-hGCC腫瘍保持マウスの生存曲線を示す。

【図4】GCCオルソログの抗体交差反応性を試験するためのELISA結合アッセイを示す。

20

【図5A】GCCをトランスフェクトしたHEK293細胞に由来する腫瘍異種移植片(図5A)及びmCRC患者試料に由来する原発性ヒト腫瘍異種移植片(図5B~5E)における広範なGCC発現を示す免疫組織化学スライドである。

【図5B】GCCをトランスフェクトしたHEK293細胞に由来する腫瘍異種移植片(図5A)及びmCRC患者試料に由来する原発性ヒト腫瘍異種移植片(図5B~5E)における広範なGCC発現を示す免疫組織化学スライドである。

【図5C】GCCをトランスフェクトしたHEK293細胞に由来する腫瘍異種移植片(図5A)及びmCRC患者試料に由来する原発性ヒト腫瘍異種移植片(図5B~5E)における広範なGCC発現を示す免疫組織化学スライドである。

【図5D】GCCをトランスフェクトしたHEK293細胞に由来する腫瘍異種移植片(図5A)及びmCRC患者試料に由来する原発性ヒト腫瘍異種移植片(図5B~5E)における広範なGCC発現を示す免疫組織化学スライドである。

30

【図5E】GCCをトランスフェクトしたHEK293細胞に由来する腫瘍異種移植片(図5A)及びmCRC患者試料に由来する原発性ヒト腫瘍異種移植片(図5B~5E)における広範なGCC発現を示す免疫組織化学スライドである。

【図6A】異なるレベルのGCC抗原密度を有するmCRC患者試料に由来する異なる腫瘍異種移植片モデルにおける、プロテアーゼ切断可能リンカーによって強力な微小管阻害剤MMAEに複合体化された抗GCC mAbを有する免疫複合体によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を示すグラフである。図6Aは、中等度から高度なGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片(PHTX-09c)におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Bは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片(PHTX-17c)におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6C及び6Dは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片(PHTX-11c)における種々の用量の免疫複合体及び投薬スケジュールでのインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Eは、低いGCC発現を有する原発性ヒト腫瘍異種移植片(PHTX-21c)におけるインビボ抗腫瘍活性を示す。

40

【図6B】異なるレベルのGCC抗原密度を有するmCRC患者試料に由来する異なる腫瘍異種移植片モデルにおける、プロテアーゼ切断可能リンカーによって強力な微小管阻害剤MMAEに複合体化された抗GCC mAbを有する免疫複合体によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を示すグラフである。図6Aは、中等度から高度なGCC発現レベルを

50

有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-09c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Bは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-17c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6C及び6Dは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-11c）における種々の用量の免疫複合体及び投薬スケジュールでのインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Eは、低いGCC発現を有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-21c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示す。

【図6C】異なるレベルのGCC抗原密度を有するmCRC患者試料に由来する異なる腫瘍異種移植片モデルにおける、プロテアーゼ切断可能リンカーによって強力な微小管阻害剤MMAEに複合体化された抗GCC mAbを有する免疫複合体によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を示すグラフである。図6Aは、中等度から高度なGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-09c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Bは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-17c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6C及び6Dは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-11c）における種々の用量の免疫複合体及び投薬スケジュールでのインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Eは、低いGCC発現を有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-21c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示す。

【図6D】異なるレベルのGCC抗原密度を有するmCRC患者試料に由来する異なる腫瘍異種移植片モデルにおける、プロテアーゼ切断可能リンカーによって強力な微小管阻害剤MMAEに複合体化された抗GCC mAbを有する免疫複合体によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を示すグラフである。図6Aは、中等度から高度なGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-09c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Bは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-17c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6C及び6Dは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-11c）における種々の用量の免疫複合体及び投薬スケジュールでのインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Eは、低いGCC発現を有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-21c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示す。

【図6E】異なるレベルのGCC抗原密度を有するmCRC患者試料に由来する異なる腫瘍異種移植片モデルにおける、プロテアーゼ切断可能リンカーによって強力な微小管阻害剤MMAEに複合体化された抗GCC mAbを有する免疫複合体によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を示すグラフである。図6Aは、中等度から高度なGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-09c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Bは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-17c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示し、図6C及び6Dは、中等度のGCC発現レベルを有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-11c）における種々の用量の免疫複合体及び投薬スケジュールでのインビボ抗腫瘍活性を示し、図6Eは、低いGCC発現を有する原発性ヒト腫瘍異種移植片（PHTX-21c）におけるインビボ抗腫瘍活性を示す。

【図7】PHTX-11c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおけるGCCの免疫組織化学的検出を示し、図7Bは、PHTX-11cモデルにおける免疫複合体の投与後7日目におけるプロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAbを有する免疫複合体の免疫組織学的検出を示す。

【図8A】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）を各剤単独及び組み合わせで用いて処置したPHTX-09c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図8Bは、PHTX-09cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図8Cは、それぞれ単独及び組み合わせで

10

20

30

40

50

の免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-09cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図8B】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-09c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図8Bは、PHTX-09cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図8Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-09cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

10

【図8C】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-09c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図8Bは、PHTX-09cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図8Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-09cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図9A】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-21c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図9Bは、PHTX-21cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図9Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-21cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

20

【図9B】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-21c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図9Bは、PHTX-21cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図9Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-21cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

30

【図9C】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-21c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図9Bは、PHTX-21cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図9Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-21cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

40

【図10A】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-17c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図10Bは、PHTX-17cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤(CPT-11)によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図10Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-17cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

50

【図10B】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-17c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図10Bは、PHTX-17cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図10Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-17cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図10C】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-17c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図10Bは、PHTX-17cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図10Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-17cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図11A】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-11c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図11Bは、PHTX-11cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図11Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-11cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図11B】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-11c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図11Bは、PHTX-11cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図11Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-11cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図11C】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-11c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図11Bは、PHTX-11cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（CPT-11）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図11Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤によって処置した後のPHTX-11cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図12A】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（シスプラチン）を各剤単独及び組み合わせて用いて処置したPHTX-09c原発性ヒトmCRC腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図12Bは、PHTX-09cモデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（シスプラチン）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図12Cは、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤（シスプラチン）によって処置した後のPHTX-09cモデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図12B】プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCCmAbを有する免疫複合体及びDNA損傷剤（シスプラチン）を各剤単独及び組み合わ

10

20

30

40

50

せて用いて処置した P H T X - 0 9 c 原発性ヒト m C R C 腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図 1 2 B は、P H T X - 0 9 c モデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（シスプラチン）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図 1 2 C は、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（シスプラチン）によって処置した後の P H T X - 0 9 c モデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図 1 2 C】プロテアーゼ切断可能リンカーによって M M A E に複合体化された抗 G C C m A b を有する免疫複合体及び D N A 損傷剤（シスプラチン）を各剤単独及び組み合わせで用いて処置した P H T X - 0 9 c 原発性ヒト m C R C 腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図 1 2 B は、P H T X - 0 9 c モデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（シスプラチン）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図 1 2 C は、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（シスプラチン）によって処置した後の P H T X - 0 9 c モデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図 1 3 A】プロテアーゼ切断可能リンカーによって M M A E に複合体化された抗 G C C m A b を有する免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）を各剤単独及び組み合わせで用いて処置した P H T X - 2 1 c 原発性ヒト m C R C 腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図 1 3 B は、P H T X - 2 1 c モデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図 1 3 C は、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）によって処置した後の P H T X - 2 1 c モデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図 1 3 B】プロテアーゼ切断可能リンカーによって M M A E に複合体化された抗 G C C m A b を有する免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）を各剤単独及び組み合わせで用いて処置した P H T X - 2 1 c 原発性ヒト m C R C 腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図 1 3 B は、P H T X - 2 1 c モデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図 1 3 C は、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）によって処置した後の P H T X - 2 1 c モデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図 1 3 C】プロテアーゼ切断可能リンカーによって M M A E に複合体化された抗 G C C m A b を有する免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）を各剤単独及び組み合わせで用いて処置した P H T X - 2 1 c 原発性ヒト m C R C 腫瘍異種移植片モデルにおける平均体重変化パーセントを示すグラフであり、図 1 3 B は、P H T X - 2 1 c モデルにおける、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフであり、図 1 3 C は、それぞれ単独及び組み合わせでの免疫複合体及び D N A 損傷剤（5 - F U）によって処置した後の P H T X - 2 1 c モデルにおける腫瘍再成長を示すグラフである。

【図 1 4】G C C 発現に関してスクリーニングした種々の膵臓腫瘍マイクロアレイにおける、組み合わせ／集合的な H スコア分布を示すグラフである。

【図 1 5 A】P H T X - 2 4 9 a 原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおけるプロテアーゼ切断可能リンカーによって M M A E に複合体化された 3 . 7 5 m g / k g 及び 7 . 5 m g / k g の抗 G C C m A b によって誘発される抗腫瘍活性を示す図である（遊離 M M A E 及び非 G C C 標的 A D C で処置した対照群がこの研究に含まれた）。図 1 5 B は、P H T X - 2 1 5 a 原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおけるプロテアーゼ切断可能リンカーによって M M A E に複合体化された 3 . 7 5 m g / k g 及び 7 . 5 m g / k g の抗 G C C m A b によって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフである（遊離 M M A E 及び非 G C C 標的 A D C で処置した対照群がこの研究に含まれた）。

【図 1 5 B】P H T X - 2 4 9 a 原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおけるプロテアーゼ切断可能リンカーによって M M A E に複合体化された 3 . 7 5 m g / k g 及び 7 . 5

mg/kgの抗GCC mAbによって誘発される抗腫瘍活性を示す図である（遊離MMAE及び非GCC標的ADCで処置した対照群がこの研究に含まれた）。図15Bは、PHTX-215a原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおけるプロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された3.75mg/kg及び7.5mg/kgの抗GCC mAbによって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフである（遊離MMAE及び非GCC標的ADCで処置した対照群がこの研究に含まれた）。

【図16A】それぞれ単一剤単独ならびに種々濃度及び投薬スケジュールでの組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性の比較を示す棒グラフであり、16Bは、PHTX-249a原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおける、それぞれ単一剤単独及び組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性図を示すグラフであり、図16Cは、PHTX-215a原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおける、それぞれ単一剤単独及び組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフである。

【図16B】それぞれ単一剤単独ならびに種々濃度及び投薬スケジュールでの組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性の比較を示す棒グラフであり、16Bは、PHTX-249a原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおける、それぞれ単一剤単独及び組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性図を示すグラフであり、図16Cは、PHTX-215a原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおける、それぞれ単一剤単独及び組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフである。

【図16C】それぞれ単一剤単独ならびに種々濃度及び投薬スケジュールでの組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性の比較を示す棒グラフであり、16Bは、PHTX-249a原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおける、それぞれ単一剤単独及び組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性図を示すグラフであり、図16Cは、PHTX-215a原発性ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデルにおける、それぞれ単一剤単独及び組み合わせで、プロテアーゼ切断可能リンカーによってMMAEに複合体化された抗GCC mAb及びゲムシタビンによって誘発される抗腫瘍活性を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0065】

本発明は、癌、例えば、消化器癌の治療のための新しい組み合わせ治療を提供する。具体的には、本発明は、消化器癌を患う患者を治療するための方法であって、プロテアーゼ切断可能リンカーを介してMMAEに複合体化された抗GCC抗体分子を含む免疫複合体を、DNA損傷剤と組み合わせることを含む、各剤は、治療的に有効な合計量で使用される、方法を提供する。そのような免疫複合体及びDNA損傷剤は、それぞれが、ある特定の消化器癌種及びある特定の数の患者の治療において単一剤として有効であることが示されているが、驚くべきことに、本発明の抗GCC免疫複合体とDNA損傷剤との組み合わせ治療は、いずれの薬剤でも個別には達成されていない利点をもたらすことが発見された。本発明はまた、本発明の抗GCC免疫複合体及びDNA損傷剤を含む、薬学的組成物及びキットを提供する。

【0066】

上述のように、化学耐性は、消化器癌の治療における十分に認識された問題である。具

10

20

30

40

50

体的には、微小管破壊剤は、そのような薬剤に対する本質的または獲得された化学耐性に起因して、結腸直腸癌の治療における成功が制限されている。MMAEは、強力な微小管阻害剤である。本発明者らは、他の微小管破壊剤と同様に、ある特定の結腸直腸腫瘍種が、MMAEがGCCを標的とすることによって結腸直腸癌細胞を特異的に標的とするように設計された免疫複合体に使用される場合、MMAEの微小管阻害活性に耐性であると見られることを発見した。驚くべきことに、本発明者らは、単一剤として使用した場合に皆無かそれに近い活性を有する同じ抗GCC免疫複合体が、MMAE不応性結腸直腸腫瘍をDNA損傷剤活性に対して感受性にすることを発見した。抗GCC免疫複合体及びDNA損傷剤の組み合わせが、単一剤としての免疫複合体に対して多様なレベルの感受性を示す異なる腫瘍異種移植片モデルにおいて、異なるモデルにおける類似レベルのGCC発現にも関わらず、いずれかの薬剤単独の活性と比較して、抗腫瘍活性を改善したことが本明細書に示される。

10

【0067】

グアニリルシクラーゼC

グアニリルシクラーゼC (GCC) (STAR、ST受容体、GUC2C、及びGUCY2Cとしても知られる)は、腸液の維持、電解質恒常性、及び細胞増殖において機能を果たす膜貫通細胞表面受容体である (Carrithers et al., Proc Natl Acad Sci U S A 100:3018-3020 (2003)、Mann et al., Biochem Biophys Res Commun 239:463-466 (1997)、Pitari et al., Proc Natl Acad Sci U S A 100:2695-2699 (2003))、Gen Bank 受託番号NM_004963、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる)。この機能は、グアニリンの結合を通じて媒介される (Wiegand et al., FEBS Lett. 311:150-154 (1992))。GCCは、大腸菌、ならびに他の感染性生物によって産生されるペプチドである熱安定性エンテロトキシン (ST、例えば、配列番号1のNTFYCCCLCCNPACAGCYのアミノ酸配列を有する) の受容体でもある (Rao, M. C. Ciba Found. Symp. 112:74-93 (1985)、Knoop F. C. and Owens, M. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 28:67-72 (1992))。STのGCCへの結合が、腸疾患、例えば、下痢をもたらすシグナル伝達カスケードを活性化させる。

20

30

【0068】

【化 6 - 1】

ヒトGCCのヌクレオチド配列 (GenBank受託番号NM_004963) :

```

1      atgaagacgt  tgcctgttgga  cttggcctttg  tg
      gtcactgc  tcttccagcc  cgggtggcctg
61     tccttttagtt  cccaggtgag  tcagaactgc  ca
      caatggca  gctatgaaat  cagcgtcctg
121    atgatgggca  actcagccctt  tgcagagccc  ct
      gaaaaact  tggaaagatgc  ggtgaatgag
181    gggctggaaa  tagtgagagg  acgtctgcaa  aa
      tgcctggcc  taaatgtgac  tgtgaacgct
241    actttcatgt  attcggatgg  tctgattcat  aa
      ctcaggcg  actgccggag  tagcacctgt
301    gaaggcctcg  acctactcag  gaaaaatttca  aa
      tgcacaaac  ggatgggctg  tgtcctcata
361    gggccctcat  gtacatactc  cacccttccag  at
      gtaccttg  acacagaatt  gagctacccc
421    atgattctcag  ctggaagtgt  tggatttgtca  tg
      tgactata  aagaaacctt  aaccaggctg
481    atgtctccag  ctagaaagt  gatgtacttc  tt
      ggttaact  tttggaaaaac  caacgactctg
541    ccccttcaaaa  cttattcctg  gagcacttcg  ta
      tgtttaca  agaattggtac  agaaactgag
601    gactgtttct  ggtaccttaa  tgcctctggag  gc
      tagcgttt  cctatttctc  ccacgaactc
661    ggcctttaagg  tgggtgttaag  acaagataag  ga
      gtttccagg  atatcttaat  ggaccacaaac
721    aggaaaagca  atgtgattat  tatgtgtggt  gg
      tccagagt  tctctacaaa  gctgaagggt
781    gaccgagcag  tggcctgaaga  cattgtcatt  at

```

10

20

【化 6 - 2】

	t c t a g t g g a t c t t t t c a a t g a c c a g t a c	
841	t t t g a g g a c a a t g t c a c a g c c c c t g a c t a t a t	
	g a a a a a t g t c c t t g t t c t g a c g c t g t c t	
901	c c t g g g a a t t c c c t t c t a a a t a g c t c t t t c t c	
	c a g g a a t c t a t c a c c a a c a a a a c g a g a c	
961	t t t g c t c t t g c c t a t t t g a a t g g a a t c c t g c t	
	c t t t g g a c a t a t g c t g a a g a t a t t t c t t	
1021	g a a a a t g g a g a a a a t a t t a c c a c c c c c a a a t t	
	t g c t c a t g c t t t c a g g a a t c t c a c t t t t	10
1081	g a a g g g t a t g a c g g t c c a g t g a c c t t g g a t g a	
	c t g g g g g g a t g t t g a c a g t a c c a t g g t g	
1141	c t t c t g t a t a c c t c t g t g g a c a c c a a g a a a t a	
	c a a g g t t c t t t t g a c c t a t g a t a c c c a c	
1201	g t a a a t a a g a c c t a t c c t g t g g a t a t g a g c c c	
	c a c a t t c a c t t g g a a g a a c t c t a a a c t t	
1261	c c t a a t g a t a t t a c a g g c c g g g g c c c t c a g a t	
	c c t g a t g a t t g c a g t c t t c a c c c t c a c t	
1321	g g a g c t g t g g t g c t g c t c c t g c t c g t c g c t c t	
	c c t g a t g c t c a g a a a a t a t a g a a a a g a t	
1381	t a t g a a c t t c g t c a g a a a a a a t g g t c c c a c a t	20
	t c c t c c t g a a a a t a t c t t t c c t c t g g a g	
1441	a c c a a t g a g a c c a a t c a t g t t a g c c t c a a g a t	
	c g a t g a t g a c a a a a g a c g a g a t a c a a t c	
1501	c a g a g a c t a c g a c a g t g c a a a t a c g a c a a a a a	
	g c g a g t g a t t c t c a a a g a t c t c a a g c a c	
1561	a a t g a t g g t a a t t t c a c t g a a a a c a g a a g a t	
	a g a a t t g a a c a a g t t g c t t c a g a t t g a c	
1621	t a t t a c a a c c t g a c c a a g t t c t a c g g c a c a g t	
	g a a a c t t g a t a c c a t g a t c t t c g g g g t g	
1681	a t a g a a t a c t g t g a g a g a g g a t c c c t c c g g g a	
	a g t t t t a a a t g a c a c a a t t t c c t a c c c t	30
1741	g a t g g c a c a t t c a t g g a t t g g g a g t t t a a g a t	
	c t c t g t c t t g t a t g a c a t t g c t a a g g g a	
1801	a t g t c a t a t c t g c a c t c c a g t a a g a c a g a a g t	
	c c a t g g t c g t c t g a a a t c t a c c a a c t g c	
1861	g t a g t g g a c a g t a g a a t g g t g g t g a a g a t c a c	
	t g a t t t t t g g c t g c a a t t c c a t t t t a c c t	
1921	c c a a a a a a g g a c c t g t g g a c a g c t c c a g a g c a	
	c c t c c g c c a a g c c a a c a t c t c t c a g a a a	
1981	g g a g a t g t g t a c a g c t a t g g g a t c a t c g c a c a	
	g g a g a t c a t c c t g c g g a a a g a a a c c t t c	
2041	t a c a c t t t t g a g c t g t c g g g a c c g g a a t g a g a a	40
	g a t t t t t c a g a g t g g a a a a t t c c a a t g g a	
2101	a t g a a a c c c t t c c g c c c a g a t t t a t t c t t g g a	

【化 6 - 3】

```

a a c a g c a g   a g g a a a a a g a   g c t a g a a g t g
2 1 6 1   t a c c t a c t t g   t a a a a a a c t g   t t g g g a g g a a   g a
          t c c a g a a a   a g a g a c c a g a   t t t c a a a a a a
2 2 2 1   a t t g a g a c t a   c a c t t g c c a a   g a t a t t t g g a   c t
          t t t t c a t g   a c c a a a a a a a   t g a a a g c t a t
2 2 8 1   a t g g a t a c c t   t g a t c c g a c g   t c t a c a g c t a   t a
          t t c t c g a a   a c c t g g a a c a   t c t g g t a g a g
2 3 4 1   g a a a g g a c a c   a g c t g t a c a a   g g c a g a g a g g   g a
          c a g g g c t g   a c a g a c t t a a   c t t t a t g t t g
2 4 0 1   c t t c c a a g g c   t a g t g g t a a a   g t c t c t g a a g   g a
          g a a a g g c t   t t g t g g a g c c   g g a a c t a t a t
2 4 6 1   g a g g a a g t t a   c a a t c t a c t t   c a g t g a c a t t   g t
          a g g t t t c a   c t a c t a t c t g   c a a a t a c a g c
2 5 2 1   a c c c c c a t g g   a a g t g g t g g a   c a t g c t t a a t   g a
          c a t c t a t a   a g a g t t t t g a   c c a c a t t g t t
2 5 8 1   g a t c a t c a t g   a t g t c t a c a a   g g t g g a a a c c   a t
          c g g t g a t g   c g t a c a t g g t   g g c t a g t g g t
2 6 4 1   t t g c c t a a g a   g a a a t g g c a a   t c g g c a t g c a   a t
          a g a c a t t g   c c a a g a t g g c   c t t g g a a a t c
2 7 0 1   c t c a g c t t c a   t g g g g a c c t t   t g a g c t g g a g   c a
          t c t t c c t g   g c c t c c c a a t   a t g g a t t c g c
2 7 6 1   a t t g g a g t t c   a c t c t g g t c c   c t g t g c t g c t   g g
          a g t t g t g g   g a a t c a a g a t   g c c t c g t t a t
2 8 2 1   t g t c t a t t t g   g a g a t a c g g t   c a a c a c a g c c   t c
          t a g g a t g g   a a t c c a c t g g   c c t c c c t t t g
2 8 8 1   a g a a t t c a c g   t g a g t g g c t c   c a c c a t a g c c   a t
          c c t g a a g a   g a a c t g a g t g   c c a g t t c c t t
2 9 4 1   t a t g a a g t g a   g a g g a g a a a c   a t a c t t a a a g   g g
          a a g a g g a a   a t g a g a c t a c   c t a c t g g c t g
3 0 0 1   a c t g g g a t g a   a g g a c c a g a a   a t t c a a c c t g   c c
          a a c c c c t c   c t a c t g t g g a   g a a t c a a c a g
3 0 6 1   c g t t t t g c a a g   c a g a a t t t t c   a g a c a t g a t t   g c
          c a a c t c t t   t a c a g a a a a g   a c a g g c a g c a
3 1 2 1   g g g a t a a g a a   g c c a a a a a c c   c a g a c g g g t a   g c
          c a g c t a t a   a a a a a g g c a c   t c t g g a a t a c
3 1 8 1   t t g c a g c t g a   a t a c c a c a g a   c a a g g a g a g c   a c
          c t a t t t t t   a a

```

(配列番号2)

【0 0 6 9】

【化 7】

ヒトGCCのアミノ酸配列 (GenPept 受託番号 NP_004954) :

```

1      m k t l l l d l a l   w s l l f q p g w l   s f s s q v s q n c   h n
      g s y e i s v l   m m g n s a f a e p   l k n l e d a v n e
61     g l e i v r g r l q   n a g l n v t v n a   t f m y s d g l i h   n s
      g d c r s s t c   e g l d l l r k i s   n a q r m g c v l i
121    g p s c t y s t f q   m y l d t e l s y p   m i s a g s f g l s   c d
      y k e t l t r l   m s p a r k l m y f   l v n f w k t n d l
181    p f k t y s w s t s   y v y k n g t e t e   d c f w y l n a l e   a s
      v s y f s h e l   g f k v v l r q d k   e f q d i l m d h n
241    r k s n v i i m c g   g p e f l y k l k g   d r a v a e d i v i   i l
      v d l f n d q y   f e d n v t a p d y   m k n v l v l t l s
301    p g n s l l n s s f   s r n l s p t k r d   f a l a y l n g i l   l f
      g h m l k i f l   e n g e n i t t p k   f a h a f r n l t f
361    e g y d g p v t l d   d w g d v d s t m v   l l y t s v d t k k   y k
      v l l t y d t h   v n k t y p v d m s   p t f t w k n s k l
421    p n d i t g r g p q   i l m i a v f t l t   g a v v l l l l v a   l l
      m l r k y r k d   y e l r q k k w s h   i p p e n i f p l e
481    t n e t n h v s l k   i d d d k r r d t i   q r l r q c k y d k   k r
      v i l k d l k h   n d g n f t e k q k   i e l n k l l q i d
541    y y n l t k f y g t   v k l d t m i f g v   i e y c e r g s l r   e v
      l n d t i s y p   d g t f m d w e f k   i s v l y d i a k g
601    m s y l h s s k t e   v h g r l k s t n c   v v d s r m v v k i   t d
      f g c n s i l p   p k k d l w t a p e   h l r q a n i s q k
661    g d v y s y g i i a   q e i i l r k e t f   y t l s c r d r n e   k i
      f r v e n s n g   m k p f r p d l f l   e t a e e k e l e v
721    y l l v k n c w e e   d p e k r p d f k k   i e t t l a k i f g   l f
      h d q k n e s y   m d t l i r r l q l   y s r n l e h l v e
781    e r t q l y k a e r   d r a d r l n f m l   l p r l v v k s l k   e k
      g f v e p e l y   e e v t i y f s d i   v g f t t i c k y s
841    t p m e v v d m l n   d i y k s f d h i v   d h h d v y k v e t   i g
      d a y m v a s g   l p k r n g n r h a   i d i a k m a l e i
901    l s f m g t f e l e   h l p g l p i w i r   i g v h s g p c a a   g v
      v g i k m p r y   c l f g d t v n t a   s r m e s t g l p l
961    r i h v s g s t i a   i l k r t e c q f l   y e v r g e t y l k   g r
      g n e t t y w l   t g m k d q k f n l   p t p p t v e n q q
1021   r l q a e f s d m i   a n s l q k r q a a   g i r s q k p r r v   a s
      y k k g t l e y   l q l n t t d k e s   t y f

```

(配列番号3)

【0070】

GCCタンパク質は、それぞれがGCC分子に別個の機能を与える、いくつかの一般に認められたドメインを有する。GCCの部分には、配列番号3のアミノ酸残基1～約残基23または残基1～約残基21のシグナル配列(タンパク質を細胞表面に導くための)(配列番号3の約アミノ酸残基22または24～1073の機能的成熟タンパク質を生成するための成熟のために切り取られる)、配列番号3の約アミノ酸残基24～約残基420または約残基54～約残基384に結合するリガンドの細胞外ドメイン、例えば、グアニリンまたはST、配列番号3の約アミノ酸残基431～約残基454または約残基436～約残基452の膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼ活性を有すると予想される約アミノ酸残基489～約残基749、または約残基508～約残基745のキナーゼ相同性ドメイン、配列番号3の約残基750～約残基1007または約残基816～約残基1002のグアニリルシクラーゼ触媒ドメインが含まれる。好ましくは、抗GCC抗体分子は、GCCの細胞外ドメインに結合する。

【0071】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、抗GCC抗体分子は、ヒトGCCに結合し得る。いくつかの実施形態において、本発明の抗GCC抗体分子は、GCCへのリガンド、例えば、グアニリンまたは熱安定性エンテロトキシンの結合を阻害し得る。他の実施形態において、本発明の抗GCC抗体分子は、GCCへのリガンド、例えば、グアニンリまたは熱安定性エンテロトキシンの結合を阻害しない。

【0072】

定義及び方法

本明細書において別途定義されない限り、本発明と関連して使用される科学及び技術用語は、当業者によって広く理解される意味を有する。一般に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質及びオリゴまたはポリヌクレオチド化学及びハイブリダイゼーションと関連して用いられる命名法、ならびにそれらの技法は、当該技術分野で既知のものである。GenBankまたはGenPept受託番号ならびに有用な核酸及びペプチド配列は、National Center for Biotechnological Information, Bethesda MDによって維持されているウェブサイトにおいて見出すことができる。標準的な技法が、組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養及び形質転換及びトランスフェクション（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）に使用される。酵素反応及び精製技法は、製造業者の仕様書に従って、または当該技術分野で広く実施されるように、または本明細書に記載されるように、行われる。前述の技法及び手順は、一般に、当該技術分野で既知の方法に従って、例えば、本明細書全体を通じて引用及び考察される種々の一般的及びより具体的な参考文献に記載されるように、行われる。例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000)) を参照されるか、または、一般に、Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医化学及び薬化学と関連して用いられる命名法、ならびに研究室手順及び技法は、当該技術分野で既知である。標準的な技法が、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、及び送達、ならびに患者の治療に用いられる。さらに、文脈によって別途必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【0073】

本明細書に使用されるとき、「抗体分子」という用語は、抗体、抗体ペプチド（複数可）、もしくは免疫グロブリン、または前述のもののいずれかの抗原結合フラグメント、例えば抗体のものを指す。抗体分子には、一本鎖抗体分子、例えばscFv（例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426、及びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい）、及び一本鎖ドメイン抗体分子（例えば、国際公開第WO9404678号を参照されたい）が含まれる。「抗体分子」という用語には含まれないが、本発明はまた、「抗体類似体（複数可）」、他の非抗体分子タンパク質に基づく足場、例えば、融合タンパク質、及び／またはCDRを使用して特異的な抗原結合を提供する免疫複合体も含む。

【0074】

「抗GCC抗体分子」は、GCC、例えばヒトGCCと相互作用するか、またはそれを認識する、例えば、それに結合（例えば特異的に結合）する、抗体分子（すなわち、抗体、抗体ペプチド、免疫グロブリン、または前述のもののいずれかの抗原結合フラグメント）を指す。例示的な抗GCC抗体分子は、表1及び2に要約される。例示的な抗GCC抗体は、表1の抗体のアミノ酸配列を含み、任意の好適な細胞系、例えば哺乳動物細胞系、

例えばヒト細胞株、N S O細胞系、またはC H O細胞系において作製され得る。例示的な抗G C C抗体は、表2に列挙される可変領域を含み得る。例示的な抗G C C抗体はまた、表5に列挙されるC D Rを含み得る。

【0075】

本明細書に使用されるとき、「抗体」、「抗体ペプチド（複数可）」、または「免疫グロブリン」という用語は、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のタンパク質または糖タンパク質を指す。抗体という用語には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、C D Rグラフト、及びヒトまたはヒト化抗体が含まれ、これらのすべては、本明細書の他の箇所により詳細に記載されている。ラクダ抗体（例えば、米国第U S 2 0 0 5 / 0 0 3 7 4 2 1号を参照されたい）、及びナノボディ、例えば、I g N A R（サメ抗体）（国際公開第W O 0 3 / 0 1 4 1 6 1号を参照されたい）もこの用語に含まれる。「抗体」という用語はまた、合成及び遺伝子操作した変異体も含む。

10

【0076】

本明細書に使用されるとき、「抗体フラグメント」または抗体の「抗原結合フラグメント」という用語は、例えば、F a b、F a b'、F（a b'）₂、及びF vフラグメント、一本鎖抗体、機能的重鎖抗体（ナノボディ）、ならびに、少なくとも1つの所望されるエピトープに対する特異性を有し、特異的結合に関してインタクトな抗体と競合する、抗体の任意の部分（例えば、エピトープに特異的に結合するのに十分なC D R配列を有し、十分なフレームワーク配列を有するフラグメント）を指す。例えば、抗原結合フラグメントは、そのフラグメントが由来する抗体に結合するエピトープへの結合に関して競合し得る。由来するとは、この文脈及び類似の文脈で使用されるとき、いずれの具体的な誘導の方法またはプロセスも暗示するものではないが、単に、配列類似性について言及し得る。抗原結合フラグメントは、組み換え技術によって、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断によって、産生され得る。抗原結合フラグメントという用語は、軽鎖及び重鎖を有する抗体の一本鎖、例えば重鎖とともに使用されるとき、鎖のフラグメントが、他方の鎖、例えば軽鎖の完全な可変領域と対合すると、全長重鎖及び軽鎖可変領域で見られるものの少なくとも25、50、75、85、または90%の結合を可能にするのに十分であることを意味する。

20

【0077】

「抗原に結合するC D Rの群」または「結合を可能にするのに十分な数のC D R」という用語（及び類似の表現）は、本明細書に使用されるとき、フレームワークに配置され、他方の鎖、例えば軽鎖の完全な可変領域または類似の長さで同じ数のC D Rを有する他方の鎖の可変領域と対合したときに、結合、例えば、全長重鎖及び軽鎖可変領域で見られるものの少なくとも25、50、75、85、または90%の結合を可能にするために十分な鎖、例えば重鎖のC D Rを指す。

30

【0078】

本明細書に使用されるとき、「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウス（例えば、X E N O M O U S E（商標）遺伝子操作マウス（A b g e n i x, F r e m o n t, C A））、ヒトファージディスプレイライブラリー、ヒト骨髓腫細胞、またはヒトB細胞に由来する抗体等、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する配列を有する抗体を含む。

40

【0079】

本明細書に使用されるとき、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト抗体、例えば齧歯類（例えばマウス）に由来し、親抗体の抗原結合特性を保持するか、または実質的に保持するが、ヒトにおける免疫原性が低い抗体を指す。本明細書に使用されるヒト化とは、脱免疫した抗体を含むことを意図する。典型的に、ヒト化抗体には、非ヒトC D Rならびにヒトまたはヒト由来のフレームワーク及び定常領域が含まれる。

【0080】

「修飾された」抗体という用語は、本明細書に使用されるとき、組み換え手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体、例えば、宿主細胞にトランスフェクトした組

50

み換え発現ベクターを使用して発現された抗体、組み換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物（例えば、マウス、ヒツジ、もしくはヤギ）から単離された抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製、もしくは単離された抗体を指す。そのような修飾された抗体には、ヒト化抗体、CDRグラフト抗体（例えば、第1の抗体に由来するCDRと、異なる源、例えば第2の抗体またはコンセンサスフレームワークに由来するフレームワーク領域とを有する抗体）、キメラ抗体、インビトロで（例えば、ファージディスプレイによって）生成された抗体が含まれ、場合によっては、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列またはヒト免疫グロブリン遺伝子に由来する可変もしくは定常領域、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列を代替的な免疫グロブリン配列にスプライシングすることを伴う任意の手段によって調製、発現、作製、もしくは単離されている抗体が含まれ得る。実施形態において、修飾された抗体分子には、参照抗体からの配列変化を有する抗体分子が含まれる。

10

【0081】

「一特異性抗体」という用語は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親性を示す抗体または抗体調製物を指す。この用語は、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含む。

【0082】

「二特異性抗体」または「二機能性抗体」という用語は、2つのエピトープに対する二重の結合特異性を示し、各結合部位が異なるものであり、異なるエピトープを認識する、抗体を指す。

20

【0083】

「非複合体化抗体」及び「ネイキッド抗体」という用語は、非抗体分子、例えば、治療剤または標識に複合体化されていない抗体分子を指して互換的に使用される。

【0084】

「免疫複合体」、「抗体複合体」、「抗体薬物複合体」、及び「ADC」は、非抗体分子、例えば、治療剤または標識に複合体化された抗体分子を指して互換的に使用される。

【0085】

「薬剤」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生体高分子、または生体材料から作製された抽出物を指して本明細書に使用される。「治療剤」という用語は、生物学的活性を有する薬剤を指す。

30

【0086】

「抗癌剤」または「化学療法剤」という用語は、ヒトにおける新生物、特に悪性（癌性）病変部、例えば、癌腫、肉腫、リンパ腫、または白血病の発達及び進行を阻害する機能的特性を有する薬剤を指して本明細書に使用される。転移及び血管新生の阻害は、高頻度で、抗癌または化学療法剤の特性である。化学療法剤は、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤であり得る。「細胞増殖抑制剤」という用語は、細胞成長及び／または細胞の増殖を阻害または抑制する薬剤を指す。

【0087】

「細胞毒性剤」は、アルキル化剤、腫瘍壊死因子阻害剤、インターカレーター、微小管阻害剤、キナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、及びトポイソメラーゼ阻害剤を含むがこれらに限定されない、主として細胞の機能を直接遮断することによって細胞死をもたらす化合物を指す。本明細書に使用される「毒性負荷量」とは、細胞に送達されると細胞死をもたらす、十分な細胞毒性剤の量を指す。毒性負荷量の送達は、本発明の抗体または抗原結合フラグメント及び細胞毒性剤を含む免疫複合体の十分な量の投与によって達成され得る。毒性負荷量の送達は、細胞毒性剤を含む免疫複合体であって、本発明の抗体または抗原結合フラグメントを認識し、それに結合する二次抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、免疫複合体の十分な量の投与によっても達成され得る。

40

【0088】

本明細書に使用されるとき、「に由来する」配列または「指定の配列に特異的な」配列

50

という語句は、例えば、指定の配列の連続する領域に対応する、すなわち、それと同一であるかまたはそれに相補的である、おおよそで少なくとも6個のヌクレオチドもしくは少なくとも2個のアミノ酸、少なくとも約9個のヌクレオチドもしくは少なくとも3個のアミノ酸、少なくとも約10～12個のヌクレオチドもしくは4個のアミノ酸、または少なくとも約15～21個のヌクレオチドもしくは5～7個のアミノ酸の連続する配列を含む、配列を指す。ある特定の実施形態において、配列は、指定されたヌクレオチドまたはアミノ酸配列のすべてを含む。配列は、当該技術分野で既知の技法によって決定されるように、特定の配列に固有である配列領域に相補的（ポリヌクレオチド配列の場合）または同一であり得る。配列が由来し得る領域には、特定のエピトープをコードする領域、CDRをコードする領域、フレームワーク配列をコードする領域、定常ドメイン領域をコードする領域、可変ドメイン領域をコードする領域、ならびに非翻訳及び／または非転写領域が挙げられるがこれらに限定されない。導出される配列は、必ずしも研究中の目的の配列に物理的に由来するわけではないが、ポリヌクレオチドが由来する領域（複数可）の塩基配列によって提供される情報に基づく、化学合成、複製、逆転写、または転写を含むがこれらに限定されない任意の手段で生成され得る。そのため、それは、元のポリヌクレオチドのセンスまたはアンチセンスのいずれかの配向を表し得る。加えて、指定の配列のものに対応する領域の組み合わせは、意図される用途に一致するように、当該技術分野で既知の手段で修飾または組み合わせられ得る。例えば、配列は、それぞれが指定の配列の一部を含む2つ以上の連続した配列を含み得、指定の配列と同一ではないが、指定の配列に由来する配列を表すことを意図する領域で中断される。抗体分子に関して、「それに由来する」は、比較抗体に機能的または構造的に関連する抗体分子を含み、例えば、「それに由来する」には、類似または実質的に同じ配列または構造を有する、例えば、同じまたは類似のCDR、フレームワーク、または可変領域を有する抗体が含まれる。抗体について「それに由来する」はまた、連続であってもそうでなくてもよいが、番号付けスキームまたは一般的な抗体構造もしくは三次元近接性、すなわち比較配列のCDRのまたはフレームワーク領域内での相同性に従って定義または特定される、残基、例えば、1つ以上、例えば、2、3、4、5、6、またはそれ以上の残基を含む。「それに由来する」という用語は、物理的にそれに由来することに限定されず、任意の方式による、例えば、比較抗体からの配列情報を使用して別の抗体を設計することによる、継代を含む。

【0089】

本明細書に使用されるとき、「によってコードされる」という語句は、ポリペプチド配列をコードする核酸配列を指し、ここで、ポリペプチド配列またはその部分は、核酸配列によってコードされるポリペプチドに由来する少なくとも3～5個のアミノ酸、少なくとも8～10個のアミノ酸、または少なくとも15～20個のアミノ酸のアミノ酸配列を含有する。

【0090】

2つの配列間の「相同性」の計算は、次のように行うことができる。配列を、最適な比較の目的でアライメントする（例えば、ギャップが、最適なアライメントのために第1及び第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方に導入され得、非相同配列は、比較目的で無視され得る）。比較目的でアライメントされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、40%、もしくは50%、少なくとも60%、または少なくとも70%、80%、90%、95%、100%である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを、比較する。第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占有されている場合、これら分子はその位置で同一である（本明細書に使用されるとき、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と同等である）。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した、これらの配列間で共通の同一な位置の数の関数である。

【0091】

2つの配列間の配列の比較及び相同性パーセントの判定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して判定され得る。例えば、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重量及び1、2、3、4、5、または6の長さを用いた、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに組み込まれているアルゴリズム。2つのヌクレオチド配列の相同性パーセントもまた、NWSgapdna.CMPマトリックス、ならびに40、50、60、70、または80のギャップ重量及び1、2、3、4、5、または6の長さを用いて、GCGソフトウェアパッケージ (Accelrys, Inc. San Diego, CA) のGAPプログラムを使用して判定することができる。相同性の判定のための例示的なパラメーターセットは、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、及びフレームシフトギャップペナルティ5でのBlossum 62スコアリングマトリックスである。

【0092】

本明細書に使用されるとき、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を行うための案内は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。水溶性及び非水溶性の方法が、その参考文献に記載されており、いずれを使用してもよい。本明細書に言及される特定のハイブリダイゼーション条件は、次の通りである：1) 低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、約45℃で6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム (SSC) において、続いて0.2×SSC、0.1% SDS、少なくとも50℃ (洗浄温度は、低ストリンジェンシー条件では55℃まで上げることができる) での洗浄、2) 中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、約45℃で6×SSCにおいて、続いて0.2×SSC、0.1% SDS、60℃での1回以上の洗浄、3) 高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、約45℃で6×SSCにおいて、続いて0.2×SSC、0.1% SDS、65℃での1回以上の洗浄、ならびに4) 超高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、0.5Mリン酸ナトリウム、7% SDS、65℃において、続いて0.2×SSC、1% SDS、65℃での1回以上の洗浄である。超高ストリンジェンシー条件 (4) が、しばしば好まれる条件であり、別途示されない限り使用されるべきものである。

【0093】

本発明の抗体及びその抗原結合フラグメントは、ポリペプチドの機能に実質的な影響を有さない追加の保存的または非必須アミノ酸置換を有し得る。特定の置換が耐容されるかどうか、すなわち、結合活性等の所望される生物学的特性に悪影響を及ぼさないかどうかは、Bowie, J. Uet al. Science 247:1306-1310 (1990) or Padlan et al. FASEB J. 9:133-139 (1995)に記載されるように判断することができる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖 (例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、β分岐側鎖 (例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、及び芳香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を有するアミノ酸が挙げられる。

【0094】

「非必須」アミノ酸側鎖は、生物学的活性を無効にすることなく、またはそれを実質的

に改変することなく、結合剤、例えば、抗体の野生型配列から改変され得る残基であるが、一方で「必須」アミノ酸残基は、そのような変化をもたらす。抗体の場合、必須アミノ酸残基は、特異性決定残基（SDR）である。

【0095】

本明細書に使用されるとき、「単離される」という用語は、物質が、その本来の環境（例えば、それが天然に存在する場合は天然の環境）から取り出されることを指す。例えば、生きた動物中に存在する天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、自然分類系において共存する物質の一部またはすべてから分離された同じポリヌクレオチドまたはDNAまたはポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であり得る、及び／またはそのようなポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは、組成物、例えば、混合物、溶液、もしくは懸濁液の一部であり得るか、またはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを含む単離細胞もしくは培養細胞を含み得、ベクターまたは組成物が、その天然の環境の一部でないという点で、依然として単離され得る。

【0096】

本明細書に使用されるとき、「精製された生成物」という用語は、細胞構成要素から単離された生成物の調製物を指し、この生成物は、通常、目的の試料中に存在し得る他の種類の細胞と関連する、及び／またはそれに由来する。

【0097】

本明細書に使用されるとき、「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定基を指す。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖といった、化学的に活性な表面分類の分子からなり、通常、特異的な3次元構造特徴、ならびに特異的な電荷特徴を有する。一部のエピトープは線形エピトープであるが、他のは立体構造エピトープである。線形エピトープは、連続したアミノ酸一次配列が認識されるエピトープを含む、エピトープである。線形エピトープは、典型的に、少なくとも3個、より通例的には少なくとも5個、例えば、約8～約10個の連続したアミノ酸を含む。立体構造エピトープは、少なくとも2つの状況からもたらされ得る：a) 例えば、リガンド結合に依存する、またはシグナル伝達分子による修飾（例えばリン酸化）に依存する、ある特定のタンパク質構造において抗体結合に曝露されるだけである、線形配列；またはb) タンパク質もしくは1つを上回るサブユニットに由来する複数サブユニットタンパク質の1つを上回る部分の表面特性の組み合わせ、ここで、この特性は、結合に関与する3次元空間において十分な近接性にある。

【0098】

本明細書に使用されるとき、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体のクラス（例えば、IgMまたはIgG1）を指す。

【0099】

本明細書に使用されるとき、「検出可能な薬剤」、「標識」、または「標識された」という用語は、ポリペプチドまたは糖タンパク質への検出可能なマーカーの組み込みを指して使用される。ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する種々の方法が、当該技術分野で既知であり、それらを使用することができる。ポリペプチドの標識の例としては、次のものが挙げられるがこれらに限定されない：放射性同位体または放射性核種（例えば、インジウム（ ^{111}In ）、ヨウ素（ ^{131}I もしくは ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、ビスマス（ ^{212}Bi もしくは ^{213}Bi ）、硫黄（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、プラセオジウム、もしくはリン（ ^{32}P ）、または陽電子放出放射性核種、例えば炭素-11（ ^{11}C ）、カリウム-40（ ^{40}K ）、窒素-13（ ^{13}N ）、酸素-15（ ^{15}O ）、フッ素-18（ ^{18}F ）、及びヨウ素-121（ ^{121}I ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基（標識されたアビジンによ

って検出することができるもの、例えば、ストレプトアビジン部分及び光学的もしくは熱量測定方法によって検出することができる蛍光マーカーもしくは酵素活性を含有する分子）、ならびに二次レポーター（例えば、ロイシンジッパー対合配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）によって認識される所定のポリペプチドエピーブ。いくつかの実施形態において、標識は、可能性のある立体障害を低減させるために、種々の長さのスペーサーアームによって結合される。

【0100】

本明細書に使用されるとき、「特異的結合」、「特異的に結合する」、または「結合特異性」は、抗GCC抗体分子に関して、抗体分子が、非GCCタンパク質、例えば、BSAに結合するよりも高い親和性で、GCC、例えば、ヒトGCCタンパク質に結合することを意味する。典型的に、抗GCC分子は、非GCCタンパク質、例えば、BSAに対して、GCC、例えば、ヒトGCCタンパク質に対する K_d よりも2倍を超える、10倍を超える、100倍を超える、1,000倍を超える、 10^4 倍を超える、 10^5 倍を超える、または 10^6 倍を超える K_d を有する。 K_d を決定する際、GCC及び非GCCタンパク質、例えばBSAに対する K_d は、同じ条件下で行われる必要がある。

10

【0101】

本明細書に使用されるとき、「治療する」または「治療」という用語は、対象、例えば患者への抗GCC抗体分子の投与、または、例えば、対象から単離され、対象に戻される組織または細胞への適用による投与として定義される。抗GCC抗体分子は、単独で、または第2の薬剤と組み合わせて投与され得る。治療は、障害、障害の症状、または障害、例えば癌になりやすい傾向を、治癒、療治、寛解、軽減、変化、治療、緩和、鎮静、改善するか、またはそれらに影響を及ぼすためのものであり得る。理論に束縛されることを望むものではないが、治療は、インビトロもしくはインビボで細胞の阻害、切除、または殺滅を引き起こすか、またはそうでなければ、細胞、例えば異常な細胞が、障害、例えば本明細書に記載される障害（例えば、癌）を媒介する能力を低減させると考えられる。

20

【0102】

本明細書に使用されるとき、「対象」という用語は、哺乳動物、霊長類、ヒト、及び非ヒト動物を含むことを意図する。例えば、対象は、癌、例えば、消化器起源のもの（例えば、結腸癌）、少なくとも一部の細胞がGCCを発現する癌、例えば消化器起源のもの（例えば、結腸癌）の症状、少なくとも一部の細胞がGCCを発現する癌、例えば消化器起源のもの（例えば、結腸癌）を罹患する傾向を有する患者（例えば、ヒト患者または獣医学的患者）であり得る。本発明の「非ヒト動物」という用語には、別途示されない限り、すべての非ヒト脊椎動物、例えば、非ヒト哺乳動物及び非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等が含まれる。ある実施形態において、対象は、マウス、ラット、ウサギ、またはヤギのうちの1つ以上またはすべてを除外する。

30

【0103】

本明細書に使用されるとき、障害の治療に「有効」もしくは「十分」な抗GCC抗体分子の量、または「治療的に有効な量」もしくは「治療的に十分な量」とは、対象に単回または複数回用量で投与したときに、細胞、例えば、癌細胞（例えば、GCC発現腫瘍細胞）を治療するか、または本明細書に記載される障害を有する対象の治癒、寛解、軽減、もしくは改善をそのような治療の不在下で予測されるものを上回って長期化させるのに有効である抗体分子の量を指す。本明細書に使用されるとき、腫瘍または癌の「成長を阻害する」とは、その成長及び／または転移を遅延、妨害、停止、または終止させることを指し、必ずしも腫瘍成長の全体的な排除を示すわけではない。

40

【0104】

本明細書に使用されるとき、「STAR」、「GUC2C」、「GUCY2C」、または「ST受容体」タンパク質としても知られる「GCC」は、哺乳動物GCC、好ましくはヒトGCCタンパク質を指す。ヒトGCCは、配列番号3に示されるタンパク質、及びその天然に存在する対立遺伝子タンパク質変異体を指す。配列番号3における対立遺伝子

50

は、配列番号2に示されるGCCの核酸配列によってコードされ得る。他の変異体は、当該技術分野で既知である。例えば、残基281にロイシンを有するEnsembl Database, European Bioinformatics Institute及びWellcome Trust Sanger Instituteの受託番号Ensp0000261170; 米国特許出願公開第US20060035852号の配列番号14; またはGenBank受託番号AAB19934を参照されたい。典型的に、天然に存在する対立遺伝子変異体は、配列番号3のGCC配列に少なくとも95%、97%、または99%同一なアミノ酸配列を有する。転写産物は、1073個のアミノ酸のタンパク質産物をコードし、これは、GenBank受託番号NM_004963に記載される。GCCタンパク質は、膜貫通細胞表面受容体タンパク質として特徴付けられ、腸液の維持、電解質恒常性、及び細胞増殖において重要な役割を果たすと考えられる。

10

【0105】

別途示されない限り、「アルキル」という用語は、約1～約20個（ならびにその中の範囲及び特定の数の炭素原子のすべての組み合わせ及び下位組み合わせ）の炭素原子を有する飽和直鎖または分枝鎖炭化水素を指し、約1～約8個の炭素原子が好ましい。アルキル基の例は、メチル、エチル、n-プロピル、iso-プロピル、n-ブチル、iso-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、n-デシル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2, 3-ジメチル-2-ブチル、及び3, 3-ジメチル-2-ブチルである。

20

【0106】

アルキル基は、単独または別の基の一部としてであるかに関わらず、「置換される」と称され得る。置換アルキル基は、-ハロゲン、-O-(C₁-C₈アルキル)、-O-(C₂-C₈アルケニル)、-O-(C₂-C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂、及び-CNを含むがこれらに限定されない1つ以上の基、好ましくは1～3個の基（及びハロゲンから選択される任意の追加の置換基）で置換されたアルキル基であり、式中、各R'は、独立して、-H、-C₁-C₈アルキル、-C₂-C₈アルケニル、-C₂-C₈アルキニル、またはアリールから選択され、該-O-(C₁-C₈アルキル)、-O-(C₂-C₈アルケニル)、-O-(C₂-C₈アルキニル)、-アリール、-C₁-C₈アルキル、-C₂-C₈アルケニル、及び-C₂-C₈アルキニル基は、-C₁-C₈アルキル、-C₂-C₈アルケニル、-C₂-C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁-C₈アルキル)、-O-(C₂-C₈アルケニル)、-O-(C₂-C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂、及び-CNを含むがこれらに限定されない1つ以上の基で任意にさらに置換され得、式中、各R''は、独立して、-H、-C₁-C₈アルキル、-C₂-C₈アルケニル、-C₂-C₈アルキニル、または-アリールである。

30

40

【0107】

別途示されない限り、「アルケニル」及び「アルキニル」は、約2～約20個の炭素原子（ならびにその中の範囲及び特定の数の炭素原子のすべての組み合わせ及び下位組み合わせ）を有する直鎖及び分枝鎖炭素を指し、約2～約8個の炭素原子が好ましい。アルケニル鎖は、鎖内に少なくとも1つの二重結合を有し、アルキニル鎖は、鎖内に少なくとも

50

1つの三重結合を有する。アルケニル基の例としては、エチレンもしくはビニル、アリル、 -1 -ブテニル、 -2 -ブテニル、 $-$ イソブチレニル、 -1 -ペンテニル、 -2 -ペンテニル、 -3 -メチル -1 -ブテニル、 -2 -メチル -2 -ブテニル、及び $-2, 3$ -ジメチル -2 -ブテニルが挙げられるがこれらに限定されない。アルキニル基の例としては、アセチレン (acetylenic)、プロパルギル、アセチレニル、プロピニル、 -1 -ブチニル、 -2 -ブチニル、 -1 -ペンチニル、 -2 -ペンチニル、及び -3 -メチル -1 -ブチニルが挙げられるがこれらに限定されない。

【0108】

アルキル基にあるように、アルケニル及びアルキニル基は、置換され得る。「置換」アルケニルまたはアルキニル基は、 $-$ ハロゲン、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル $1)$ 、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')$ $_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')$ $_2$ 、及び $-CN$ を含むがこれらに限定されない、1つ以上の基、好ましくは1~3個の基（及びハロゲンから選択される任意の追加の置換基）で置換されたものであり、式中、各 R' は、独立して $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、または $-$ アリールから選択され、該 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル $1)$ 、 $-$ アリール、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、及び $-C_2-C_8$ アルキニル基は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-$ ハロゲン、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル $1)$ 、 $-$ アリール、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')$ $_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')$ $_2$ 、及び $-CN$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の置換基で任意にさらに置換され得、式中、各 R'' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、または $-$ アリールから選択される。

【0109】

別途記載されない限り、「アルキレン」という用語は、約1~約20個の炭素原子（ならびにその中の範囲及び特定の数の炭素原子のすべての組み合わせ及び下位組み合わせ）を有し（約1~約8個の炭素原子が好ましい）、親アルカンの同じかまたは2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって導出された2つの一価ラジカル中心を有する、飽和分枝鎖または直鎖炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルキレンには、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、デカレン、1, 4-シクロヘキシレン等が挙げられるがこれらに限定されない。単独または別の基の一部に関わらず、アルキレン基は、 $-$ ハロゲン、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル $1)$ 、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')$ $_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')$ $_2$ 、及び $-CN$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の基、好ましくは、1~3個の基（ならびにハロゲンから選択される任意の追加の置換基）で任意に置換され得、式中、各 R' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、または $-$ アリールから選択され、該 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル $1)$ 、 $-$ アリール、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、及び $-C_2-C_8$ アルキニル基は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-$ ハロゲン、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケ

ニル)、 $-\text{O}-$ (C_2-C_8 アルキニル 1)、 $-\text{アリール}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 、及び $-\text{CN}$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の置換基でさらに任意に置換され得、式中、各 R' は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルキニル、または $-\text{アリール}$ から選択される。

【0110】

別途記載されない限り、「アルケニレン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する、任意に置換されたアルキレン基を指す。例示的なアルケニレン基としては、例えば、エテニレン($-\text{CH}=\text{CH}-$)及びプロペニレン($-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$)が挙げられる。

10

【0111】

別途記載されない限り、「アルキニレン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含有する任意に置換されたアルキレン基を指す。例示的なアルキニレン基としては、例えば、アセチレン($-\text{C}\equiv\text{C}-$)、プロパルギル($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)、及び4-ペンチニル($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-$)が挙げられる。

【0112】

別途記載されない限り、「アリール」という用語は、親芳香環系の単一の炭素原子から1つの水素原子を除去することによって導出された、6~20個の炭素原子(ならびにその中の範囲及び特定の数の炭素原子のすべての組み合わせ及び下位組み合わせ)の一価芳香族炭化水素ラジカルを指す。いくつかのアリール基は、例示的な構造「Ar」として表される。典型的なアリール基としては、ベンゼン、置換ベンゼン、フェニル、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル等に由来するラジカルが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0113】

単独または別の基の一部としてかに関わらず、アリール基は、 $-\text{H}$ ロゲン、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルキニル、 $-\text{O}-$ (C_1-C_8 アルキル)、 $-\text{O}-$ (C_2-C_8 アルケニル)、 $-\text{O}-$ (C_2-C_8 アルキニル 1)、 $-\text{アリール}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 、及び $-\text{CN}$ を含むがこれらに限定されない1つ以上、好ましくは1~5個、またはさらには1~2個の基で任意に置換され得、式中、各 R' は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルキニル、または $-\text{アリール}$ から選択され、該 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルキニル、 $-\text{O}-$ (C_1-C_8 アルキル)、 $-\text{O}-$ (C_2-C_8 アルケニル)、 $-\text{O}-$ (C_2-C_8 アルキニル 1)、及び $-\text{アリール}$ 基は、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルキニル、 $-\text{H}$ ロゲン、 $-\text{O}-$ (C_1-C_8 アルキル)、 $-\text{O}-$ (C_2-C_8 アルケニル)、 $-\text{O}-$ (C_2-C_8 アルキニル 1)、 $-\text{アリール}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 、及び $-\text{CN}$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の置換基でさらに任意に置換され得、式中、各 R' は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ アルキニル、または $-\text{アリール}$ から選択される。

30

40

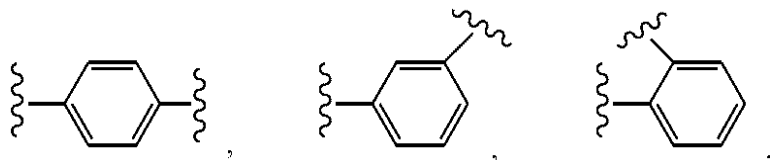
【0114】

別途記載されない限り、「アリーレン」という用語は、二価である任意に置換されたアリール基(すなわち、親芳香環系の同じかまたは2つの異なる炭素原子から2つの水素原

50

子を除くことによって導出された)を指し、これは、例示的なアリール基としてフェニルで以下の構造に示されるように、オルト、メタ、またはパラ構造であり得る。

【化 8】



典型的な「 $-(C_1-C_8)$ アルキレン)アリール」、「 $-(C_2-C_8)$ アルケニレン)アリール」、及び「 $-(C_2-C_8)$ アルキニレン)アリール」基としては、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-ニル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イル等が挙げられるがこれらに限定されない。

【0115】

別途記載されない限り、「複素環」という用語は、3～14個の環原子（環員とも称される）を有する単環式、二環式、または多環式環系を指し、ここで、少なくとも1つの環内の少なくとも1つの環原子は、N、O、P、またはS（ならびにその中の範囲及び特定の数の炭素原子及びヘテロ原子のすべての組み合わせ及び下位組み合わせ）から選択されるヘテロ原子である。複素環は、N、O、P、またはSから独立して選択される1～4個のヘテロ原子を有し得る。複素環内の1つ以上のN、C、またはS原子は、酸化され得る。単環式複素環は、好ましくは、3～7個の環員（例えば、2～6個の炭素原子及びN、O、P、またはSから独立して選択される1～3個のヘテロ原子）を有し、二環式複素環は、好ましくは、5～10個の環員（例えば、4～9個の炭素原子及びN、O、P、またはSから独立して選択される1～3個のヘテロ原子）を有する。ヘテロ原子を有する環は、芳香族または非芳香族であり得る。別途記載されない限り、複素環は、任意のヘテロ原子または炭素原子においてそのペンダント基に結合し、安定な構造をもたらす。

【0116】

単独または別の基の一部に関わらず、複素環式基は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-O-(C_1-C_8)$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルキニル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の基、好ましくは、1～2個の基で任意に置換され得、式中、 R' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、または $-アリール$ から選択され、該 $-O-(C_1-C_8)$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルキニル)、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、及び $-アリール$ 基は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-O-(C_1-C_8)$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルキニル)、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、及び $-アリール$ 基は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-O-(C_1-C_8)$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8)$ アルキニル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 、及び $-CN$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の置換基でさらに任意に置換され得、式中、各 R'' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、または $-アリール$ から選択される。

【0117】

別途記載されない限り、「炭素環」という用語は、3～14個の環原子（ならびにその中の範囲及び特定の数の炭素原子のすべての組み合わせ及び下位組み合わせ）を有する飽

和または不飽和の非芳香族単環式、二環式、または多環式環系を指し、ここで、環原子のすべては炭素原子である。単環式炭素環は、好ましくは、3～6個の環原子、さらにより好ましくは、5～6個の環原子を有する。二環式炭素環は、好ましくは、例えば、ビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、もしくは[6, 6]系として配置される7～12個の環原子、またはビシクロ[5, 6]もしくは[6, 6]系として配置される9もしくは10個の環原子を有する。「炭素環」という用語には、例えば、アリール環に融合された単環式炭素環式環（例えば、ベンゼン環に融合された単環式炭素環式環）が含まれる。炭素環は、好ましくは、3～8個の炭素環原子を有する。

【0118】

単独または別の基の一部に関わらず、炭素環式基は、例えば、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')$ 、及び $-CN$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の基、好ましくは、1または2個の基（及びハロゲンから選択される任意の追加の置換基）で任意に置換され得、式中、各 R' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、または $-アリール$ から選択され、該 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル)、及び $-アリール$ 基は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-H$ 、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')$ 、及び $-CN$ を含むがこれらに限定されない1つ以上の置換基でさらに任意に置換され得、式中、各 R'' は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、または $-アリール$ から選択される。

【0119】

単環式炭素環式置換基の例としては、 $-シクロプロピル$ 、 $-シクロブチル$ 、 $-シクロペンチル$ 、 $-1-シクロペント-1-エニル$ 、 $-1-シクロペント-2-エニル$ 、 $-1-シクロペント-3-エニル$ 、 $-シクロヘキシル$ 、 $-1-シクロヘキシ-1-エニル$ 、 $-1-シクロヘキシ-2-エニル$ 、 $-1-シクロヘキシ-3-エニル$ 、 $-シクロヘプチル$ 、 $-シクロオクチル$ 、 $-1, 3-シクロヘキサジエニル$ 、 $-1, 4-シクロヘキサジエニル$ 、 $-1, 3-シクロヘプタジエニル$ 、 $-1, 3, 5-シクロヘプタトリエニル$ 、及び $-シクロオクタジエニル$ が挙げられる。

【0120】

単独または別の基の一部に関わらず、「炭素環」は、上に定義されるように任意に置換された二価である炭素環式基（すなわち、親炭素環式環系の同じかまたは2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって導出されたもの）を指す。

【0121】

文脈により別途示されない限り、ハイフン（ $-$ ）は、ペンダント分子への結合点を示す。したがって、「 $-(C_1-C_8$ アルキレン)アリール」または「 $-C_1-C_8$ アルキレン(アリール)」という用語は、アルキレンラジカルが、アルキレンラジカル炭素原子のいずれかでペンダント分子に結合し、アルキレンラジカル炭素原子に結合した水素原子のうちの1つが、本明細書に定義されるようにアリールラジカルで置き換えられる、本明細書に定義される C_1-C_8 アルキレンラジカルを指す。

【0122】

分子内の特定の位置の任意の置換基または変数の定義は、その分子の他の箇所におけるその定義から独立していることが意図される。本発明の化合物上の置換基または置換パターンは、化学的に安定であり、当該技術分野で既知の技術、ならびに本明細書に記載のものによって容易に合成することができる化合物を提供するように、当業者によって選択され得ることを理解されたい。

【0123】

「AFP」という略語は、ジメチルバリニン-バリンドライソロイン (dolaisoleuine) - ドラプロイン (dolaproine) - フェニアラニン-p-フェニレンジアミンを指す (以下の式 (XVII) を参照されたい)。

【0124】

「MAE」という略語は、モノメチルオーリスタチンEを指す (以下の式 (XII) を参照されたい)。

【0125】

「AB」という略語は、オーリスタチンEをパラアセチル安息香酸と反応させることによって産生されるエステルを指す (以下の式 (XXI) を参照されたい)。

【0126】

「EVB」という略語は、オーリスタチンEをベンゾイル吉草酸と反応させることによって産生されるエステルを指す (以下の式 (XXII) を参照されたい)。

【0127】

「MAF」という略語は、モノメチルオーリスタチンF (以下の式 (XXI) を参照されたい)。

【0128】

抗体

ある特定の態様において、本明細書に記載される方法、キット、及び組成物は、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、表1～6に要約される1つ以上の特徴を有する抗GCC抗体分子を含む。

【0129】

好ましい実施形態において、抗GCC抗体分子は、抗体5F9、すなわち、表3に提供される可変軽鎖及び可変重鎖のアミノ酸配列を含む抗体である。抗体5F9は、ハイブリドーマ5F9 (PTA-8132) または別の好適な細胞系、例えば、哺乳動物細胞系、例えば、ヒト細胞系、NSO細胞系またはCHO細胞系によって産生され得る。他の好ましい実施形態において、抗GCC抗体分子は、抗体5F9に由来する。

【0130】

ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、本明細書に記載される範囲で、直接結合または競合結合アッセイによって測定される、GCCに対する親和性を有する。ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、 1×10^{-6} M未満、 1×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、 1×10^{-11} M未満、 1×10^{-12} M未満、または 1×10^{-13} M未満の K_d を有する。ある実施形態において、抗体分子は、IgGまたはその抗原結合フラグメントであり、 1×10^{-6} M未満、 1×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、または 1×10^{-9} M未満の K_d を有する。ある実施形態において、抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体、またはそれに由来する抗体は、約80～約200 pM、好ましくは、約100～約150 pM、または約120 pMの K_d を有する。ある実施形態において、抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体、またはそれに由来する抗体は、約0.9～約1.25 $\times 10^5$ M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、好ましくは、約1.1 $\times 10^5$ M $^{-1}$ s $^{-1}$ の k_a を有する。ある実施形態において、抗体分子は、ScFvであり、 1×10^{-6} M未満、 1×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、 1×10^{-11} M未満、 1×10^{-12} M未満、または 1×10^{-13} M未満の K_d を有する。

【0131】

いくつかの実施形態において、抗体分子は、免疫複合体の一部であり、例えば、免疫複

10

20

30

40

50

合体は、G C Cに結合したときに細胞反応を引き起こすこと、及び内部移行して、それが結合するG C C発現細胞に薬剤を送達することの両方を行い得る。

【0132】

いくつかの実施形態において、本発明の抗G C C抗体分子は、G C Cへのリガンドの結合を遮断し得る。

【0133】

ある実施形態において、抗G C C抗体分子は、ラットG C C及びマウスG C Cの一方または両方と実質的な交差反応を示すことができない。

【0134】

天然に存在する哺乳動物の抗体構造単位は、四量体の特徴とする。各四量体は、各対が1つの「軽」鎖（約25 kDa）及び1つの「重」鎖（約50～70 kDa）を有する、2対のポリペプチド鎖から構成される。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約100～110、またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、 κ 及び λ 軽鎖として分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、 α 、または ϵ として分類され得、抗体のアイソタイプを、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEとして定義し得る。軽鎖及び重鎖内で、可変及び定常領域は、約12またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域によって接合され、重鎖は、さらに約10個多いアミノ酸の「D」領域を含む。一般に、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989))を参照されたい。各軽鎖／重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。抗G C C抗体分子の好ましいアイソタイプは、IgG免疫グロブリンであり、これは、異なる γ 重鎖を有するIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4の4つのサブクラスに分類され得る。ほとんどの治療的抗体は、IgG1型のヒト、キメラ、またはヒト化抗体である。具体的な実施形態において、抗G C C抗体分子は、IgG1アイソタイプである。

【0135】

各重鎖及び軽鎖対の可変領域は、抗原結合部位を形成する。したがって、インタクトなIgG抗体は、同じである2つの結合部位を有する。しかしながら、二機能性または二特異性抗体は、人工的なハイブリッド構築物であり、2つの異なる重鎖／軽鎖対を有し、結果として2つの異なる結合部位をもたらす。

【0136】

鎖は、すべてが、相互性決定領域またはCDRとも称される3つの超可変領域によって接合された、同じ一般構造の比較的保存されたフレームワーク領域（FR）を示す。各対の2つの鎖からのCDRは、特定のエピトープへの結合を可能にするフレームワーク領域によってアライメントされる。N末端からC末端へ、軽鎖及び重鎖のいずれも、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4ドメインを含む。各ドメインへのアミノ酸の割り付けは、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))またはChothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989)に従う。本明細書に使用されるとき、CDRは、重鎖（HCDR1、HCDR2、HCDR3）及び軽鎖（LCDR1、LCDR2、LCDR3）のそれぞれに関して言及される。

【0137】

抗G C C抗体分子は、本明細書に記載される抗体の重鎖及び軽鎖の一方または両方のCDRのすべて、またはその抗原結合サブセットを含み得る。例えば、抗G C C抗体分子は、表3及び表5に記載される可変領域及び／またはCDRを含む、アミノ酸配列を含み得る。抗G C C抗体分子のさらなる説明は、国際出願第WO2011/050242号に見出され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0138】

したがって、ある実施形態において、抗体分子は、次のうちの1つまたは両方を含む：

(a) 表5の軽鎖CDR(LCDR1、LCDR2、及び/またはLCDR3)のうちの1つ、2つ、3つ、または抗原が結合する個数。実施形態において、CDR(複数可)は、以下のLCDR1~3の1つ以上またはすべてのアミノ酸配列を含み得る：LCDR1、または1~7個のアミノ酸は保存的に置換される修飾されたLCDR1)、LCDR2、または1もしくは2個のアミノ酸が保存的に置換される修飾されたLCDR2)；あるいはLCDR3、または1もしくは2個のアミノ酸が保存的に置換される修飾されたLCDR3；及び

(b) 表5の重鎖CDR(HCDR1、HCDR2、及び/またはHCDR3)のうちの1つ、2つ、3つ、または抗原が結合する個数。実施形態において、CDR(複数可)は、以下のHCDR1~3の1つ以上またはすべてのアミノ酸配列を含み得る：HCDR1、または1もしくは2個のアミノ酸は保存的に置換される修飾されたHCDR1；HCDR2、または1~4個のアミノ酸が保存的に置換される修飾されたHCDR2；あるいはHCDR3、または1もしくは2個のアミノ酸が保存的に置換される修飾されたLCDR3。

【0139】

抗GCC抗体の産生に有用な免疫原には、GCC、例えば、ヒトGCC発現細胞(例えば、GCCを発現する腫瘍細胞系、例えば、T84細胞、または新しいもしくは凍結させた結腸腫瘍細胞、組み換え細胞)；GCC発現細胞の膜画分(例えば、GCCを発現する結腸腫瘍細胞系、例えば、T84細胞、または新しいもしくは凍結させた結腸腫瘍細胞、組み換え細胞、例えば、全長GCCまたはその一部分を発現するHT-29-GCC#2細胞、例えば、GCC細胞外ドメイン、例えば配列番号61を含む部分を発現するCHO

GCC#27細胞)；単離または精製GCC、例えば、ヒトGCCタンパク質(例えば、例としてGCCもしくはその変異体を発現する消化器腫瘍細胞もしくは組み換え細胞から生化学的に単離したGCC)、またはその一部分(例えば、GCCの細胞外ドメイン、GCCのキナーゼ相同性ドメイン、またはGCCもしくはその一部分、例えば、配列番号3の少なくとも約8、10、12、14、16、20、24、28、もしくは32個のアミノ酸残基に対応するペプチドのグアニリルシクラーゼ触媒ドメイン)；あるいは配列番号16またはシグナル配列を有さないその成熟部分(すなわち、配列番号16のアミノ酸残基1~約21もしくは23)を含む免疫原、例えば成熟TOK107-hIgGタンパク質、配列番号62が挙げられる。

【0140】

抗GCC抗体分子のエピトープは、配列番号3の残基1~50、または本発明の抗GCC抗体分子に結合するそのフラグメント、例えば、その5F9結合フラグメント内に存在し得るか、またはそこからの残基(複数可)を含み得る。そのようなフラグメントは、配列番号3の残基1~25、5~30、10~35、15~40、20~45、25~50、5~45、10~40、15~35、20~30、または33~50を含み得る。いくつかの実施形態において、抗GCC抗体分子、例えば5F9抗体のエピトープは、GCCアミノ酸配列の残基50以降、すなわち、配列番号3の約残基50~1073から選択される、1つ以上の追加のアミノ酸残基をさらに含む、立体構造エピトープである。

【0141】

別の例において、抗GCC抗体分子のエピトープは、配列番号5、または配列番号3の残基271~300、または本発明の抗GCC抗体分子に結合するそのフラグメント内に存在し得るか、またはそこからの残基(複数可)を含み得る。そのようなフラグメントは、配列番号3の残基281~290、または配列番号3の残基281~290を含み得、ここで、残基281は、ロイシン、または配列番号3の残基281~300または配列番号3の271~290である。いくつかの実施形態において、抗GCC抗体分子のエピトープは、1つ以上の追加のアミノ酸残基、すなわち、GCCアミノ酸配列の非配列番号5残基、例えば、配列番号3の約残基1~270及び/または約301~1073から選択

されるものをさらに含む、立体構造エピトープである。

【0142】

ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：

a) それは、結合、例えば、細胞表面GCCまたは精製されたGCCへの結合について、上で参照された表1及び2に要約される抗GCC抗体分子のうちの1つ、例えば、5F9と競合する、

b) 上で参照された表1及び2に要約される抗GCC抗体分子のうちの1つ、例えば、5F9と同じかまたは実質的に同じGCC上のエピトープに結合する。ある実施形態において、抗体は、ペプチドアレイアッセイまたは細胞表面または膜調製物に発現する切断突然変異体、キメラ、もしくは点突然変異体への結合、例えば、本明細書に記載されるアッセイによって決定されるものと同じエピトープに結合する、

c) それは、上で参照された表1及び2に要約される抗GCC抗体分子のうちの1つ、例えば、5F9のエピトープと共通した少なくとも1、2、3、4、5、8、10、15、または20個の連続するアミノ酸残基を有するエピトープに結合する、

d) それは、本発明の抗GCC抗体によって結合されるヒトGCCの領域に結合し、ここで、この領域、例えば、細胞外または細胞質領域は、長さが10～15、10～20、20～30、または20～40残基であり、結合は、例えば、切断突然変異体への結合によって判定される。ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、ヒトGCCの細胞外領域に結合する。ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、配列番号3のアミノ酸残基24～420によって定義される細胞外止めインのヒトGCC部分に結合し得る。ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、配列番号3のアミノ酸残基931～954においてグアニル酸シクラーゼシグネチャー部位に結合し得る、あるいは、それは、本明細書に記載される参照エピトープに結合する。

【0143】

ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、GCC配列ILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLLVLTLS（配列番号5）に結合する。

【0144】

ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、GCC配列FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV（配列番号6）に結合する。

【0145】

ある実施形態において、抗体分子は、立体構造エピトープに結合する。他の実施形態において、抗体分子は、線形エピトープに結合する。

【0146】

抗GCC抗体分子は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一特異性抗体、キメラ抗体（米国特許第6,020,153号を参照されたい）、またはヒトもしくはヒト化抗体、あるいはそれらの抗体フラグメントもしくは誘導体であり得る。前述のもののいずれかの合成及び遺伝子操作変異体（米国特許第6,331,415号を参照されたい）もまた、本発明によって企図される。モノクローナル抗体は、従来のマウスモノクローナル抗体方法、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を含む、種々の技法によって産生され得る。一般には、Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい。抗GCC抗体の産生に関するさらなる詳細は、国際出願第WO2011/050242号に提供され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0147】

実施形態において、治療用途に関して、本発明の抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。ヒトまたはヒト化抗体の利点は、それらが、宿主レシピエントにおける抗体の免疫原性を低下または排除し、それによって、バイオアベイラビリティの増加及び不都合な免疫反

応の可能性の低減を可能にし、したがって、複数回の抗体の投与を可能にすることである。

【0148】

修飾された抗体には、ヒト化、キメラ、またはCDRグラフト抗体が含まれる。ヒトまたはヒト化抗GCC抗体の産生に関する詳細は、例えば、国際出願第WO2011/050242号に提供され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0149】

一部の実施形態ではIgG2重鎖定常領域及びκ軽鎖定常領域を含む、ヒト5F9抗体は、Millennium Pharmaceuticals Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, MA, 02139, USAを代表して受託番号PTA-8132の下に2007年1月10日にAmerican Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, U.S.A.に預けられた、ハイブリドーマ46.5F9.8.2とも称されるハイブリドーマ5F9によって産生され得る。(預け入れは、Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedureの要件に従い、かつそれを満たして行われた)。抗体5F9はまた、他の細胞系、例えば、哺乳動物細胞系、例えば、ヒト細胞系、NSO細胞系、またはCHO細胞系によって産生され得る(実施例4を参照されたい)。本明細書に記載されるように、ハイブリドーマ5F9は、IgG2、κ抗体を産生する。しかしながら、IgG2領域は、5F9 IgG1抗体を産生するように、例えば、IgG1領域と置き換えられ得る。

【0150】

ヒト定常領域遺伝子の配列は、Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. publication no. 91-3242に見出され得る。ヒトC領域遺伝子は、既知のクローンから容易に利用可能である。アイソタイプの選択は、所望されるエフェクター機能、例えば、補体結合、または抗体依存性細胞毒性における活性によって導かれる。アイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4であり得る。具体的な実施形態において、本発明の抗体分子は、IgG1及びIgG2である。ヒト軽鎖定常領域、κまたはλのいずれかが使用され得る。キメラのヒト化抗体が、次いで、従来の方法によって発現される。

【0151】

いくつかの実施形態において、本発明の抗GCC抗体分子は、GCCを発現する細胞、例えば、腫瘍細胞に対する抗体依存性細胞毒性(ADCC)を引き出すことができる。IgG1及びIgG3アイソタイプを有する抗体は、Fc受容体に結合するそれらの能力に起因して、抗体依存性細胞毒能力においてエフェクター機能を誘起するのに有用である。IgG2及びIgG4アイソタイプを有する抗体は、Fcに結合するそれらの能力が低いいため、ADCC応答を最小化させるのに有用である。関連する実施形態において、Fc領域における置換、または例えば、修飾された真核生物細胞系での成長によるグリコシル化組成における変化は、抗GCC抗体が結合する細胞を認識する、それに結合する、及び/またはその細胞毒性を媒介するFc受容体の能力を強化するために行われ得る(例えば、米国特許第7,317,091号、同第5,624,821号、及び国際公開第WO00/42072号、Shields, et al. J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001)、Lazar et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:4005-4010 (2006)、Sato et al. Expert Opin Biol. Ther. 6:1161-1173 (2006)を含む刊行物を参照されたい)。ある特定の実施形態において、抗体または抗原結合フラグメント(例えば、ヒト起源の抗体、ヒト抗体)は、機能(例えば、エフェクター機

能)を変化または調整するアミノ酸置換または置き換えを含み得る。例えば、ヒト起源の定常領域(例えば、 $\gamma 1$ 定常領域、 $\gamma 2$ 定常領域)は、補体活性化及び/またはFc受容体結合を低減させるように設計され得る。(例えば、米国特許第5,648,260号(Winterら)、同第5,624,821号(Winterら)、及び同第5,834,597号(Tsoら)を参照されたく、これらの全教示は、参照により本明細書に組み込まれる)。好ましくは、そのようなアミノ酸置換または置き換えを含有するヒト起源の定常領域のアミノ酸配列は、改変されていないヒト起源の定常領域のアミノ酸配列に、全長にわたって少なくとも約95%同一であり、より好ましくは、改変されていないヒト起源の定常領域のアミノ酸配列に、全長にわたって少なくとも約99%同一である。

【0152】

ヒト化抗体は、例えば、CDRグラフトのアプローチを使用して作製され得る。そのようなヒト化抗体の生成技法は、当該技術分野で既知である。一般に、ヒト化抗体は、GCCに結合する抗体の可変重鎖及び可変軽鎖配列をコードする核酸配列を得、可変重鎖及び可変軽鎖配列内の相補性決定領域または「CDR」を特定し、そのCDR核酸配列をヒトフレームワーク核酸配列にグラフトすることによって産生される。(例えば、米国特許第4,816,567号及び同第5,225,539号を参照されたい)。CDR及びフレームワーク残基の位置を決定することができる(Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)を参照されたい)。本明細書に記載される例示的な抗GCC抗体分子は、表5及び6に列挙されるCDRアミノ酸配列及びCDRをコードする核酸配列を有する。いくつかの実施形態において、表5及び6からの配列は、本明細書に記載される治療または診断方法における使用のために、GCCを認識する分子に組み込まれ得る。選択されるヒトフレームワークは、インビボ投与に好適なものである、すなわち、それは、好ましくは、投与の条件下において相当な危険度-有益性比以内の免疫原性を示さない。例えば、そのような決定は、そのような抗体のインビボ使用での以前の経験、及びアミノ酸類似性の研究によって行われ得る。好適なフレームワーク領域は、フレームワーク領域の全長にわたって、ドナー抗体、例えば、抗GCC抗体分子の同等部分(例えば、フレームワーク領域)のアミノ酸配列内に、少なくとも約65%のアミノ酸配列同一性、及び好ましくは、少なくとも約70%、80%、90%、または95%のアミノ酸配列同一性を有するヒト起源の抗体から選択され得る。アミノ酸配列同一性は、好適なアミノ酸配列アライメントアルゴリズム、例えばCLUSTAL Wを使用して、デフォルトのパラメーターを用いて決定され得る。(Thompson J. D. et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994))。

【0153】

他の実施形態において、CDRグラフト抗体による免疫原性応答の低減は、CDR内のアミノ酸残基の変化、例えば、欠失、置換によって達成され得る(Kashmiri et al. *Methods* 36:25-34 (2005)、米国特許第6,818,749号、Tan et al. *J. Immunol.* 169:1119-1125 (2006))。例えば、抗原との接触に関与する位置の残基は、好ましくは、変化しない。典型的に、そのような残基、SDRは、抗体間で高レベルの可変性を示す位置にある。例えば、Clustal方法(Higgins D. G. et al., *Methods Enzymol.* 266:383-402 (1996))によって、抗GCC抗体分子、例えば、本明細書に記載される抗体から導出されるコンセンサス配列(例えば、配列番号63~68)は、SDRの特定を補助する。本明細書に記載されるヒト抗GCC抗体分子において、SDRは、次のものである、重鎖CDR1の少なくとも最初の残基、またはいくつかの実施形態では最初の4個の残基；重鎖CDR2の少なくともN末端部分、例えば、最初の

7、10、または13個の残基；重鎖CDR3のほぼすべて；軽鎖CDR1のC末端部分、例えば、残基6、8、または9の後；軽鎖CDR2のおおよそ最初、中間、及び／または最後の残基；ならびに軽鎖CDR3の大部分、または少なくとも残基2もしくは3の後。したがって、抗GCC抗体分子のヒト化または修飾後のGCCタンパク質への結合を維持するために、抗GCC抗体分子のCDR内のそのようなSDR残基は、例えば、マウス残基からヒトコンセンサス残基への変化に対して、CDRまたはフレームワーク領域の他の残基内の残基よりも、変化しにくい。逆に、非ヒト、例えば、マウスCDR内の残基を、ヒトCDR、例えば、本明細書に記載される抗GCC抗体分子のCDR（例えば、表5に列挙される配列）においてコンセンサスとして特定された残基に変化させることが有益であり得る。例えば、セリンは、重鎖CDR1のC末端のヒト残基を表し得る、ならびに／またはチロシンは、重鎖CDR1の第2及び／もしくは第3の残基のヒト残基を表し得る；重鎖CDR2は、S－(L/V)－K－(S/G)（配列番号7）で終了して、ヒトCDRを表し得る；ヒトCDR3を表すために、重鎖CDR3内で4～6個の残基の後にグリシンが存在し得る、ならびに／または6～9個の残基にアスパラギン酸塩が存在し得る；軽鎖CDR1は、(K/R)－(A/S)－SQS－(V/L)－(S/L)（配列番号8）で開始し、ヒトCDRを表し得る；軽鎖CDR2は、3番目の残基にセリン、及び／または5番目の残基にアルギニンを有し得、ヒトCDRを表し得る；ならびに／あるいは軽鎖CDR3は、第2の残基にグルタミン及び／または第3の残基にセリンを有し、ヒトCDRを表し得る。

10

【0154】

20

インタクトな抗体ではない抗GCC抗体もまた、本発明に有用である。そのような抗体は、上述の抗体のうちのいずれかに由来し得る。この種の有用な抗体分子には、(i) VL、VH、CL、及びCH1ドメインからなる一価フラグメントであるFabフラグメント；(ii) ヒンジ領域でのジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントである、F(ab')₂フラグメント；(iii) VH及びCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の単一のアームのVL及びVHドメインからなる、Fvフラグメント(v) VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., Nature 341:544-546 (1989))；(vi) VHドメインからなる単一ドメイン機能性重鎖抗体（ナノボディとして知られる）、例えば、Cortez-Retamozo, et al., Cancer Res. 64:2853-2857 (2004) 及びその中で引用される参考文献を参照されたい；ならびに(vii) 単離CDR、例えば、抗原結合フラグメントを提供するのに十分なフレームワークとともに、1つ以上の単離CDRが挙げられる。さらに、Fvフラグメント、VL、及びVHのうちの2つのドメインは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組み換え方法を使用して、VL及びVH領域が対合して一価分子（一本鎖Fv(scFv)として知られる）を形成する単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Bird et al. Science 242:423-426 (1988) 及びHuston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988) を参照されたい。そのような一本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合フラグメント」という用語に包含されることが意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に既知の従来の技法を使用して得られ、フラグメントは、インタクトな抗体と同じ様式で可用性に関してスクリーニングされる。抗体フラグメント、例えば、Fv、F(ab')₂、及びFabは、例えば、プロテアーゼまたは化学的切断によるインタクトなタンパク質の切断によって、調製され得る。

30

40

【0155】

実施形態には、細胞表面GCCへの結合を可能にするのに十分なCDR、例えば、表5からの6つすべてのCDRを含む、抗体分子が含まれる。

【0156】

ある実施形態において、CDR、例えば、HCDRのすべて、LCDRのすべて、また

50

は6つすべては、ヒトまたはヒト由来のフレームワーク領域（複数可）に埋め込まれる。ヒトフレームワーク領域の例としては、ヒト生殖細胞系フレームワーク配列、親和性成熟した（インビボもしくはインビトロのいずれかで）ヒト生殖細胞系配列、または合成ヒト配列、例えば、コンセンサス配列が挙げられる。ある実施形態において、重鎖フレームワークは、IgG1またはIgG2フレームワークである。ある実施形態において、軽鎖フレームワークは、κフレームワークである。

【0157】

抗GCC抗体分子は、上で参照したヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの1つの重鎖及び軽鎖の一方または両方の可変領域のすべてまたは1つの抗原結合フラグメントを含み得る。

10

【0158】

ある実施形態において、(a)の軽鎖アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、10、または15個程度の残基が(a)(i~ii)において言及される参照アミノ酸配列（複数可）のものとは異なり得る。実施形態において、相違は、保存的置換である。実施形態において、相違は、フレームワーク領域内のものである。ある実施形態において、(b)の重鎖アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、10、または15個の残基が(b)(i~ii)において言及されるアミノ酸配列（複数可）のものとは異なり得る。実施形態において、相違は、保存的置換である。実施形態において、相違は、フレームワーク領域内のものである。

【0159】

20

ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、次のうちの一方または両方を含む：

(a)(i)表3からの軽鎖可変領域アミノ酸配列、例えば、配列番号20、または(ii)表4からのヌクレオチド配列、例えば、配列番号19によってコードされる軽鎖可変領域アミノ酸のいずれかのすべてもしくは1つの抗原結合フラグメントの軽鎖アミノ酸配列、及び

(b)(i)表3からの重鎖可変領域アミノ酸配列、例えば、配列番号18、または(ii)表4からのヌクレオチド配列、例えば、配列番号17によってコードされる重鎖アミノ酸配列のいずれかのすべてもしくは1つの抗原結合フラグメントの重鎖アミノ酸配列。

【0160】

30

ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、次のうちの一方または両方を含む：

a)本発明の抗GCC抗体分子、例えば、上で参照されたヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの1つの軽鎖可変領域との少なくとも85、90、95、97、または99%の相同性を有する、軽鎖可変領域、またはそのフラグメント、及び

(b)本発明の抗GCC抗体分子、例えば、上で参照されたヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの1つの重鎖可変領域との少なくとも85、90、95、97、または99%の相同性を有する、重鎖可変領域、またはそのフラグメント。

【0161】

40

例示的な抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列は、表3に見出され得る。

【0162】

ある実施形態において、抗GCC抗体分子は、5F9抗体分子であり、次のうちの1つまたは両方を含む：a)配列番号32からの重鎖定常領域のすべてまたは1つのフラグメント、及びb)配列番号34からの軽鎖定常領域のすべてまたは1つのフラグメント。

【0163】

別の実施形態において、抗GCC抗体分子は、Abx-229抗体分子であり、次のうちの1つまたは両方を含む：a)配列番号46からの重鎖可変領域のすべてまたはGCC結合フラグメント、及びb)配列番号48からの軽鎖可変領域のすべてまたはGCC結合フラグメント。

50

【0164】

1つのアプローチにおいて、重鎖及び軽鎖のJ領域をコードするコンセンサス配列を使用して、後続のヒトC領域セグメントへのV領域セグメントの連結のために有用な制限部位をJ領域に導入するためのプライマーとして使用するためのオルゴヌクレオチドを設計することができる。C領域cDNAは、部位特異的変異生成によって、ヒト配列内の類似位置に制限部位を配置するように修飾され得る。

【0165】

発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソーム等が挙げられる。便宜的なベクターは、任意のVHまたはVL配列が容易に導入され、発現され得るように、適切な制限部位が操作された、機能的に完全なヒトCHまたはCL免疫グロブリン配列をコードするものである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは、通常、挿入されたJ領域内のスプライス供与部位と、ヒトC領域に先立つスプライス受容部位との間で生じ、またヒトCHエクソン内に生じるスプライス部位においても生じる。好適な発現ベクターは、いくつかの構成要素、例えば、複製起点、選択可能マーカー遺伝子、1つ以上の発現制御要素、例えば、転写制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、転写終結因子）、及び／または1つ以上の翻訳シグナル、シグナル配列またはリーダー配列等を含有し得る。ポリアデニル化及び転写終結は、コード領域の下流の天然の染色体上の部位で生じる。結果として得られるキメラ抗体は、任意の強力なプロモーターに接合され得る。使用され得る好適なベクターの例には、哺乳動物宿主に好適であり、ウイルス複製系、例えば、シミアンウイルス40(SV400)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、アデノウイルス2、ウシバビローマウイルス(BPV)、パポーウイルスBK突然変異体(BKV)、またはマウス及びヒトサイトメガロウイルス(CMV)、ならびにモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)、天然のIgプロモーター等に基づくものがあげられる。単一コピーもしくは複数コピーで維持されるベクター、または、例えばLTRによって、もしくは複数の組み込み部位を有するように操作された人工染色体を介して、宿主細胞の染色体に組み込まれるようになるベクターを含む、種々の好適なベクターが当該技術分野で既知である(Lindenbaum et al. Nucleic Acids Res. 32:e172(2004), Kennard et al. Biotechnol. Bioeng. Online May 20, 2009)。好適なベクターのさらなる例は、後続の節に列挙される。

【0166】

したがって、本発明は、抗体、抗体の抗原結合フラグメント（例えば、ヒト、ヒト化、キメラ抗体、もしくは前述のもののいずれかの抗原結合フラグメント）、抗体鎖（例えば、重鎖、軽鎖）、またはGCCタンパク質に結合する抗体の抗原結合部分をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。

【0167】

真核生物宿主細胞での発現は、そのような細胞が、適切に折り畳まれ、かつ免疫学的に活性な抗体を構築し、分泌する可能性が原核生物細胞よりも高いため、有用である。しかしながら、不適切な折り畳みに起因して不活性である産生されたいずれの抗体も、既知の方法に従って復元することができる(Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reaction of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", Ann. Rev. Biochem. 51, pp. 459-89(1982))。宿主細胞が、例えば、本発明によると抗体相同体でもある軽鎖二量体もしくは重鎖二量体といった、インタクトな抗体の部分を産生することは、可能である。

【0168】

生成される抗体は、必ずしも特定の所望されるアイソタイプを最初に有するわけではなく、抗体は、生成されたときに、任意のアイソタイプを有し得ることが理解されるであろう。例えば、5F9ハイブリドーマ(ATCC受託番号PTA-8132)によって産生

される抗体は、I g G 2 アイソタイプを有する。抗体のアイソタイプは、その後、当該技術分野で既知の従来技術を使用して、抗体が細胞上の G C C に結合すると A D C C 応答を誘起するように、例えば、I g G 1 または I g G 3 へと切り替えられ得る。そのような技法には、とりわけ、直接組み換え技法（例えば、米国特許第 4, 8 1 6, 3 9 7 号を参照されたい）、細胞－細胞融合技法（例えば、米国特許第 5, 9 1 6, 7 7 1 号を参照されたい）の使用が挙げられる。細胞－細胞融合技法では、任意の所望されるアイソタイプを有する重鎖を有する骨髓腫または他の細胞系が調製され、軽鎖を有する別の骨髓腫または他の細胞系が調製される。そのような細胞がその後で融合され得、インタクトな抗体を発現する細胞系が単離され得る。

【0169】

ある特定の実施形態において、G C C 抗体分子は、ヒト抗 G C C I g G 1 抗体である。そのような抗体は、G C C 分子への所望される結合を有するため、そのような抗体のうちの任意のものは、例えば、依然として同じ可変領域（抗体の特異性及び親和性のある程度定義する）を有すると同時に、ヒト I g G 4 アイソタイプを生成するように、容易にアイソタイプスイッチを行うことができる。したがって、上述の所望される「構造的」属性を満たす抗体候補が生成されるとき、それらは、一般に、アイソタイプスイッチを通じて所望される少なくともある特定の追加の「機能的」属性を有して提供され得る。

【0170】

ある実施形態において、可変領域またはその抗原結合フラグメントは、それが生成された定常領域以外の定常領域（もしくはそのフラグメント）、例えば、別の抗体由来の定常領域（もしくはそのフラグメント）、または合成定常領域（もしくはそのフラグメント）に連結され得る。実施形態において、定常領域は、I g G 1 または I g G 2 定常領域（もしくはそのフラグメント）である。抗体分子のエフェクター活性を変化させるために、配列変化が可変または定常領域になされ得る。

【0171】

他の治療薬の設計及び生成

本明細書において産生され、G C C に関して特徴付けられる抗体は、他の抗体、他のアンタゴニスト、または抗体以外の化学的部分を含む、他の治療様式の設計の促進を提供する。そのような様式には、類似の結合活性または機能性を有する抗体、先進的抗体治療薬、例えば、二特異性抗体、免疫複合体、及び放射標識治療薬、ペプチド治療薬、特に細胞内抗体の生成、及び小分子が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、上述のように、本発明の抗体のエフェクター機能は、種々の治療用途のために I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g D、I g A 1、I g A 2、I g E、または I g M へのアイソタイプスイッチによって変化させることができる。

【0172】

二特異性抗体に関して、(i) 一方が G C C に特異的でもう一方が一緒に複合体化される第 2 の分子に特異的である、2 つの抗体、(i i) G C C に特異的な 1 つの鎖及び第 2 の分子に特異的な第 2 の鎖を有する単一の抗体、または (i i i) G C C 及び他方の分子への特異性を有する一本鎖抗体を含む、二特異性抗体が、生成され得る。そのような二特異性抗体は、既知の技法を使用して生成され得る。

【0173】

加えて、「κ ボディ」(I l l . et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" Protein Eng 10: 949-57 (1997))、「ミニボディ」(Martin et al. EMBO J 13: 5303-9 (1994)、米国特許第 5, 837, 821 号)、「ダイアボディ」(Holliger et al. Proc Natl Acad Sci USA 90: 6444-6448 (1993))、または「ヤヌシン (Janusin)」(Traunecker et al. EMBO J 10: 3655-3659 (199

10

20

30

40

50

1) 及び Traunecker et al. Int J Cancer Suppl 7: 51-52 (1992)) もまた、調製することができる。

【0174】

ポリペプチド

別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載される抗体分子を表すポリペプチド配列に関する。

【0175】

本発明は、本発明の抗体、ならびにそのようなポリペプチドのフラグメント、類似体、及び誘導体を表すポリペプチドに関する。ポリペプチドは、組み換えポリペプチド、天然に産生されるポリペプチド、または合成ポリペプチドであり得る。本発明のポリペプチドのフラグメント、誘導体、または類似体は、アミノ酸残基のうちの1つ以上が、保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは、保存アミノ酸残基）で置換されるもの（かつそのような置換アミノ酸残基が、遺伝子コードによってコードされるものであってもそうでなくてもよい）であり得るか、あるいはそれは、アミノ酸残基のうちの1つ以上が、置換基を含むものであり得るか、あるいはそれは、ポリペプチドが別の化合物、例えば、ポリペプチド（例えば、ポリエチレングリコール）の半減期を増加させる化合物に融合されたものであり得るか、あるいは追加のアミノ酸が、ポリペプチド、例えば、リーダーもしくは分泌配列またはポリペプチドもしくは前駆タンパク質配列の生成に用いられる配列に融合されたものであり得る。そのようなフラグメント、誘導体、及び類似体は、本発明の範囲内に含まれる。種々の態様において、本発明のポリペプチドは、部分的に精製され得るか、または精製された生成物であり得る。

【0176】

ポリペプチドは、本明細書に記載される、例えば、表2もしくは3に要約される抗体のものと同一であるか、または1つ以上のアミノ酸置換に起因するわずかな変異により異なる、アミノ酸配列を有し得る。変異は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する、典型的には約1～5個の範囲のアミノ酸における「保存的变化」、例えば、ロイシンとイソロイシンまたはスレオニンとの置き換え、リジンとアルギニンまたはヒスチジンとの置き換えであり得る。対照的に、変異には、非保存的变化、例えば、グリシンとトリプトファンとの置き換えが含まれ得る。類似のわずかな変異には、アミノ酸の欠失もしくは挿入、またはその両方が含まれ得る。生物学的または免疫学的活性を変化させることなくどのアミノ酸残基がいくつ置換、挿入、または欠失され得るかを決定する際の指針は、当該技術分野で既知のコンピュータプログラム、例えば、DNA STARソフトウェア（DNA STAR, Inc., Madison, Wis.）を使用して見出すことができる。

【0177】

さらなる態様において、抗体分子は、ATCC受託番号PTA-8132を有するDNAによってコードされる抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列のアミノ酸配列を含む。他のさらなる態様において、抗体分子は、ATCC受託番号PTA-8132を有するDNAによってコードされる抗体の重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を含む。

【0178】

理解されるように、本発明による抗体は、ハイブリドーマ細胞系以外の細胞系において発現され得る。特定の抗体のcDNAまたはゲノムクローンをコードする配列を、好適な哺乳動物または非哺乳動物宿主細胞に使用することができる。形質転換は、例えば、ポリヌクレオチドをウイルス（もしくはウイルスベクター）に封入すること及び宿主細胞にウイルス（もしくはベクター）を形質導入することを含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の既知の方法、または異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための当該技術分野で既知のトランスフェクション手順、例えば、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチド（複数可）のリボソームへの封入、及びDNA分子の直接的マイクロインジェクションによるものであり得る

。使用される形質転換手順は、形質転換される宿主に依存する。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は、当該技術分野で既知であり、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、微粒子銃、ポリヌクレオチド（複数可）のリボソームへの封入、ペプチド複合体、デンドリマー、及びDNAの核内への直接的マイクロインジェクションが挙げられるがこれらに限定されない。

【0179】

融合タンパク質及び免疫複合体

本明細書に記載される抗GCC抗体は、任意の好適な方法（例えば、化学結合、遺伝子融合、非共有結合、またはその他）によって、1つ以上の非抗体分子実体に機能的に連結され得る。

10

【0180】

本明細書に記載される抗GCC抗体分子及び非抗体部分が連続した一本のポリペプチド鎖の構成要素である、融合タンパク質が、産生され得る。非抗体部分は、抗体部分に対して、N末端側、C末端側、または内部に位置付けられ得る。例えば、いくつかの実施形態は、免疫グロブリン配列をコードする核酸を、好適な発現ベクター、例えば、pETベクター（例えば、pET-15b、Novagen）、ファージベクター（例えば、pCNATAB 5 E、Pharmacia）、または他のベクター、例えば、pRIT2TプロテインA融合ベクター、Pharmacia）に挿入することによって、産生され得る。結果として得られる構築物は、非抗体部分（例えば、ヒスチジンタグ、Eタグ、またはプロテインA IgG結合ドメイン）を含む抗体鎖を産生するように発現され得る。融合タンパク質は、任意の好適な技法、例えば、好適な親和性マトリックスを用いたクロマトグラフィーを使用して、単離または回収することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M. et al., eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16. 4. 1-16. 7. 8 (1991)を参照されたい)。

20

【0181】

本発明は、細胞指向性であり、実施形態において、細胞に内部移行される、抗GCC抗体分子を提供する。それらは、治療剤または検出可能な薬剤を、GCCを発現する細胞にまたは細胞内に送達することができるが、標的が発現されていない細胞にまたは細胞内には送達することはできない。したがって、本発明はまた、治療剤または検出可能な薬剤に複合体化された本明細書に記載される抗GCC抗体分子を含む、免疫複合体を提供する。実施形態において、免疫複合体のGCCに対する親和性は、複合体化していない抗体のものの少なくとも10、25、50、75、80、90、または95%である。これは、細胞表面GCCまたは単離GCCを使用して決定され得る。ある実施形態において、抗GCC抗体分子、例えば、免疫複合体は、本明細書に記載されるアッセイによって決定される、1、000未満、500未満、250未満、100未満、または50 pM未満のLD50を有する。

30

【0182】

抗GCC抗体分子は、当該技術分野で既知の技法を用いて免疫複合体として作用するように修飾することができる。例えば、Vitetta Immunol Today 14: 252 (1993)を参照されたい。米国特許第5, 194, 594号もまた参照されたい。放射標識抗体の調製物もまた、当該技術分野で既知の技法を用いて容易に調製することができる。例えば、Junghans et al. in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))を参照されたい。米国特許第4, 681, 581号、同第4, 735, 210号、同第5, 101, 827号、同第5, 102, 990号（米国再発行特許第35, 500号）、同第5, 648, 471号、及び同第5, 697, 902号もまた参照されたい。

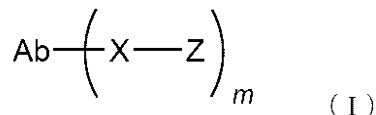
40

50

【0183】

いくつかの実施形態において、抗体分子及び非抗体部分は、リンカーを用いて接続される。そのような実施形態において、免疫複合体は、式（I）によって表され、

【化9】



式中、

Abは、本明細書に記載される抗GCC抗体分子であり、

10

Xは、AbとZとを接続する部分、例えば、Ab及びZの一方または両方への共有結合後の本明細書に記載されるリンカーの残基であり、

Zは、治療剤または標識であり、

mは、約1～約15の範囲に及ぶ。

【0184】

変数mは、式（I）の免疫複合体中の抗体分子1つ当たりの-X-Z部分の数を表す。いくつかの実施形態において、mは、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、または2～3の範囲に及ぶ。いくつかの実施形態において、mは、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、または2～3の範囲に及ぶ。他の実施形態において、mは、1、2、3、4、5、または6である。式（I）の複数の免疫複合体を含む組成物において、mは、平均薬物負荷量とも称される、Ab1つ当たりの-X-Z部分の平均数である（実施例において、組成物が、複数の免疫複合体を含む場合、mは、整数ではない数であってもよい（例えば、複数の複合体の平均として）。平均薬物負荷量は、Ab1つ当たり1～約15の-X-Z部分の範囲に及び得る。いくつかの実施形態において、mが平均薬物負荷量を表す場合、mは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、または約8である。例示的な実施形態において、mは、約2～約8である。別の実施形態において、mは、約4である。別の実施形態において、mは、約2である。

20

【0185】

Ab1つ当たりの-X-Z部分の平均数は、質量分析法、ELISAアッセイ、及びHPLC等の従来手段によって特徴付けることができる。mに関する免疫複合体の定量的分布もまた、判定することができる。いくつかの事例において、mが、他の薬物負荷量を有する免疫複合体とは区別されるある特定の値である場合の同種免疫複合体の分離、精製、及び特徴付けは、逆相HPLCまたは電気泳動等の手段によって達成され得る。

30

【0186】

種々の好適なリンカー（例えば、抗体分子を治療剤もしくは標識に接続するためのヘテロ二官能性試薬）及び免疫複合体を調製するための方法は、当該技術分野で既知である。（例えば、Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)を参照されたい）。リンカーは、リンカーの切断により細胞内環境に薬物（治療剤もしくは標的）が放出されるように、例えば、生理学的条件下で、例えば、細胞内条件下で切断可能であり得る。他の実施形態において、リンカーは切断可能でなく、薬物は、例えば、抗体分解によって放出される。

40

【0187】

リンカーは、抗体部分上の化学反応基、例えば、遊離アミノ、イミノ、ヒドロキシル、チオール、またはカルボキシル基に（例えば、NまたはC末端に、1つ以上のリジン残基のεアミノ基に、1つ以上のグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基の遊離カルボン酸基に、または1つ以上のシステイニル残基のスルフヒドリル基に）結合し得る。リンカーが結合する部位は、抗体部分のアミノ酸配列内の天然の残基であり得るか、あるいは、それは、例えば、DNA組み換え技術によって（例えば、システインもしくはプロテアーゼ切断部位をアミノ酸配列に導入することによって）またはタンパク質生化学（例えば、還元、pH調整、またはタンパク質分解）によって、抗体部分に導入され得る。

50

【0188】

ある特定の実施形態において、リンカー（X）の前駆体である中間体を、適切な条件下で薬物（Z）と反応させる。ある特定の実施形態において、反応基が、薬物及び／または中間体に使用される。薬物と中間体との間の反応の産物、または誘導された薬物を、次いで、適切な条件下で抗体分子と反応させる。

【0189】

免疫複合体は、当業者に周知の手法、例えば、カラムクロマトグラフィー（例えば、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性相互作用クロマトグラフィー）、透析、透析濾過、または沈降を用いることによって、反応物質から精製され得る。免疫複合体は、当業者に周知の手法、例えば、SDS-PAGE、質量分析、またはキャピラリー電気泳動を用いることによって、評価され得る。

10

【0190】

いくつかの実施形態において、リンカーは、細胞内環境（例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラ（caveola）内）に存在する切断剤によって切断可能である。

【0191】

さらに他の特定の実施形態において、リンカーは、マロン酸リンカー（Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93）、マレイミドベンゾイルリンカー（Lau et al., 1995, Bioorg Med Chem. 3(10):1299-1304）、または3'-N-アミド類似体（Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12）である。

20

【0192】

本組成物及び方法とともに使用することができる種々の例示的なリンカーは、国際公開第WO2004-010957号、米国公開第20060074008号、米国公開第20050238649号、及び米国公開第20060024317号に記載される（これらのそれぞれは、参照によりその全体として、かつあらゆる目的で、本明細書に組み込まれる）。

【0193】

抗体分子を治療剤または標識に結合させるために使用することができるリンカーの例としては、例えば、マレイミドカプロイル（mc）；マレイミドカプロイル-p-アミノベンジルカルバメート；マレイミドカプロイル-ペプチド-アミノベンジルカルバメートリンカー、例えば、マレイミドカプロイル-L-フェニルアラニン-L-リジン-p-アミノベンジルカルバメート及びマレイミドカプロイル-L-バリン-L-シトルリン-p-アミノベンジルカルバメート（vc）；N-スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）ペンタノエートもしくはSPPとしても知られる）；4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-2-メチル-2-（2-ピリジルジチオ）-トルエン（SMPT）；N-スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）；N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルジチオ）ブチレート（SPDB）；2-イミノチオラン；S-アセチルコハク酸無水物；ジスルフィドベンジルカルバメート；炭酸塩；ヒドラゾンリンカー；N-（ α -マレイミドアセトキシ）スクシンイミドエステル；N-[4-（p-アジドサリチルアミド）ブチル]-3'-（2'-ピリジルジチオ）プロピオンアミド（AMAS）；N-[β -マレイミドプロピルオキシ]スクシンイミドエステル（BMPS）；[N- ϵ -マレイミドカプロイルオキシ]スクシンイミドエステル（EMCS）；N-[γ -マレイミドブチルオキシ]スクシンイミドエステル（GMB S）；スクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシ-[6-アミドカプロエート]（LC-SMCC）；スクシンイミジル6-（3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド）ヘキサノエート（LC-SPDP）；m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）；N-スクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベ

30

40

50

ンゾエート (S I A B) ; スクシンイミジル 4 - [N - マレイミドメチル] シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C) ; N - スクシンイミジル 3 - [2 - ピリジルジチオ] - プロピオンアミド (S P D P) ; [N - ε - マレイミドカプロイルオキシ] スルホスクシンイミドエステル (スルホ - E M C S) ; N - [γ - マレイミドブチリルオキシ] スルホスクシンイミドエスエル (スルホ - G M B S) ; 4 - スルホスクシンイミジル - 6 - メチル - α - (2 - ピリジルジチオ) トルアミド] ヘキサノエート (スルホ - L C - S M P T) ; スルホスクシンイミジル 6 - (3' - [2 - ピリジルジチオ] - プロピオンアミド) ヘキサノエート (スルホ - L C - S P D P) ; m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ - M B S) ; N - スルホスクシンイミジル [4 - ヨードアセチル] アミノベンゾエート (スルホ - S I A B) ; スルホスクシンイミジル 4 - [N - マレイミドメチル] シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - S M C C) ; スルホスクシンイミジル 4 - [p - マレイミドフェニル] ブチレート (スルホ - S M P B) ; エチレングリコール - ビス (コハク酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) (E G S) ; 酒石酸ジスクシンイミジル (D S T) ; 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロデカン - 1, 4, 7, 10 - 四酢酸 (D O T A) ; ジエチレントリアミン - 五酢酸 (D T P A) ; ならびにチオ尿素リンカーが挙げられる。

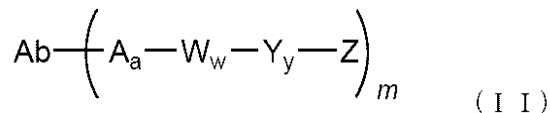
10

【0194】

いくつかの実施形態において、リンカー - X - は、式 - A_a - W_w - Y_y - を有し、式 (I) の免疫複合体は、式 (I I) によって特徴付けられ、

【化10】

20



式中、

A b は、本明細書に記載される抗 G C C 抗体分子であり、

- A - は、ストレッチャー単位であり、

a は、0 または 1 であり、

各 - W - は、独立して、アミノ酸単位であり、

w は、0 ~ 12 の範囲の整数であり、

30

- Y - は、自壊性スペーサー単位であり、

y は、0、1、または 2 であり、

Z は、治療剤または標識であり、

m は、約 1 ~ 約 15 の範囲に及ぶ。

【0195】

ストレッチャー単位 (A) が存在する場合、それは、A b 単位を、存在する場合はアミノ酸単位 (-W-) に、存在する場合はスペーサー単位 (-Y-) に、または治療剤もしくは標識 (Z) に、連結させることができる。Useful functional groups that can be present on an 天然または化学操作によってのいずれかで抗 G C C 抗体分子上に存在し得る有用な官能基には、スルフヒドリル基、アミノ基、ヒドロキシル基、炭水化物の芳香族ヒドロキシル基、及びカルボキシル基が挙げられるがこれらに限定されない。好適な官能基は、スルフヒドリル基及びアミノ基である。一実施例において、スルフヒドリル基は、抗 G C C 抗体分子の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成され得る。別の実施形態において、スルフヒドリル基は、抗 G C C 抗体分子のリジン部分のアミノ基を 2 - イミノチオラン (トラウト試薬 (T r a u t ' s reagent)) または他のスルフヒドリル生成試薬と反応させることによって生成され得る。ある特定の実施形態において、抗 G C C 抗体分子は、組み換え抗体であり、1 つ以上のリジンを担持するように操作される。ある特定の他の実施形態において、組み換え抗 G C C 抗体分子は、さらなるスルフヒドリル基、例えば、さらなるシステインを担持するように操作される。

40

50

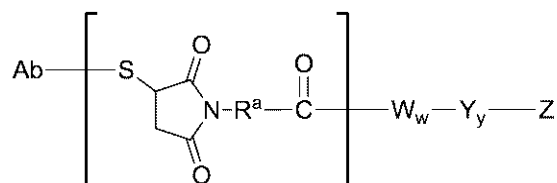
【0196】

一実施形態において、ストレッチャー単位は、A b 単位の硫黄原子との結合を形成する。硫黄原子は、A b のスルフヒドリル基から誘導され得る。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式 (I I I a) 及び (I I I b) の角括弧内に示され、式中、A b -、-W-、-Y-、-Z、w、及び y は、上に定義される通りであり、R^a は、-C₁-C₁₀ アルキレン、-C₂-C₁₀ アルケニレン、-C₂-C₁₀ アルキニレン、-カルボシクロ、-O- (C₁-C₈ アルキレン)-、O- (C₂-C₈ アルケニレン)-、-O- (C₂-C₈ アルキニレン)-、-アリーレン、-C₁-C₁₀ アルキレン-アリーレン、-C₂-C₁₀ アルケニレン-アリーレン、-C₂-C₁₀ アルキニレン-アリーレン、-アリーレン-C₁-C₁₀ アルキレン、-アリーレン-C₂-C₁₀ アルケニレン、-アリーレン-C₂-C₁₀ アルキニレン、-C₁-C₁₀ アルキレン- (カルボシクロ)-、-C₂-C₁₀ アルキレン- (カルボシクロ)-、-C₂-C₁₀ アルキニレン- (カルボシクロ)-、- (カルボシクロ)-C₁-C₁₀ アルキレン、- (カルボシクロ)-C₂-C₁₀ アルキレン、- (カルボシクロ)-C₂-C₁₀ アルキニレン、ヘテロシクロ、-C₁-C₁₀ アルキレン- (ヘテロシクロ)-、-C₂-C₁₀ アルケニレン- (ヘテロシクロ)-、-C₂-C₁₀ アルキニレン- (ヘテロシクロ)-、- (ヘテロシクロ)-C₁-C₁₀ アルキレン、- (ヘテロシクロ)-C₂-C₁₀ アルケニレン、- (ヘテロシクロ)-C₂-C₁₀ アルキニレン、- (CH₂CH₂O)_r-、または- (CH₂CH₂O)_r-CH₂-から選択され、r は、1~10 の範囲の整数であり、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カルボシクロ、ヘテロシクロ、及びアリーレンラジカルは、単独または別の基の一部としてかに関わらず、任意に置換される。いくつかの実施形態において、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カルボシクロ、ヘテロシクロ、及びアリーレンラジカルは、単独または別の基の一部としてかに関わらず、置換されない。いくつかの実施形態において、R^a は、-C₁-C₁₀ アルキレン、-カルボシクロ、-O- (C₁-C₈ アルキレン)-、-アリーレン、-C₁-C₁₀ アルキレン-アリーレン、-アリーレン-C₁-C₁₀ アルキレン、-C₁-C₁₀ アルキレン- (カルボシクロ)-、- (カルボシクロ)-C₁-C₁₀ アルキレン、-C₃-C₈ ヘテロシクロ、-C₁-C₁₀ アルキレン- (ヘテロシクロ)-、- (ヘテロシクロ)-C₁-C₁₀ アルキレン、- (CH₂CH₂O)_r-、及び- (CH₂CH₂O)_r-CH₂-から選択され、r は、1~10 の範囲の整数であり、該アルキレン基は、置換されず、残りの基は任意に置換される。

【0197】

明示的に示されていない場合ですら、1~15 個の薬物部分が A b に連結され得る (m = 1~15) ことが、すべての例示的な実施形態から理解される。

【化 11】

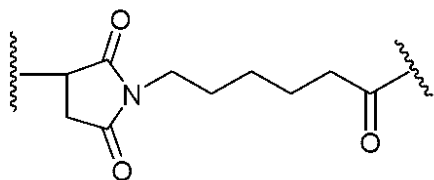


(I I I a)

【0198】

例示的なストレッチャー単位は、式 (I I I a) のものであり、式中、R^a は、-(CH₂)₅-である。

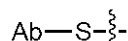
【化 1 2】



【0 1 9 9】

本出願全体を通じて、以下の式の S 部分は、文脈により別途示されない限り、A b 単位の硫黄原子を指すことに留意されたい。

【化 1 3】



【0 2 0 0】

アミノ酸単位（-W-）が存在する場合、それは、スペーサー単位が存在する場合はスペーサー単位とストレッチャー単位とを連結させ、スペーサー単位が不在の場合は薬物部分とストレッチャー単位とを連結させ、ストレッチャー単位及びスペーサー単位が不在の場合は治療剤または標識部分と A b 単位とを連結させる。

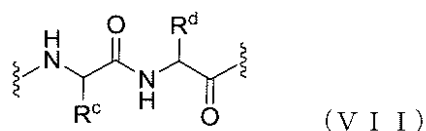
【0 2 0 1】

W_w は、例えば、モノペプチド、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド、またはドデカペプチド単位であり得る。

【0 2 0 2】

ある特定の実施形態において、アミノ酸単位は、天然のアミノ酸を含み得る。他の実施形態において、アミノ酸単位は、非天然のアミノ酸を含み得る。例証的な W_w 単位は、式（V I I）によって表され、

【化 1 4】



式中、R^c 及び R^d は以下の通りである。

【表 a】

R ^c	R ^d
ベンジル	(CH ₂) ₄ NH ₂
メチル	(CH ₂) ₄ NH ₂
イソプロピル	(CH ₂) ₄ NH ₂
イソプロピル	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂
ベンジル	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂
イソブチル	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂
sec-ブチル	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂
	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂
ベンジル	メチル
ベンジル	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂

【0 2 0 3】

アミノ酸単位の一態様において、アミノ酸単位は、バリンーシトルリン（v c または v a l - c i t）である。別の態様において、アミノ酸単位は、フェニルアラニンーリジン

(すなわち、f k)である。アミノ酸単位のさらに別の態様において、アミノ酸単位は、N-メチルバリン-シトルリンである。さらに別の態様において、アミノ酸単位は、5-アミノ吉草酸、ホモフェニルアラニンリジン、テトライソキノリンカルボン酸リジン、シクロヘキシルアラニンリジン、イソニペコチン酸 (isonipicotinic acid) リジン、 β -アラニンリジン、グリシンセリンバリングルタミン、及びイソニペコチン酸である。

【0204】

スペーサー単位 (—Y—) が存在する場合、それは、アミノ酸単位が存在する場合はアミノ酸単位と治療剤または標識部分 (—Z—) とを連結させる。あるいは、スペーサー単位は、アミノ酸単位が不在の場合はストレッチャー単位と治療剤または標識部分とを連結させる。スペーサー単位はまた、アミノ酸単位及びストレッチャー単位の両方が不在の場合には治療剤または標識部分とAb単位とを連結させる。

10

【0205】

非自壊性または自壊性の2つの一般的な種類のスペーサー単位がある。非自壊性スペーサー単位は、スペーサー単位の一部またはすべてが、抗体-薬物複合体からのアミノ酸単位の切断、特に酵素切断の後に、治療剤または標識部分に結合したままであるものである。非自壊性スペーサー単位の例には、(グリシン-グリシン) スペーサー単位及びグリシンスペーサー単位 (いずれもスキーム1に示される) (下記) が挙げられるがこれらに限定されない。グリシン-グリシンスペーサー単位またはグリシンスペーサー単位を含有する複合体が、酵素 (例えば、腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ、またはリンパ球関連プロテアーゼ) による酵素切断を受けると、グリシン-グリシン-Z部分またはグリシン-Z部分は、Ab-Aa-Ww-から切断される。

20

【0206】

あるいは、自壊性スペーサー単位を含有する複合体は、—Zを放出し得る。本明細書に使用されるとき、「自壊性スペーサー」という用語は、2つの化学的部分と一緒に共有結合して安定な三部構成の分子にすることができる、二官能性化学部分を指す。それは、第1の部分への結合が切断されると第2の化学部分から自発的に分離する。

【0207】

いくつかの実施形態において、—Y_y—は、p-アミノベンジルアルコール (PAB) 単位 (スキーム2及び3を参照されたい) であり、そのフェニレン部分は、Q_nで置換され、Qは、—C₁—C₈アルキル、—C₂—C₈アルケニル、—C₂—C₈アルキニル、—O—(C₁—C₈アルキル)、—O—(C₂—C₈アルケニル)、—O—(C₂—C₈アルキニル1)、—ハロゲン、—ニトロ、または—シアノであり、nは、0~4の範囲の整数である。アルキル基、アルケニル基、及びアルキニル基は、単独または別の基の一部としてかに関わらず、任意に置換され得る。

30

【0208】

いくつかの実施形態において、—Y—は、PAB基のアミノ窒素原子によって—W_w—に連結され、炭酸基、カルバミン酸基、またはエーテル基によって—Zに直接接続された、PAB基である。

【0209】

自壊性スペーサーの他の例としては、PAB基に電氣的に類似である芳香族化合物、例えば、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体 (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237) 及びオルトもしくはパラ-アミノベンジルアセタールが挙げられるがこれらに限定されない。アミド結合加水分解の際に環化を受けるスペーサー、例えば、置換または非置換4-アミノ酪酸アミド (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2: 223)、適切に置換されたビスクロ [2. 2. 1] 及びビスクロ [2. 2. 2] 環系 (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815)、ならびに2-アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsherry et al., 1990, J. Org. Chem. 55: 5867) が使用され得る。グリシンの

40

50

α 位で置換されるアミン含有薬物の排除 (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447) もまた、自壊性スペーサーの例である。

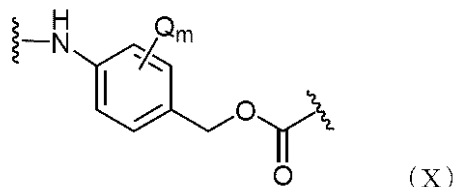
【0210】

いくつかの実施形態において、 $-Z$ 部分は、同じである。さらに別の実施形態において、 $-Z$ 部分は、異なる。

【0211】

一態様において、スペーサー単位 ($-Y_y-$) は、式 (X) によって表され、

【化15】



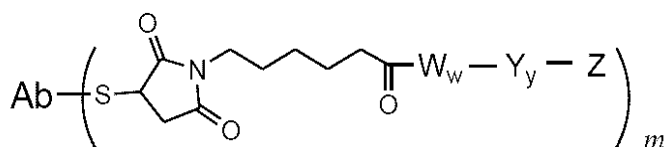
10

式中、Q は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_8$ アルキニル)、 $-H$ 、 $-NO_2$ 、または $-CN$ であり、m は、0~4 の範囲の整数である。アルキル基、アルケニル基、及びアルキニル基は、単独または別の基の一部としてかに関わらず、任意に置換される。

【0212】

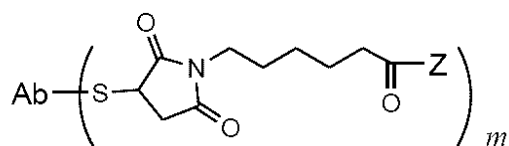
選択された実施形態の群において、式 (I) 及び (II) の複合体は、

【化16】



式中、w 及び y は、それぞれ 0、1、または 2 であり、

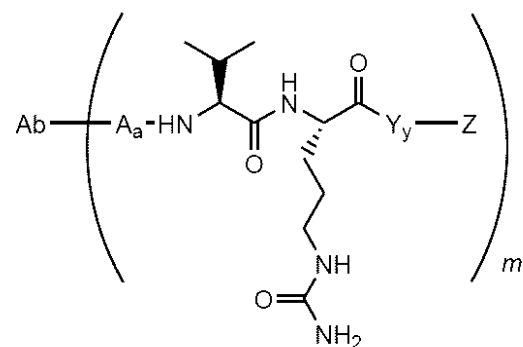
【化17】



30

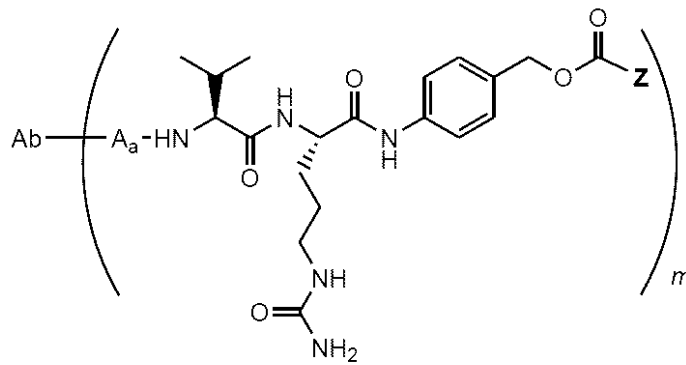
w 及び y は、それぞれ 0 であり、

【化18-1】

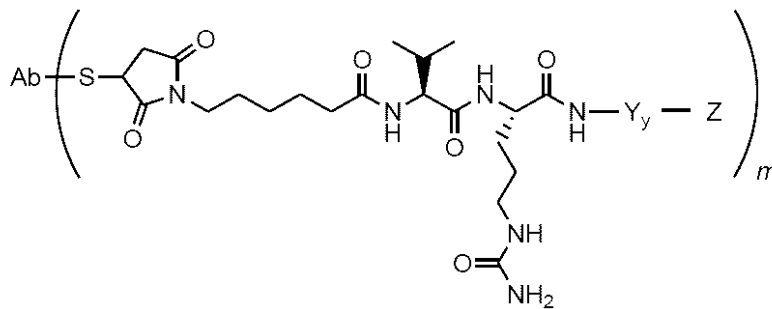


40

【化 18-2】

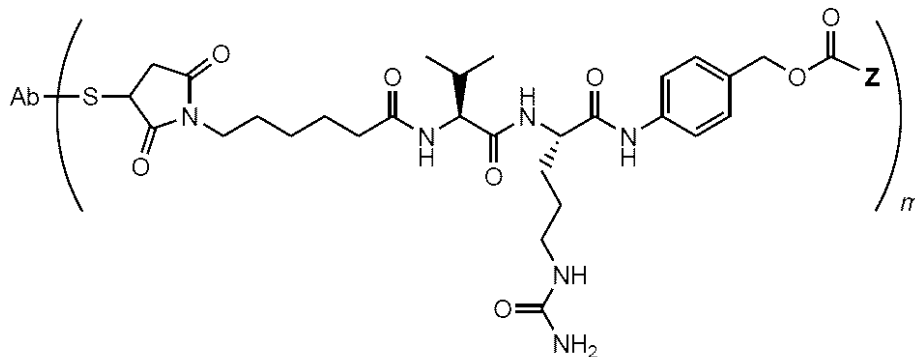


10



20

、及び



30

であり、

A_a 、 W_w 、 Y_y 、 Z 、及び Ab は、上記に提供される意味を有する。

【0213】

式 (I) の変数 Z は、治療剤または標識である。治療剤は、所望される生物学的効果を発揮することができる任意の薬剤であり得る。いくつかの実施形態において、治療剤は、第2の治療様式、例えば、化学療法剤、放射線治療、免疫療法に対して、細胞を感受性にする。

【0214】

いくつかの実施形態において、治療剤は、細胞増殖抑制剤または細胞毒剤である。例としては、抗代謝剤（例えば、フルオロウラシル（5-FU）、フロクスウリジン（5-FUdR）、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン（6-TG）、メルカプトプリン（6-MP）、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン（2-CD A）、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、またはペメトレキセド）；アルキル化剤（例えば、cメルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、チオテパ、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、マイトマイシンC、シクロホスファミド、メクロレタミン、ウラムスチン、ジブロモマンニトール、四硝酸塩、プロカルバジン、アルトレタミン、ミトゾロミド、またはテモゾロミド）；アルキル化様剤（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、ネ

40

50

ダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、またはトリプラチン) ; DNA 副溝アルキル化剤 (例えば、デュオカルマイシン、例えば、CC-1065、及びそれら任意の類似体または誘導体 ; ピロロベンゾジアゼペン、またはその任意の類似体もしくは誘導体) ; アントラサイクリン (例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、またはバルルビシン) ; 抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン、ストレプトゾトシン、グラミシジンD、マイトマイシン (例えば、マイトマイシンC) ; カリケアマイシン ; 抗有糸分裂剤 (例えば、マイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、クリプトフィシン、ビンカアルカロイド (例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン)、タキサン (例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、または新規なタキサン (例えば、2001年5月31日に公開された国際特許公開第WO01/38318号を参照されたい))、チューブリシン (tubulysin)、及びコルヒチンを含む ; トポイソメラーゼ阻害剤 (例えば、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン、エトポシド、テニポシド、アムサクリン、またはミトキサントロン) ; ならびにプロテアソーム阻害剤 (例えば、ペプチジルボロン酸) が挙げられるがこれらに限定されない。種々の治療剤を抗GCC抗体に複合体化することについてのさらなる情報は、国際出願第WO2011/050242号に見出され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

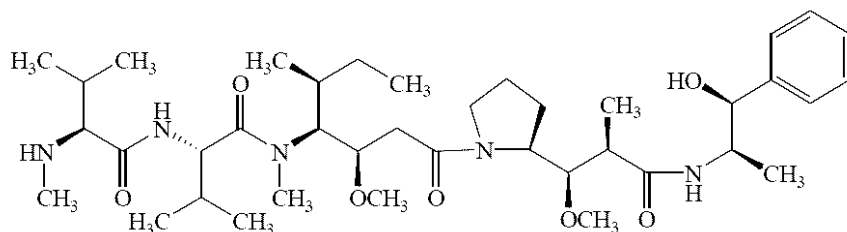
【0215】

ドラスタチン及びオーリスタチン免疫複合体

いくつかの他の実施形態において、治療剤は、ドラスタチンである。いくつかの実施形態において、治療剤は、オーリスタチン、例えば、オーリスタチンE (当該技術分野でドラスタチン-10の誘導体としても知られる) またはその誘導体である。いくつかの実施形態において、治療剤は、式(XIII)~(XVIII)の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩形態から選択される。

20

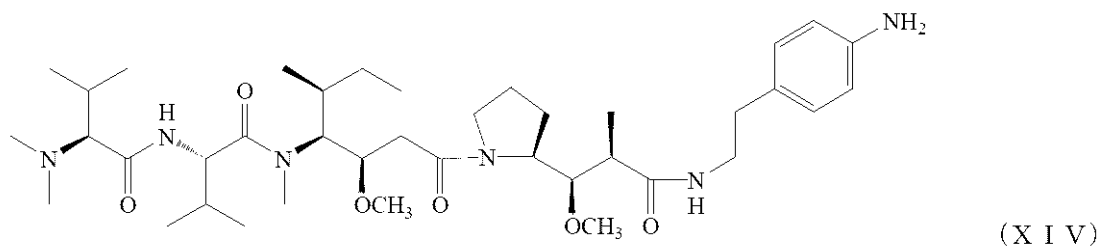
【化19-1】



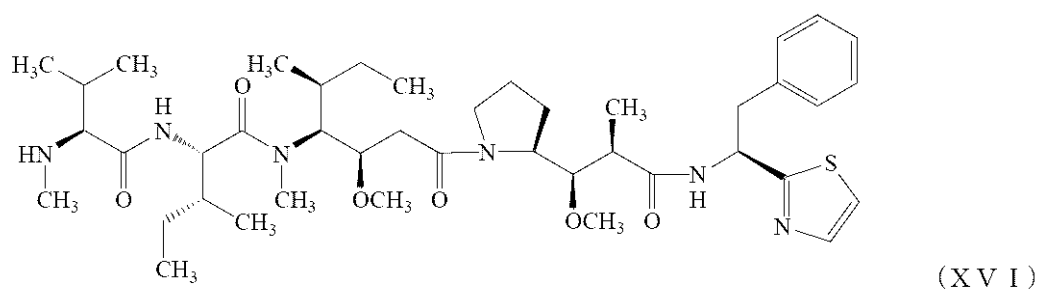
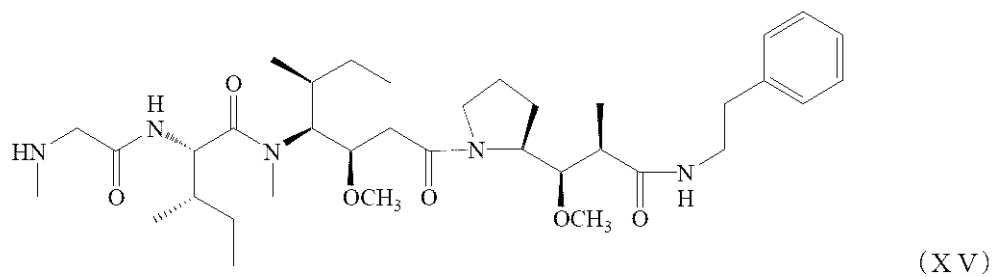
(XIII)

30

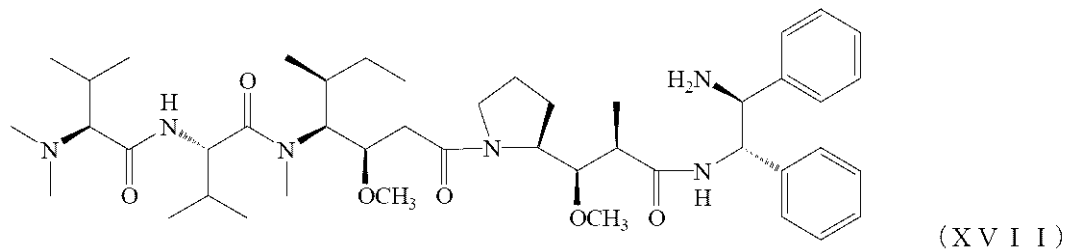
【化 19 - 2】



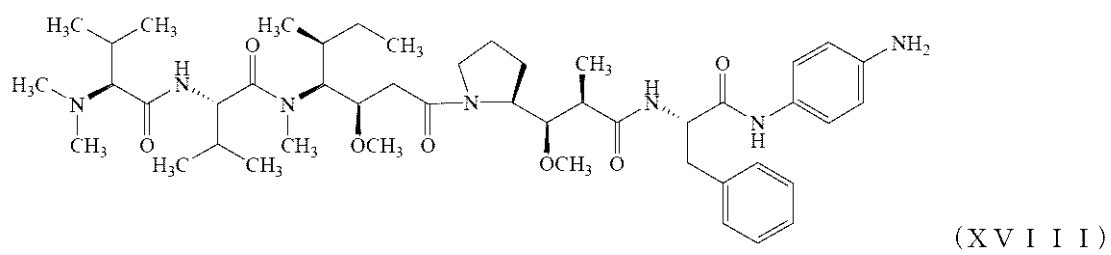
10



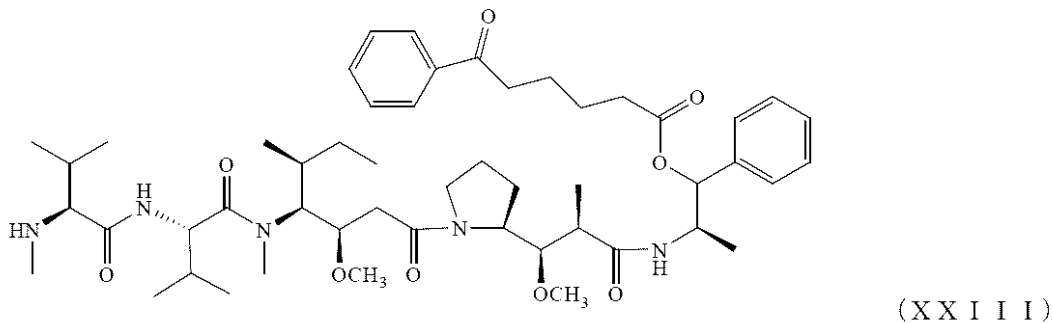
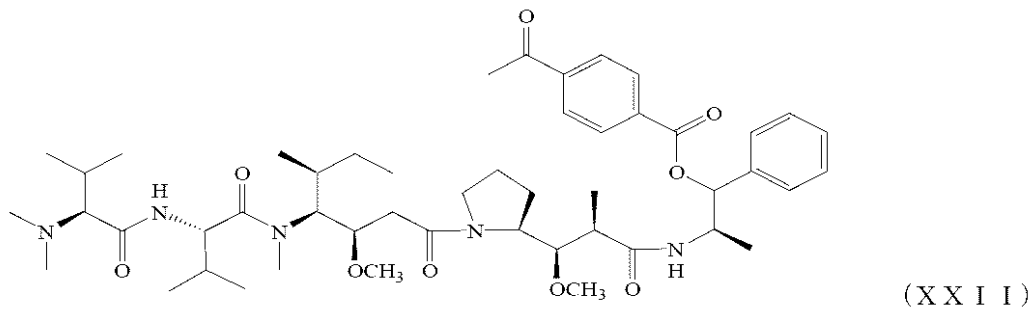
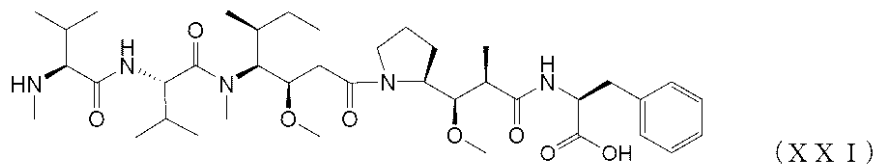
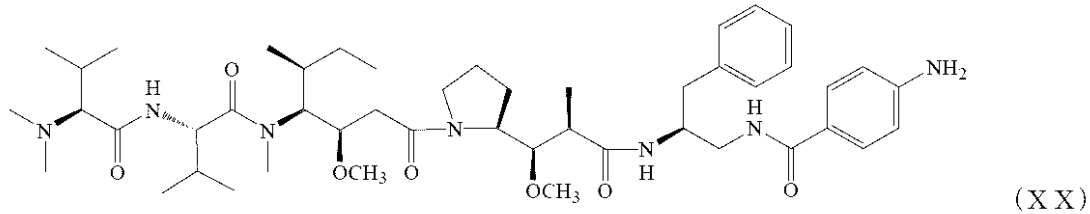
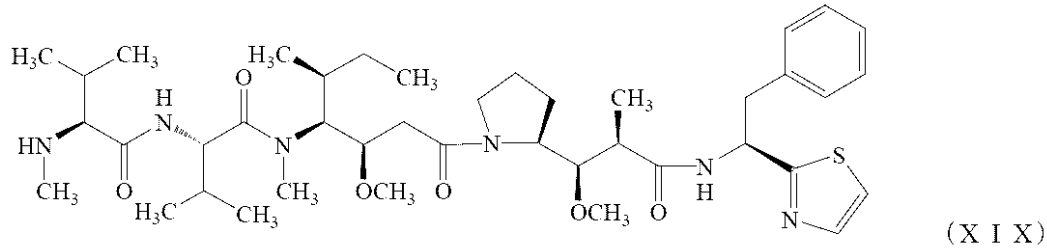
20



30



【化 19-3】



【0216】

オーリスタチン化合物及びそれらを抗体に複合体化するための方法は、例えば、Dor
onina et al., Nature Biotech., 21:778-784 (40
2003)、Hamblett et al., Clin. Cancer Res., 10
:7063-7070 (2004)、Carter and Senter, Cance
r J., 14:154-169 (2008)、米国特許第7,498,298号、同第
7,091,186号、同第6,884,869号、同第6,323,315号、同第6
,239,104号、同第6,034,065号、同第5,780,588号、同第5,
665,860号、同第5,663,149号、同第5,635,483号、同第5,5
99,902号、同第5,554,725号、同第5,530,097号、同第5,52
1,284号、同第5,504,191号、同第5,410,024号、同第5,138
,036号、同第5,076,973号、同第4,986,988号、同第4,978,
744号、同第4,879,278号、同第4,816,444号、及び同第4,486 50

、414号、米国特許公開第20090010945号、同第20060074008号、同第20080300192号、同第20050009751号、同第20050238649号、及び同第20030083236号、ならびに国際公開第W004/010957号及び同第W002/088172号に記載され、これらのそれぞれは、参照によりその全体として、かつあらゆる目的で、本明細書に組み込まれる。

【0217】

オーリスタチンは、例えば、オーリスタチンEとケト酸との間で形成されるエステルであり得る。例えば、オーリスタチンEは、パラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応して、それぞれ、AEB及びAEVBを産生し得る。他の典型的なオーリスタチンには、オーリスタチンフェニルアラニンフェニレンジアミン(AFP、(XVII))、モノメチルオーリスタチンE(MMAE、(XII))、及びモノメチルオーリスタチンF(MMAF、(XXI))が挙げられる。

10

【0218】

オーリスタチンは、微小管動態、ならびに核及び細胞の分裂を遮断し、抗癌活性を有することが示されている。本発明で使用するためのオーリスタチンは、チューブリンに結合し、GCC発現細胞系に対して細胞毒性または細胞増殖抑制性の効果を発揮し得る。化合物がチューブリンに結合するかどうかを判定するための方法は、当該技術分野で既知である。例えば、Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397、Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47:965-976、及びHamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149を参照されたい。本発明の目的で、化合物のチューブリンに対する相対的親和性を判定してもよい。本発明のいくつかの好ましいオーリスタチンは、MMAEのチューブリンに対する結合親和性よりも10倍低い(弱い親和性)から、MMAEのチューブリンに対する結合親和性よりも10倍、20倍、さらには100倍高い(高い親和性)までの範囲の親和性で、チューブリンに結合する。

20

【0219】

オーリスタチンまたは結果として得られる免疫複合体が、所望の細胞系に対して細胞増殖抑制性または細胞毒性の効果を発揮するかどうかを判定するために使用され得る、当該技術分野で既知の多数の異なるアッセイが存在する。例えば、免疫複合体の細胞毒性活性または細胞増殖抑制活性は、免疫複合体の標的タンパク質を発現する哺乳動物細胞培養培地に曝露し、約6時間～約5日間の期間、細胞を培養し、細胞生存率を測定することによって、測定され得る。細胞に基づくインビトロアッセイを使用して、免疫複合体の生存率(増殖)、細胞毒性、及びアポトーシスの誘発(カスパーゼ活性)を測定することができる。

30

【0220】

免疫複合体が細胞増殖抑制効果を発揮するかどうかを判定するために、チミジン組み込みアッセイが使用され得る。例えば、播種した96ウェルの1ウェル当たり5,000細胞の密度で標的抗原を発現する癌細胞を、72時間の期間培養し、72時間の期間の最後の8時間の間、0.5 μ Ciの³H-チミジンに曝露してもよい。培養細胞への³H-チミジンの組み込みを、免疫複合体の存在下及び不在下で測定する。

40

【0221】

細胞毒性を判定するために、壊死またはアポトーシス(プログラム細胞死)が測定され得る。壊死は、典型的に、形質膜の透過性の増加、細胞の膨潤、及び形質膜の破裂を伴う。アポトーシスは、典型的に、膜のブレブ形成、細胞質の凝縮、及び内在性エンドヌクレアーゼを特徴とする。癌細胞に対するこれらの効果のうちのいずれかの決定は、免疫複合体が癌の治療に有用であることを示す。

【0222】

細胞生存率は、細胞におけるニュートラルレッド、トリパンブルー、またはALAMAR(商標)ブルー等の色素の取り込みを判定することによって測定され得る(例えば、P

50

age et al., 1993, Intl. J. Oncology 3: 473-476を参照されたい)。そのようなアッセイにおいて、細胞を、色素を含有する培地中でインキュベートし、細胞を洗浄し、色素の細胞内取り込みを反映する残存色素を分光光度法で測定する。タンパク質に結合する色素であるスルホローダミンB (SRB) もまた、細胞毒性の測定に使用することができる (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107-112)。

【0223】

あるいは、テトラゾリウム塩、例えば、MTTまたはWSTが、死細胞ではなく生細胞を検出することによる哺乳動物細胞の生存及び増殖のための定量的比色分析アッセイで使用される (例えば、Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 28: 67-72 (1992)を参照されたい)。

10

【0224】

アポトーシスは、例えば、DNA断片化を測定することによって定量化することができる。DNA断片化の定量的なインビトロでの判定のための商業的測光方法が、利用可能であるTUNEL (断片化DNAにおける標識されたヌクレオチドの組み込みを検出する) 及びELISAに基づくアッセイを含む、そのようなアッセイの例は、Biochemical, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals) に記載される。

【0225】

アポトーシスは、細胞における形質学的変化を測定することによって判定することもできる。例えば、壊死と同様に、形質膜統合性の喪失は、ある特定の色素 (例えば、例として、アクリジンオレンジまたは臭化エチジウム等の蛍光色素) の取り込みを測定することによって判定され得る。アポトーシス細胞数を測定するための方法は、Duke and Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16) に記載されている。細胞はまた、DNA色素 (例えば、アクリジンオレンジ、臭化エチジウム、またはヨウ化プロピジウム) で標識してもよく、この細胞を、クロマチン凝縮及び核内膜に沿った移動について観察する。アポトーシスを判定するために測定され得る他の形質学的変化には、例えば、細胞質凝縮、膜ブレブ形成の増加、及び細胞収縮が挙げられる。

20

30

【0226】

アポトーシス細胞の存在は、培養物の付着画分及び「浮遊」画分の両方において測定され得る。例えば、いずれの画分も、上清を除去し、付着細胞をトリプシン化し、調製物を合わせた後に遠心分離洗浄ステップ (例えば、2000 rpmで10分間) を行い、アポトーシスを検出する (例えば、DNA断片化を測定することによって) ことによって、収集することができる。 (例えば、Piazza et al., 1995, Cancer Research 55: 3110-16を参照されたい)。

【0227】

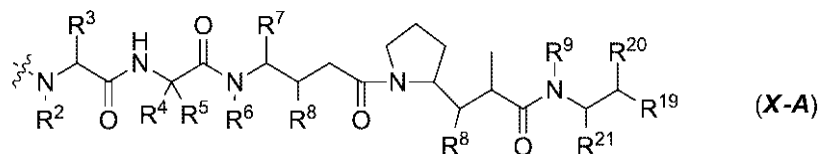
免疫複合体の効果は、動物モデルにおいて試験または検証され得る。多数の確立された癌動物モデルが当業者に既知であり、それらのうちのいずれかを使用して、免疫複合体の有効性をアッセイすることができる。そのようなモデルの非限定的な例は、以下に記載される。さらに、免疫複合体のインビボでの有効性を試験するための小動物モデルは、ヒト腫瘍細胞系を適切な免疫不全齧歯類株、例えば、無胸腺ヌードマウスまたはSCIDマウスに埋め込むことによって作製され得る。

40

【0228】

いくつかの実施形態において、式 (I) の変数-Zは、式 (X-A) または式 (X-B) のオーリスタチン部分であり、

【化 20】



式中、各位置で独立して、

波線は、結合を表し、

R^2 は、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、または $-C_2-C_{20}$ アルキニルであり、

10

R^3 は、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（炭素環）、 $-アリール$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（アリール）、 $-複素環$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（複素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（複素環）、または $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（複素環）であり、

R^4 は、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（炭素環）、 $-アリール$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（アリール）、 $-複素環$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（複素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（複素環）、もしくは $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（複素環）であり、

20

R^5 は、 $-H$ もしくは $-C_1-C_8$ アルキルであるか、

または R^4 及び R^5 は、一緒に炭素環式環を形成し、式 $-(CR^aR^b)_s-$ を有し、式中、 R^a 及び R^b は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、もしくは $-炭素環$ であり、 s は、2、3、4、5、もしくは 6 であり、

R^6 は、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、または $-C_2-C_{20}$ アルキニルであり、

R^7 は、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、 $-炭素環$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（炭素環）、 $-アリール$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（アリール）、 $-複素環$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（複素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（複素環）、または $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（複素環）であり、

30

各 R^8 は、独立して、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、 $-O-(C_1-C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_1-C_{20}$ アルキニル)、または $-炭素環$ であり、

R^6 は、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、または $-C_2-C_{20}$ アルキニルであり、

40

R^{19} は、 $-アリール$ 、 $-複素環$ 、または $-炭素環$ であり、

R^{20} は、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、 $-炭素環$ 、 $-O-(C_1-C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_2-C_{20}$ アルキニル)、または OR^{18} であり、式中、 R^{18} は、 $-H$ 、ヒドロシル保護基、または OR^{18} が $=O$ を表す場合は直接結合であり、

R^{21} は、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2-C_{20}$ アルキニル、 $-アリール$ 、 $-複素環$ 、または $-炭素環$ である。

【0229】

式 (X-A) のオーリスタチンは、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニクレン (alkynyklene)、アリール、炭素環、及び

50

複素環ラジカルが置換されていないものを含む。

【0230】

式(X-A)のオーリスタチンには、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、及び R^9 の基が、非置換であり、 R^{19} 、 R^{20} 、及び R^{21} の基が、本明細書に記載されるように任意に置換されるものが含まれる。

【0231】

式(X-A)のオーリスタチンには、

R^2 が $-C_1-C_8$ アルキルであり、

R^3 、 R^4 、及び R^7 が、独立して、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、単環式 C_3-C_6 炭素環、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（単環式 C_3-C_6 炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（単環式 C_3-C_6 炭素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（単環式 C_3-C_6 炭素環）、 $-C_6-C_1$ アリール、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（ C_6-C_{10} アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（ C_6-C_{10} アリール）、 $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（ C_6-C_{10} アリール）、複素環、 $-C_1-C_{20}$ アルキレン（複素環）、 $-C_2-C_{20}$ アルケニレン（複素環）、または $-C_2-C_{20}$ アルキニレン（複素環）から選択され、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、炭素環、アリール、及び複素環ラジカルが、任意に置換され、

R^5 が一水素であり、

R^6 が $-C_1-C_8$ アルキルであり、

各 R^8 が、独立して、 $-OH$ 、 $-O-(C_1-C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2-C_{20}$ アルケニル)、または $-O-(C_2-C_{20}$ アルキニル)から選択され、該アルキル、アルケニル、及びアルキニルラジカルが、任意に置換され、

R^9 が、一水素または $-C_1-C_8$ アルキルであり、

R^{19} が任意に置換されたフェニルであり、

R^{20} が OR^{18} であり、式中、 R^{18} は、 H 、ヒドロキシル保護基、または OR^{18} が $=O$ を表す場合には直接結合であり、

R^{21} が、 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ アルキル、 $-C_2-C_{20}$ アルケニル、 $-C_2-C_{20}$ アルキニル、または炭素環であり、該アルキル、アルケニル、アルキニル、及び炭素環ラジカルが、任意に置換されるもの、あるいはその薬学的に許容される塩形態が含まれる。

【0232】

式(X-A)のオーリスタチンには、

R^2 がメチルであり、

R^3 が、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、または $-C_2-C_8$ アルキニルであり、該アルキル、アルケニル、及びアルキニルラジカルが任意に置換され、

R^4 が、 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、 $-C_2-C_8$ アルキニル、単環式 C_3-C_6 炭素環、 $-C_6-C_{10}$ アリール、 $-C_1-C_8$ アルキレン（ C_6-C_{10} アリール）、 $-C_2-C_8$ アルケニレン（ C_6-C_{10} アリール）、 $-C_2-C_8$ アルキニレン（ C_6-C_{10} アリール）、 $-C_1-C_8$ アルキレン（単環式 C_3-C_6 炭素環）、 $-C_2-C_8$ アルケニレン（単環式 C_3-C_6 炭素環）、 $-C_2-C_8$ アルキニレン（単環式 C_3-C_6 炭素環）であり、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、及び炭素環ラジカルが、単独または別の基の一部としてかに関わらず、任意に置換され、

R^5 が H であり、 R^6 がメチルであり、

R^7 が、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-C_2-C_8$ アルケニル、または $-C_2-C_8$ アルキニルであり、

各 R^8 がメトキシであり、

R^9 が、一水素または $-C_1-C_8$ アルキルであり、

R^{19} がフェニルであり、

R^{20} が、 OR^{18} であり、式中、 R^{18} は、 $-H$ 、ヒドロキシル保護基、または OR^{18} が $=O$ を表す場合には直接結合であり、

R^{21} がメチルであるもの、あるいはその薬学的に許容される塩形態が含まれる。

【0233】

式 (X-A) のオーリスタチンには、 R^2 がメチルであり、 R^3 が H または C_1-C_3 アルキルであり、 R^4 が C_1-C_5 アルキルであり、 R^5 が H であり、 R^6 がメチルであり、 R^7 がイソプロピルまたは *sec*-ブチルであり、 R^8 がメトキシであり、 R^9 が水素または C_1-C_8 アルキルであり、 R^{19} がフェニルであり、 R^{20} が OR^{18} であり、式中、 R^{18} が、 H 、ヒドロキシル保護基、または OR^{18} が $=O$ を表す場合には直接結合であり、 R^{21} がメチルであるもの、あるいはその薬学的に許容される塩形態が含まれる。

10

【0234】

式 (X-A) のオーリスタチンには、 R^2 がメチルまたは C_1-C_3 であり、 R^3 が H または C_1-C_3 アルキルであり、 R^4 が C_1-C_5 アルキルであり、 R^5 が H であり、 R^6 が C_1-C_3 アルキルであり、 R^7 が C_1-C_5 アルキルであり、 R^8 が C_1-C_3 アルコキシであり、 R^9 が水素または C_1-C_8 アルキルであり、 R^{19} がフェニルであり、 R^{20} が OR^{18} であり、式中、 R^{18} は、 H 、ヒドロキシル保護基、または OR^{18} が $=O$ を表す場合には直接結合であり、 R^{21} は C_1-C_3 アルキルであるもの、あるいはその薬学的に許容される塩形態が含まれる。

20

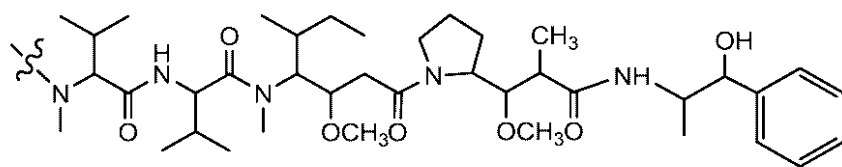
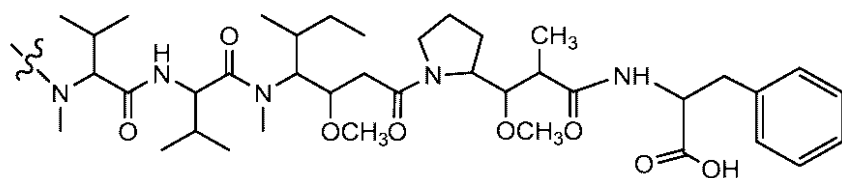
【0235】

式 (I I) の免疫複合体の好ましい実施形態において、 Z が式 (X-A) のオーリスタチン分子である場合、 w は、 $1 \sim 12$ 、好ましくは、 $2 \sim 12$ の範囲の整数であり、 y は、 1 または 2 、好ましくは 1 である。

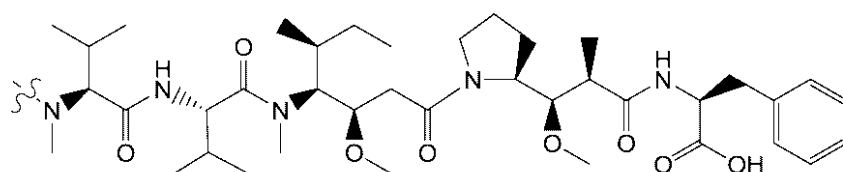
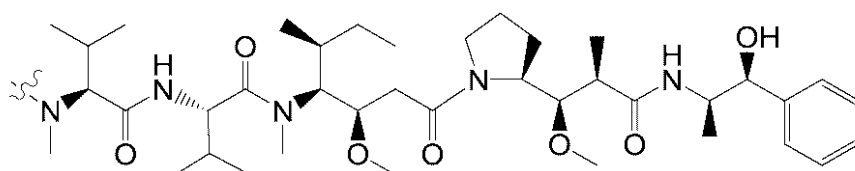
【0236】

例証的な治療剤 ($-Z$) には、以下の構造

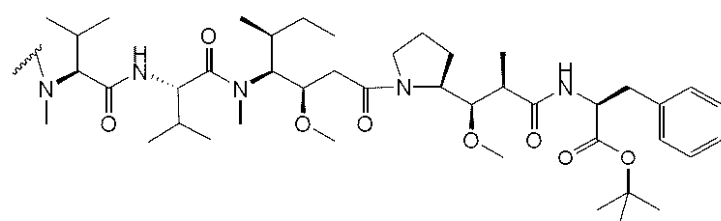
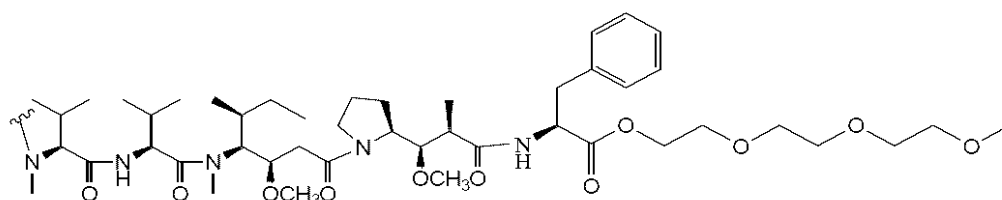
【化 2 1 - 1】



10

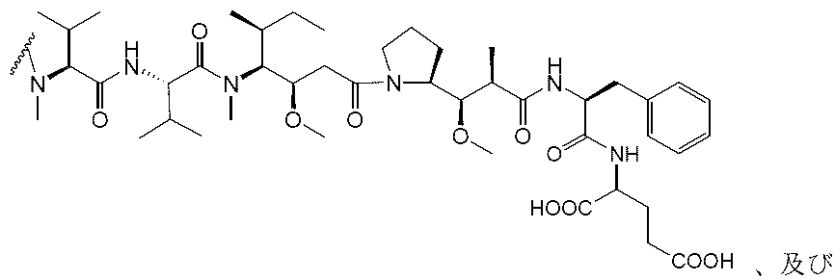


20

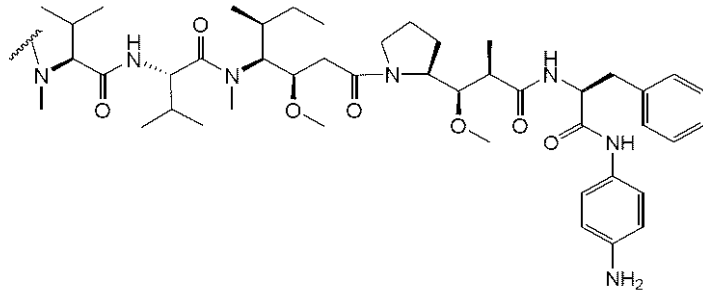


30

【化 2 1 - 3】



10



を有するものが挙げられる。

【0 2 3 7】

20

いくつかの実施形態において、治療剤は、T Z T - 1 0 2 7ではない。いくつかの実施形態において、治療剤は、オーリスタチン E、ドラスタチン 1 0、またはオーリスタチン P Eである。

【0 2 3 8】

いくつかの実施形態において、オーリスタチン分子は、マレイミド部分、例えば、マレイミドかプロイル部分を含むリンカーによって、抗体分子上のシステイン部分に連結される。

【0 2 3 9】

いくつかの他の実施形態において、オーリスタチン分子は、オーリスタチン分子上のモノメチルアミノ基に接続されたヘテロ二官能性リンカーを使用して、抗体に連結される。いくつかの実施形態において、リンカーは、切断可能部分、例えば、ペプチド部分、及び自壊性 p - アミノベンジルカルバメートスペーサーを含む。例示的なリンカーには、マレイミドカプロイル (m c)、マレイミドカプロイル - L - フェニルアラニン - L - リジン - p - アミノベンジルカルバメート、及びマレイミドカプロイル - L - バリン - L - シトルリン - p - アミノベンジルカルバメート (v c) が挙げられる。

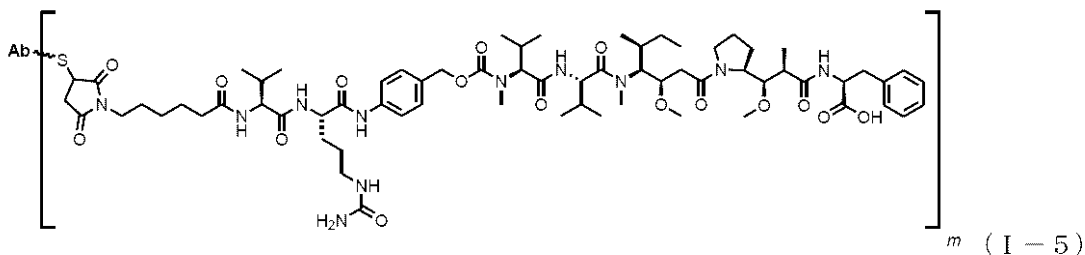
30

【0 2 4 0】

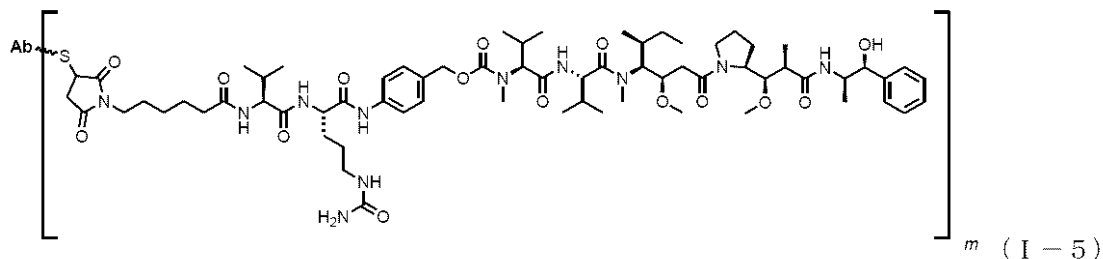
ある特定の実施形態において、式 (I) の免疫複合体は、式 A b - (v c - M M A F)_m (式 (I - 4))、A b - (v c - M M A E)_m (式 (I - 5))、A b - (m c - M M A E)_m (式 (I - 6))、または A b - (m c - M M A F)_m (式 (I - 7)) によって特徴付けられ、式中、A b は本明細書に記載される抗 G C C 抗体分子であり、S は抗体の硫黄原子であり、m は式 (I) に関して上述の値及び好ましい値を有する。ある特定の実施形態において、m は、1 ~ 約 5 の整数である。

40

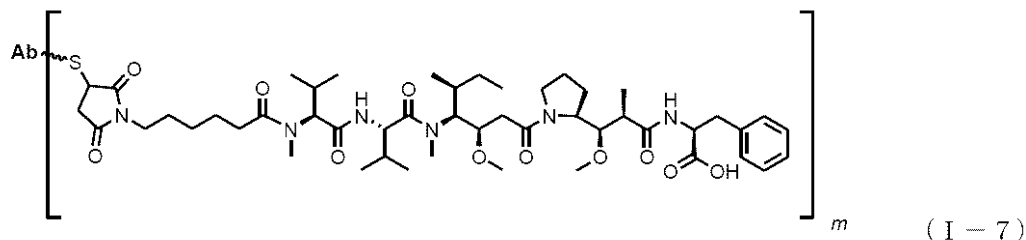
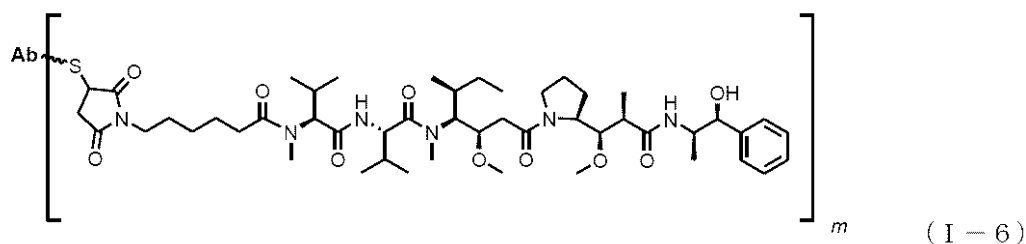
【化 2 2】



10



20



30

【0 2 4 1】

いくつかの実施形態において、式 (I-4)、(I-5)、(I-6)、または (I-7) の変数は、表 1～6 に要約される特徴を有する抗体分子である。ある特定の実施形態において、変数 A b は、5 F 9 抗体分子または A b x-2 2 9 抗体分子である。

【0 2 4 2】

いくつかの実施形態において、式 (I-4)、(I-5)、(I-6)、または (I-7) の変数 m は、約 2～約 10、約 6～約 8、または約 4～約 6 の範囲に及ぶ。

【0 2 4 3】

ある特定の具体的な実施形態において、本発明は、式 (I-4)、(I-5)、(I-6)、または (I-7) の免疫複合体であって、A b が 5 F 9 抗体分子であり、m が約 4

40

【0 2 4 4】

本明細書に開示される免疫複合体は、所与の生物学的応答を修飾するために使用され得る。治療剤は、古典的な治療剤に限定されると解釈されるものではない。例えば、治療剤は、所望の生物学的活性を有する核酸、タンパク質、またはポリペプチドであり得る。例えば、抗体分子は、遺伝子の発現を遮断し、それによって所望の生物学的作用をもたらすことができる、アンチセンス分子、s i R N A 分子、s h R N A 分子、または m i R N A 分子に複合体化され得る。

【0 2 4 5】

本明細書に記載される抗 G C C 抗体分子はまた、プロドラッグまたはプロドラッグ活性

50

化因子に複合体化されてもよい。

【0246】

薬学的組成物

別の態様において、本発明は、組成物、例えば、薬学的に許容される組成物、そのような組成物を含むキット、及びそのような組成物を使用する方法を特徴とする。組成物は、本明細書に記載されるように、薬学的に許容される担体と一緒に製剤化された抗G C C抗体分子またはその免疫複合体を含み得る。実施形態において、抗G C C抗体分子は、表1～6に要約される例示的な特性を有するものである。

【0247】

本明細書に使用されるとき、「薬学的に許容される担体」には、生理学的に適合性のありとあらゆる溶媒、分散媒、等張化剤及び吸収遅延剤等が含まれる。担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、直腸、脊髄、または表皮投与（例えば、注射もしくは注入による）に好適であり得る。薬学的組成物は、1つ以上の追加の賦形剤、例えば、塩、緩衝液、浸透圧調節剤、凍結乾燥保護剤（lyoprotectant）、非イオン性界面活性剤、界面活性剤、及び保存剤を含み得る。

【0248】

組成物は、種々の形態であり得る。これらには、例えば、液体、半固体、及び固体剤形、例えば、溶液（例えば、注射及び注入溶液）、分散液または懸濁液、リボソーム、及び坐剤が挙げられる。好ましい形態は、意図される投与様式及び治療用途に依存する。いくつかの典型的な組成物は、非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）が意図される注射または注入溶液の形態である。いくつかの実施形態において、組成物は、静脈内注入または注射によって投与される。他の実施形態において、組成物は、筋肉内または皮下注射によって投与される。

【0249】

本明細書に使用される「非経口投与」及び「非経口で投与される」という語句は、腸内及び局所投与以外の、通常は注射による投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、皮下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内の注射及び注入を含むがこれらに限定されない。

【0250】

いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、製造及び保管の条件下で、滅菌かつ安定である。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リボソーム、ミクロスフェア、または高抗体濃度に好適な他の規則構造として製剤化され得る。滅菌注射溶液は、必要とされる量の活性化化合物（例えば、抗体、抗体部分、または免疫複合体）を、必要に応じて、上に列挙された成分のうちの1つまたはそれらの組み合わせとともに適切な溶媒中に組み込んだ後、例えば濾過によって滅菌することによって調製され得る。一般に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒及び上に列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、提供される調製方法は、活性成分の粉末に加えて、任意の追加の所望される成分を、その事前に滅菌濾過した溶液から生成する、真空乾燥及び凍結乾燥である。溶液の適正な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散液の場合は必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。注射用組成物の長時間にわたる吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物中に含めることによってもたらされ得る。

【0251】

本明細書に記載される抗体分子及び免疫複合体は、当該技術分野で既知の種々の方法によって投与され得るが、多くの治療用途については、投与経路／様式は、静脈内注射または注入である。当業者には理解されるように、投与の経路及び／または様式は、所望される結果に応じて多様である。ある特定の実施形態において、活性化化合物は、埋め込み片、経皮パッチ、及びマイクロカプセル封入された送達系を含む、制御放出製剤等、化合物の急速な放出を防ぐ担体を用いて送達され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグ

リコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸といった生分解性生体適合性ポリマーが使用され得る。そのような製剤の調製のための多数の方法が、特許を得ており、一般に、当業者に既知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0252】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される抗GCC抗体分子または免疫複合体は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な食用担体を用いて経口投与され得る。化合物（及び所望される場合は他の成分）はまた、硬または軟シェルゼラチンカプセルに封入され、錠剤、パッカ錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハ等に圧縮され得る。非経口投与以外によって本明細書に記載される抗体分子または免疫複合体を投与するためには、化合物を、その不活性化を防ぐ材料でコーティングするか、化合物をそれと共に投与することが必要であり得る。

【0253】

治療組成物は、当該技術分野で既知の医療デバイスを用いて投与してもよい。例えば、薬学的調製物は、1つ以上の投薬量を含有するデバイス、例えば、気密または液密容器内に配置され得る。送達デバイスの例には、バイアル、カニューレ、ニードル、ドリップバッグ、及びラインが挙げられるがこれらに限定されない。本発明はまた、本明細書に記載される抗体分子または免疫複合体を、そのようなデバイス内に入れる方法を提供する。

【0254】

いくつかの実施形態において、本発明は、リボソーム組成物中に製剤化される、本明細書に記載される抗GCC抗体分子または免疫複合体を提供する。いくつかの実施形態において、リボソームは、抗体分子でコーティングされる。いくつかのそのような実施形態において、リボソームには治療剤が充填される。リボソーム送達により、抗体に連結していない薬剤、例えば、治療剤の送達が可能となり得る。このアプローチを使用して、抗体分子への架橋に適していない薬剤、例えば治療剤、または隔離されることになるか、もしくは非標的細胞との接触が最小化されるべき薬剤、例えば治療剤を送達することができる。具体的な実施形態において、リボソームには、細胞増殖抑制性または細胞毒性剤が充填される。ある特定の具体的な実施形態において、治療剤は、マイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、クリプトフィシン、タキサン、DNAアルキル化剤、カリケアマイシン、及び前述のものの誘導体から選択される。他の実施形態において、リボソームには、GCCを発現する細胞においてGCC発現または別の遺伝子、例えば癌遺伝子の発現を減少させることができる、RNA干渉分子、例えば、アンチセンス分子、siRNA、hsRNA、またはmiRNA分子を構成する核酸配列が充填される。いくつかの他の実施形態において、リボソームは、抗GCC抗体分子及び治療剤もしくは標識を含む免疫複合体でコーティングされるか、またはそれが充填される。

【0255】

投薬レジメンは、最適な所望される応答（例えば、治療的応答）をもたらすように調整される。例えば、本明細書に記載される抗GCC抗体分子もしくは免疫複合体の単回ボラスが投与されてもよく、複数の分割用量が経時的に投与されてもよく、または用量は、治療状況の緊急性により示されるように比例的に低減もしくは増加されてもよい。投与の簡易さ及び投薬の均一性のために、非経口組成物を投薬単位形態で製剤化することが特に有利である。「投薬単位形態」という用語は、本明細書に使用されるとき、治療される対象の単位投薬量として好適な物理的に異なる単位を指し、各単位は、必要とされる薬学的担体と関連して所望される効果をもたらすように計算された所定の量の活性化化合物を含有する。本発明の投薬単位形態の仕様は、（a）活性化化合物の固有の特徴及び達成される具体的な治療効果、ならびに（b）個体における感受性の治療のためにそのような活性化化合物の調合の分野に固有の制限に影響され、かつそれに直接的に依存する。

【0256】

本発明の抗G C C抗体分子または免疫複合体の治療的または予防的に有効な量の例示的な非限定的範囲は、0.1～20mg/kg、または1～10mg/kgである。1つの具体的な実施形態において、本発明の抗G C C抗体分子または免疫複合体の治療的または予防的に有効な量は、およそ1.8mg/kg～3.5mg/kgの範囲、またはそのような範囲内の任意の特定の値、例えば、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3.0mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、または3.5mg/kgである。いくつかの実施形態において、抗G C C抗体分子またはその免疫複合体は、第2の治療剤、例えばDNA損傷剤との相乗性を達成するのに十分に高い用量で投与される。投薬値は、寛解させようとする状態の種類及び重症度によって多様であり得ることに留意されたい。任意の具体的な対象に関して、特定の投薬レジメンが、個体の必要性及び組成物を投与するかまたはその投与を監視する人物の専門的な判断に従って経時的に調整されるはずであること、ならびに本明細書に記載される投薬範囲は例示に過ぎず、特許請求される組成物の範囲または実施を制限することを意図するものではないことが、さらに理解される。

【0257】

本発明の薬学的組成物は、本発明の抗G C C抗体分子または免疫複合体の「治療的に有効な」量を含み得る。「治療的に有効な」量とは、必要とされる投薬量及び期間で、所望される治療結果を達成するのに有効な量を指す。抗体分子または免疫複合体の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに抗体分子または免疫複合体が個体において所望の応答を誘起する能力によって多様であり得る。治療有効量はまた、抗体分子または免疫複合体の毒性または有害な作用よりも治療的に有益な作用が上回るものである。「治療有効投薬量」は、好ましくは、処置対象において、測定可能なパラメーター（例えば、腫瘍量及び／または腫瘍成長速度）を、未処置の対象と比較して、少なくとも約20%、少なくとも約40%、少なくとも約60%、及び一部の実施形態では少なくとも約80%阻害する。化合物が測定可能なパラメーター、例えば、癌を阻害する能力を、ヒト腫瘍における有効性の予測となる動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、化合物の阻害能力、例えばインビトロでの阻害を当業者に既知のアッセイにより試験することによって、評価することができる。

【0258】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載されるように、追加の治療剤と一緒に製剤化された抗G C C抗体分子またはその免疫複合体と、薬学的に許容される担体とを含む、組成物、例えば、薬学的に許容される組成物を特徴とする。抗G C C抗体分子またはその免疫複合体、及び追加の治療剤は、組み合わせて仕様した場合に治療的に有効な量で提供される。ある特定の実施形態において、追加の治療剤は、例えば、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アルキル化剤、アルキル化様剤、アントラサイクリン、DNAインターカレーター、DNA副溝アルキル化剤、及び抗代謝剤を含む、DNA損傷剤である。それぞれのそのようなDNA損傷剤の具体的な例は、本明細書に記載される。抗G C C抗体分子は、表1～6に要約される例示的な特徴を有するものである。

【0259】

ある特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載される式(I-4)、(I-5)、(I-6)、または(I-7)による免疫複合体であって、式中、変数Abは、本明細書に記載される抗G C C抗体分子、例えば、表1～6のうちの1つ以上に記載される例示的な特徴を有する、免疫複合体と、トポイソメラーゼI阻害剤とを含み、免疫複合体及びトポイソメラーゼI阻害剤は、治療的に有効な合計量で存在する、薬学的に許容される組成物を特徴とする。例えば、限定するものではないが、薬学的組成物には、変数Abが5F9抗体分子であり、mが約4である、式I-5の免疫複合体と、イリノテカンとが含まれる。

【0260】

ある特定の実施形態において、本発明の免疫複合体は、投与の容易さ及び投薬の均一性のために、単位剤形で、DNA損傷剤と組み合わせて製剤化され得る。本明細書に使用される「単位剤形」という表現は、治療される患者に適切な薬剤の物理的に異なる単位を指す。しかしながら、本発明の組成物の合計1日使用量は、妥当な医学的判断の範囲内で担当医により決定される。具体的な実施形態において、免疫複合体及びDNA損傷剤の単位剤形は、非経口投与に好適な溶液または懸濁液である。別の具体的な実施形態において、免疫複合体及びDNA損傷剤の単位剤形は、凍結乾燥され、（例えば、薬学的に許容される担体中に）再懸濁すると非経口投与に好適である。非経口投与の単位用量形態は、アンプルまたは複数回用量容器であり得る。

【0261】

本明細書に記載される抗GCC抗体分子または免疫複合体を含むキットもまた、本発明の範囲内である。抗GCC抗体分子または免疫複合体を含むリボソーム組成物を含むキットが、さらに含まれる。キットは、使用のための説明書；他の試薬、例えば、標識、治療剤、または抗体をキレート化するか、そうでなければそれを標識もしくは治療剤にカップリングさせるのに有用な薬剤、または放射保護組成物；投与のための抗体を調製するためのデバイスまたは他の材料；薬学的に許容される担体；ならびに例えば治療または診断用途で対象に投与するためのデバイスまたは他の材料を含む、1つ以上の他の要素を含み得る。使用のための説明書には、試料、例えば、例として、癌を有する患者由来の生検もしくは細胞においてインビトロで、またはインビボにおいてGCCを検出するための、抗GCC抗体分子または他の分子、例えば、ペプチドの診断用途のための説明書が含まれ得る。説明は、癌（例えば、消化器起源の癌、例えば、結腸癌、胃癌、食道癌等）を有する患者における、提案される投薬量及び／または投与量を含み得る。他の説明書には、抗体を治療剤にカップリングすること、または例えば、未反応複合体成分から複合体化抗体への精製のための説明書が含まれる。上述のように、キットは、標識、例えば、本明細書に記載される標識のうちのいずれかを含み得る。上述のように、キットは、治療剤、例えば、本明細書に記載される治療剤を含み得る。いくつかの用途において、抗体を、他の化合物、例えば、キレート剤、または治療剤、例えば放射性同位体、例えばイットリウムもしくはルテリウムと反応させる。そのような事例において、キットには、反応を行うための反応容器、または出発物質または反応中間体から最終生成物を分離するために使用するための別個のデバイス、例えば、クロマトグラフィーカラムが含まれ得る。

【0262】

キットは、少なくとも1つの追加の試薬、例えば、診断もしくは治療剤、例えば、本明細書に記載される診断もしくは治療剤、及び／または1つ以上の別個の薬学的調製物として適宜製剤化されるか、もしくは単一剤形として製剤化される、1つ以上の追加の抗GCC抗体分子もしくは免疫複合体をさらに含み得る。

【0263】

ある特定の実施形態において、キットは、本明細書に記載される式(I-4)、(I-5)、(I-6)、または(I-7)によって特徴付けられる免疫複合体であって、式中、変数A bは、表1～6に要約される例示的な特徴を有する抗GCC抗体分子である、免疫複合体と、例えば癌（例えば、消化器起源の原発性もしくは転移性癌、例えば、例として結腸癌、胃癌、膵臓癌、もしくは食道癌）を有する患者において、DNA損傷剤と組み合わせた免疫複合体の推奨される投薬量及び／または投与様式を含む、治療用途のための説明書とを含む。場合によっては、キットは、免疫複合体と組み合わせて使用するためのDNA損傷剤の別個の薬学的調製物をさらに含む。免疫複合体と組み合わせて使用するのに好適なDNA損傷剤の例としては、例えば、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アルキル化剤、アルキル化様剤、アントラサイクリン、DNAインターカレーター、DNA副溝アルキル化剤、及び抗代謝剤が挙げられ、それぞれのそのようなDNA損傷剤の具体的な例は、本明細書に記載される。例えば、限定するものではなく、キットは、本明細書に記載される式(I-5)による免疫複合体であって、式中、変数A bは、5F9抗体分子であり、mは約4である、免疫複合体の薬学的調製物と、トポイソ

メラゼ I 阻害剤、例えば、イリノテカンと組み合わせた免疫複合体の推奨される投薬量及び／または投与様式を含む、治療用途のための説明書とを含む。場合によっては、キットは、免疫複合体と組み合わせて使用するためのトポイソメラゼ I 阻害剤の別個の薬学的調製物をさらに含む。

【0264】

さらに別の実施例において、限定することなく、キットは、式 (I-5) による免疫複合体であって、式中、A b は 5 F 9 抗体分子であり、m は約 4 である、免疫複合体の薬学的調製物と、DNA 損傷剤、例えば、トポイソメラゼ I 阻害剤（例えば、イリノテカン）または DNA 副溝アルキル化剤（例えば、デュオカルマイシン、例えば CC-1065、またはその任意の類似体もしくは誘導体；ピロロベンゾジアゼピン、またはその任意の類似体もしくは誘導体）（ここで、免疫複合体及び DNA 損傷剤は、共製剤化される（例えば、単一剤形））と、例えば、癌（例えば、消化器起源の元末性もしくは転移性癌、例えば、例として結腸癌、胃癌、膵臓癌、もしくは食道癌）を有する患者における投薬スケジュール及び投与様式を含む治療用途のための説明書とを含み得る。

【0265】

提供されるキットは、患者への投与のために、キレート物質と複合体化されたタンパク質またはペプチドを含み得る。キットには、(i) キレート物質複合体化抗体を含有するバイアル、(ii) 安定化及び放射標識した抗体を患者に投与するための製剤緩衝液を含有するバイアル、ならびに (iii) 放射標識手順を行うための説明書が含まれ得る。キットは、例えば、説明書で推奨される良好な条件下において、十分な時間の間、キレート物質複合体化抗体を放射性同位体またはその塩に曝露することをもたらす。十分な純度、特定の活性、及び結合特異性を有する放射標識した抗体が産生される。放射標識抗体は、例えば、製剤緩衝液中で適切な濃度に希釈され、さらなる精製ありまたはなしで患者に直接投与され得る。キレート物質複合体化抗体は、凍結乾燥形態で提供され得る。

【0266】

使用

本明細書に記載される抗 G C C 抗体分子は、インビトロ及びインビボで治療上及び予防上の有用性を有する。例えば、これらの抗体分子は、種々の障害の治療、予防、及び／または診断のために、培養物中の細胞に、例えば、インビトロもしくはエキソビボで投与されるか、または対象に、例えば、インビボで投与され得る。

【0267】

本明細書に記載される抗体分子及び免疫複合体は、リガンド結合（例えば、S T またはグアニリンの結合）、G C C 媒介性シグナル伝達、腸液の維持、電解質恒常性、細胞内カルシウム放出（カルシウム流出）、細胞分化、細胞増殖、または細胞活性化といった、G C C タンパク質の活性または機能を調節し得る。

【0268】

一態様において、本発明は、G C C 発現細胞の殺滅、その成長の阻害もしくは調節、またはその代謝の遮断の方法を特徴とする。一実施形態において、本発明は、G C C 媒介性細胞シグナル伝達を阻害する方法または細胞を殺滅させる方法を提供する。本方法は、G C C を発現する細胞もしくは組織、例えば、癌性細胞（例えば、消化器系の癌、例えば、結腸、胃、膵臓、もしくは食道の癌等に由来する細胞）、または転移病変部で使用され得る。G C C 発現細胞の非限定的な例としては、T 8 4 ヒト結腸腺癌細胞、新しいかまたは凍結させた結腸腫瘍細胞、G C C またはその一部分をコードする組み換え核酸を含む細胞が挙げられる。

【0269】

本発明の方法は、本明細書に記載されるように、細胞を、有効な量、すなわち、G C C 媒介性細胞シグナル伝達を阻害するのに十分な量、または細胞を殺滅させるのに十分な量で、抗 G C C 抗体分子またはその免疫複合体と接触させるステップを含む。本方法は、G C C を発現する培養細胞において、例えば、インビトロ、エキソビボ、またはインサイツで、使用され得る。例えば、G C C を発現する細胞（例えば、腫瘍もしくは転移病変部の

生検によって採取された細胞、確立された癌細胞系に由来する細胞、または組み換え細胞)を、培養培地においてインビトロで培養してもよく、接触ステップは、抗G C C抗体分子または免疫複合体を培養培地に添加することによって達成され得る。細胞を殺滅させる方法において、この方法は、ネイキッド抗G C C抗体分子、または抗G C C抗体分子と細胞毒性剤、例えば、DNA損傷剤とを含む免疫複合体を使用することを含む。本方法により、G C Cを発現する具体的な腫瘍細胞(例えば、結腸腫瘍細胞)を含む、G C Cを発現する細胞の殺滅をもたらす。

【0270】

本発明の抗G C C抗体分子は、抗原を発現する細胞において、G C Cの細胞外ドメインまたはその部分に結合する。結果として、癌性細胞を殺滅及び/または抑制するために本発明の方法を実施するとき、抗体分子は、固定された細胞、または細胞内抗原性ドメインが他の方法で細胞外環境に曝露される細胞だけでなく、すべてのそのような細胞に結合する。その結果、抗体分子の結合は、これらの細胞が固定されているか固定されていないか、生存可能であるか壊死性であるかに関わらず、G C Cを発現する細胞が存在する領域に集中する。追加として、または代替として、抗G C C抗体分子は、抗原を発現する細胞に結合すると、G C Cに結合し、内部移行される。

【0271】

表7は、G C Cへの結合後に内部移行することが確認された抗体分子を示す。抗体は、例えば、細胞毒性部分に連結する場合、治療用途に有用である。

【0272】

本方法はまた、インビボプロトコルの一部として、対象に存在する細胞に行うことができる。一実施形態において、対象は、ヒト対象である。あるいは、対象は、本明細書に開示される抗G C C抗体分子が交差反応するG C C抗原を発現する非ヒト哺乳動物であり得る。ある特定の実施形態において、対象は、移植されたヒト組織を有する非ヒト哺乳動物(すなわち、異種移植片モデル)である。DNA損傷剤と組み合わせて、抗G C C抗体分子またはその免疫複合体は、治療目的でヒト対象に投与され得る。抗G C C抗体分子または免疫複合体はまた、DNA損傷剤と組み合わせて、獣医学目的でまたはヒト疾患の動物モデル(例えば、転移性結腸直腸癌患者に由来する一次ヒト腫瘍移植片も異種移植片モデル)として、抗体が交差反応するG C C様抗原を発現する非ヒト動物(例えば、霊長類、ブタ、ラット、もしくはマウス)に、投与され得る。動物モデルは、本明細書に記載される抗G C C抗体または免疫複合体及び本明細書に記載されるDNA損傷剤の組み合わせの治療的有効性を評価(例えば、投薬量及び投与経過の試験)するのに有用であり得る。インビボの実施形態については、接触ステップは、対象において実行され、抗G C C抗体分子またはその免疫複合体を、DNA損傷剤と組み合わせて、細胞上に発現されるG C Cの細胞外ドメインへの抗体分子の結合と、細胞の処置との両方に有効な条件下で、対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、相乗性、投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、または免疫複合体もしくはDNA損傷剤に耐性の腫瘍に対する効果のうちの1つ以上のをもたらす。

【0273】

いくつかの実施形態において、DNA損傷剤と組み合わせた免疫複合体(例えば、任意でAbが表5のCDRを含む、式(I-5)による免疫複合体)は、リスト1の治療効果のうちの1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、または9個、例えば、すべて)をもたらす：

【0274】

(a) 免疫複合体またはDNA損傷剤単独の効果と比較して相乗的な応答をもたらし、この応答は、任意で、腫瘍成長の阻害(TGI)または腫瘍成長の遅延(TGD)(例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防)である、

【0275】

(a) 免疫複合体またはDNA損傷剤単独の効果と比較して相加的な応答をもたらし、この応答は、任意で、TGIまたはTGD(例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防)で

ある、

【0276】

(c) 免疫複合体、DNA損傷剤、またはその両方の投与が終了した後少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週間、またはそれ以上継続するTGIまたはTGD（例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防）をもたらす、

【0277】

(d) 比較的高度、中等度、または低度のGCC抗原密度を示す癌において、TGIまたはTGD（例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防）、例えば、相乗的TGIまたはTGDをもたらす、

【0278】

(e) 単独で（すなわち、単一剤治療薬として）投与した場合に免疫複合体に対して強力、中等度から強力、または軽度の感受性を示す癌において、相乗的TGIまたはTGD（例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防）をもたらす、

【0279】

(f) 単独で（すなわち、単一剤治療薬として）投与した場合に免疫複合体に対して耐性を示す癌において、TGIまたはTGD（例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防）をもたらす、

【0280】

(g) 単独で（すなわち、単一剤治療薬として）投与した場合にDNA損傷剤に対して感受性を示す癌において、相乗的TGIまたはTGD（例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防）をもたらす、

【0281】

(h) 単独で（すなわち、単一剤治療薬として）投与した場合にDNA損傷剤に対して耐性を示す癌において、TGIまたはTGD（例えば、腫瘍成長もしくは再成長の予防）をもたらす、ならびに

【0282】

(i) 治療薬の投与時の腫瘍成長阻害。

【0283】

一実施形態において、本発明は、癌を治療する方法であって、抗GCC抗体分子または抗GCC抗体分子及び細胞毒性剤を含む免疫複合体を、DNA損傷剤と組み合わせて、そのような治療を必要とする患者に投与することによる、方法を提供する。本方法は、例えば、GCC抗原を発現する少なくともいくつかの細胞を含む、任意の癌性障害の治療に使用され得る。本明細書に使用されるとき、「癌」という用語は、組織学的種類または侵襲性の段階に関係なく、すべての種類の癌性成長もしくは発癌プロセス、転移組織もしくは悪性形質転換細胞、組織、もしくは器官を含むことを意味する。「癌」及び「腫瘍」という用語は、互換的に使用され得る（例えば、治療方法の文脈で使用されるとき、「癌の治療」及び「腫瘍の治療」は、同じ意味を有する）。

【0284】

実施形態において、治療は、対象の腫瘍の成長の低減もしくは阻害、そのような治療を施した後の対象の腫瘍の再成長の低減もしくは阻害、転移病変部の数もしくは寸法の低減、腫瘍負荷量の低減、一次腫瘍負荷量の低減、侵襲性の低減、長期生存期間、または生活の質の維持もしくは向上を行うのに十分である。

【0285】

癌性障害の例としては、固形腫瘍、軟組織腫瘍、及び転移病変部が挙げられるが、これらに限定されない。固形腫瘍の例には、種々の器官系の悪性腫瘍、例えば、肉腫、腺癌、及び癌腫、例えば結腸に罹患するものが挙げられる。腺癌には、肺の非小細胞癌腫等の悪性腫瘍が挙げられる。前述の癌の転移病変部もまた、本発明の方法及び組成物を使用して治療または予防され得る。いくつかの実施形態において、治療される癌は、消化器系の癌（例えば、原発性または転移性の結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、または食道癌）である。いくつかの実施形態において、治療は、前述の種類の癌のうちの1つに対して、本明細書の

10

20

30

40

50

リスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与が終了した後の腫瘍再成長の予防、または免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した際の腫瘍成長の阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

【0286】

一実施形態において、癌は、結腸直腸癌、例えば、結腸直腸腺癌、結腸直腸平滑筋肉腫、結腸直腸リンパ腫、結腸直腸黒色腫、または結腸直腸神経内分泌腫瘍である。具体的な実施形態において、癌は、転移性結腸癌である。別の実施形態において、癌は、胃癌（例えば、胃の腺癌、リンパ腫、もしくは肉腫）、またはその転移癌である。別の実施形態において、癌は、食道癌（例えば、扁平上皮細胞癌、または食道の腺癌）である。いくつかの実施形態において、治療は、前述の種類の癌のうちの 1 つに対して、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与が終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した際の腫瘍成長の阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

【0287】

本発明の方法は、任意のステージまたは下位分類の関連障害の治療に有用であり得る。例えば、方法は、早期もしくは末期の結腸癌、またはステージ 0、I、IIA、IIB、IIIA、IIIB、IIIC、及び IV のいずれかの結腸癌の治療に使用され得る。

【0288】

いくつかの実施形態において、癌（例えば、原発性または転移性の結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、または食道癌）を治療するための方法は、そのような治療を必要とする患者に、本明細書に記載されるネイキッド抗 G C C 抗体分子を投与することを含む。他の実施形態において、本方法は、本明細書に記載される抗 G C C 抗体分子及び細胞毒性剤を含む免疫複合体を、DNA 損傷剤と組み合わせて投与することを含む。いくつかのそのような実施形態において、免疫複合体は、本明細書に記載される式 (I) によって特徴付けられる。ある特定の実施形態において、免疫複合体は、本明細書に記載される式 (I-1)、(I-2)、(I-3)、(I-4)、(I-5)、(I-6)、または (I-7) によって特徴付けられる。具体的な実施形態において、免疫複合体は、式 (I)、(I-1)、(I-2)、(I-3)、(I-4)、(I-5)、(I-6)、または (I-7) によって特徴付けられ、ここで、変数 A b は、表 1 ~ 6 に要約される特徴を有する抗体分子である。ある特定の実施形態において、変数 A b は、5 F 9 抗体分子である。ある特定の具体的な実施形態において、免疫複合体は、式 (I-5) または (I-6) によって特徴付けられ、ここで、変数 A b は、本明細書に記載される抗 G C C 抗体分子、例えば、5 F 9 抗体分子である。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

【0289】

抗体分子及び免疫複合体を投与する方法は、上に記載される。使用される分子の好適な投薬量は、対象の年齢及び体重、ならびに使用される具体的な化合物に依存する。

【0290】

いくつかの実施形態において、抗 G C C 抗体分子または免疫複合体及び DNA 損傷剤は、治療周期で投与される。「治療周期」は、抗 G C C 抗体分子または免疫複合体及び DNA 損傷剤が上述のように投与される治療期間、抗 G C C 抗体分子または免疫複合体及び DNA 損傷剤が全く投与されないその後の休薬期間からなる。治療周期は、所望の効果を達成するために、必要に応じて反復され得る。いくつかの実施形態において、所望される効果は、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの 1 つ以上である。

【0291】

本明細書に記載される治療薬（例えば、DNA損傷剤と組み合わせた抗GCC免疫複合体）は、他の治療薬と組み合わせて使用され得る。例えば、組み合わせ治療には、1つ以上の追加の治療剤、例えば、1つ以上の抗癌剤、例えば、細胞毒性もしくは細胞増殖抑制性剤、ホルモン治療、ワクチン、及び／または他の免疫療法薬と共製剤化及び／または共投与される、本発明の組成物が含まれ得る。他の実施形態において、DNA損傷剤と組み合わせた抗GCC免疫複合体は、他の治療的治療様式と組み合わせて投与される。外科手術、放射線、凍結外科手術、及び／または温熱療法と組み合わせて投与される。そのような組み合わせ治療は、有利なことに、投与される治療剤のより低い投薬量を利用し、したがって、種々の単独療法に関連する可能性のある毒性または合併症を回避することができる。そのような組み合わせ治療はまた、従来の治療レジメンに対する化学耐性を克服及び／または予防することができる。

10

【0292】

本明細書に使用されるとき、「組み合わせて」投与されるとは、2つ（またはそれ以上）の異なる治療が、障害に伴う対象の苦痛の過程において対象に送達されること、例えば、2つ以上の治療が、対象が障害を有すると診断された後かつ障害が治癒または排除される前に、送達されることを意味する。いくつかの実施形態において、1つの治療の送達は、第2の治療の送達を開始するときに依然として発生しており、そのため、重複が存在する。これは、本明細書において、しばしば「同時」または「付随的」または「並行送達」と称される。他の実施形態において、一方の治療の送達は、他方の治療送達の開始前に終了する。これは、本明細書において、しばしば「連続的」または「逐次的送達」と称される。いずれの場合の実施形態においても、治療は、組み合わせた投与のために、より有効である。例えば、第2の治療は、より有効である、例えば、同等の効果が、より少ない第2の治療で確認されるか、または第2の治療は、症状を、第2の治療が第1の治療の不在下で施された場合に見られるであろうものよりも大きな範囲で低減させるか、または類似の状況が第1の治療で見られる。いくつかの実施形態において、送達は、症状の低減または障害に関連する他のパラメーターが、他方の不在下で送達される一方の治療で観察されるであろうものよりも大きくなるようなものである。2つの治療の効果は、部分的に相加的、全体的に相加的、または相加的を超える（すなわち、相乗的）であり得る。送達は、送達される第1の治療の効果が、第2のものが送達されたときに依然として検出可能であるようなものであり得る。

20

30

【0293】

いくつかの実施形態において、抗GCC抗体分子またはその免疫複合体（例えば、式（I-5）の免疫複合体であって、式中、抗GCC抗体は、任意に、表5のCDRを含む）は、別の治療剤、例えば、化学療法剤と組み合わせて使用される。DNA損傷化学療法剤の非限定的な例としては、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、SN-38、ラメラリンD、またはカンプトテシン）；トポイソメラーゼII阻害剤（例えば、エトポシド、テニポシド、アムサクリン、またはミトキサントロン）；アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、またはバルルビシン）；アルキル化剤（例えば、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、チオテパ、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、マイトマイシンC、シクロホスファミド、メクロレタミン、ウラムスチン、ジプロモマンニトール、四硝酸塩、プロカルバジン、アルトレタミン、ミトゾロミド、またはテモゾロミド）；アルキル化様剤（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、サトラプラチン、またはトリプラチン）；DNAインターカレーター及びフリーラジカル生成物質、例えばブレオマイシン；DNA副溝アルキル化剤（例えば、デュオカルマイシン、例えばCC-1065、及びそれらの類似体もしくは誘導体；ピロロベンゾジアゼペン、またはその任意の類似体もしくは誘導体）；ならびに抗代謝剤（例えば、フルオロウラシル（5-FU）、フロクスウリジン（5-FUdR）、メトトレキサート、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン（6-

40

50

TG)、メルカプトプリン(6-MP)、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン(2-CD A)、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、カペシタビン、アザチオプリン、シトシンメトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、またはペメトレキセド)が挙げられる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0294】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、イリノテカンと組み合わせて投与され、相乗的有効性が生じる。

10

【0295】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、5-フルオロウラシルと組み合わせて投与され、相乗的有効性が生じる。

【0296】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、免疫複合体単独に対して耐性の癌を治療するためにイリノテカンと組み合わせて投与され、相乗的有効性が生じる。

【0297】

細胞複製を破壊する化学療法剤(すなわち、微小管脱重合または安定化剤)には、次のものが挙げられるがこれらに限定されない:タキサン、例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、及び関連類似体;ビンカアルカロイド、例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ビンデシン、及びビンフルニン、ならびに関連類似体;エポチロン、例えば、エポチロンB、イキサベピロン、及び関連類似体;ハリコンドリリン、例えば、ハリコンドリリンB及び関連類似体;コルヒチン部位結合剤、例えば、コルヒチン;サリドマイド、レナリドマイド、及び関連類似体(例えば、CC-5013及びCC-4047);タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、メシル酸イマチニブ(imatinib mesylate)及びゲフィチニブ);プロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブ);NF-κB阻害剤(IκBキナーゼの阻害剤を含む);癌に過剰発現されるタンパク質に結合し、それによって細胞複製を下方制御する抗体(例えば、トラスツズマブ、リツキシマブ、セツキシマブ、及びベバシズマブ);ならびに、癌において上方制御、過剰発現、または活性化されることが既知であり、その阻害が細胞複製を下方制御する、タンパク質または酵素の他の阻害剤。

20

30

【0298】

本発明の抗GCC抗体分子または免疫複合体と組み合わされる治療剤(複数可)または治療様式の選択は、治療される障害及び具体的な治療剤に対するそのような障害の感受性に依存する。追加の薬剤(複数可)または治療様式には、例えば、治療される適応症に認可された標準的な治療薬が含まれ得る。例えば、抗GCC抗体分子またはその免疫複合体(例えば、式(I-5)の免疫複合体)を使用して結腸癌を治療するとき、それは、例えば、外科手術;放射線療法;5-フルオロウリシル(fluorouracil)(5-FU)、カペシタビン、ロイコボリン、イリノテカン(CPT-11)、オキサリプラチン、シスプラチン、ベバシズマブ、セツキシマブ、またはパニツマム(panitumum)、または上に列挙される薬剤のいずれかの組み合わせ、例えば、オキサリプラチン/カペシタビン(XELOX)、5-フルオロウリシル/ロイコボリン/オキサリプラチン(FOLF OX)、5-フルオロウリシル/ロイコボリン/イリノテカン(FOLFIRI)、FOLF OXとベバシズマブ、またはFOLFIRIとベバシズマブ)と組み合わせて使用され得る。追加の例として、抗GCC抗体分子またはその免疫複合体(例えば、式(I-5)の免疫複合体)を使用して膵臓癌を治療するとき、それは、ゲムシタビンと組み合わせて使用される(例えば、共投与される)。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上

40

50

をもたらす。

【0299】

ある特定の消化器腫瘍が、ある特定の化学療法剤、例えば、微小管破壊剤パクリタキセル及びビンクリスチン等に本質的に耐性であるか、または耐性を獲得することが示されている。近年、タキサンは、結腸直腸癌（CRC）での第Ⅰ相試験において、有意な臨床的利点を示すことに失敗した（例えば、Swanton et al. Cell Cycle. 2006 Apr; 5（8）：818－23を参照されたい）。理論に束縛されることを望むものではないが、この疾患における染色体不安定性の高い発生率は、インビボでの紡錘体チェックポイントにおける改変とともに、タキサンに基づくCRCの治療と関連する残念な結果を説明し得る。別の強力な微小管破壊剤MMAEは、現在結腸直腸癌の10治療のための第Ⅰ相試験下にあるMMAEに複合体化された抗GCC抗体分子を含む、現在種々の癌の治療のための臨床試験下にあるいくつかの標的化された治療剤において用いられる。以下の実施例6は、ヒト原発性結腸直腸腫瘍に由来する複数の腫瘍異種移植片モデルにおいて、MMAE（強力な微小管阻害剤）に複合体化された本発明の抗GCC分子を含む免疫複合体に対する感受性を実証する。実施例6はまた、ヒト原発性結腸直腸腫瘍に由来する少なくとも1つの腫瘍異種移植片モデルにおける同じ抗GCC mAb－MMAE免疫複合体に対する化学耐性を実証する。驚くべきことに、本抗GCC mAb－MMAE免疫複合体及びDNA損傷剤の共投与は、不応性腫瘍モデルをDNA損傷剤の抗腫瘍活性に対して感受性にした。

【0300】

したがって、本発明は、本明細書に記載される式（I－4）、（I－5）、（I－6）、または（I－7）によって特徴付けられる免疫複合体であって、変数Abが、本明細書に記載される抗体分子、例えば、表1～6に要約される特徴のうちの1つ以上を有する抗体分子である、免疫複合体を、DNA損傷剤と組み合わせて投与することによって、消化器癌を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0301】

具体的な実施形態において、DNA損傷剤と組み合わせて投与される免疫複合体は、式（I－5）によって特徴付けられる。例えば、限定することなく、本発明は、式（I－5）による免疫複合体であって、変数Abが、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体分子であり、mが約4である、免疫複合体と、トポイソメラーゼⅠ阻害剤とを共投与することによって、原発性または転移性の結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、または食道癌を治療する方法を提供し、ここで、免疫複合体及びトポイソメラーゼⅠ阻害剤は、治療的に有効な合計量で投与される。具体的な実施形態において、トポイソメラーゼⅠ阻害剤はイリノテカンであり、式（I－5）の免疫複合体は、原発性または転移性結腸直腸癌の治療のためにイリノテカンと組み合わせて投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0302】

本発明は、式（I－5）による免疫複合体であって、変数Abが、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体分子であり、mが約4である、免疫複合体と、アルキル化様剤とを共投与することによって、原発性または転移性の結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、または食道癌を治療する方法をさらに提供し、ここで、免疫複合体及びアルキル化様剤のそれぞれは、治療的に有効な合計量で投与される。具体的な実施形態において、アルキル化様剤は、オキサリプラチンまたはシスプラチンであり、式（I－5）による免疫複合体は、原発性または転移性結腸直腸癌の治療のためにオキサリプラチンまたはシス

プラチンと組み合わせて投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0303】

本発明は、式(I-5)による免疫複合体であって、変数Abが、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体分子であり、mが約4である、免疫複合体と、抗代謝剤とを共投与することによって、原発性または転移性結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、または食道癌を治療する方法をなおもさらに提供し、ここで、免疫複合体及び抗代謝剤のそれぞれは、治療的に有効な合計量で投与される。具体的な実施形態において、抗代謝剤はゲムシタピンであり、式(I-5)による免疫複合体は、原発性または転移性膵臓癌の治療のためにゲムシタピンと組み合わせて投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0304】

本発明の免疫複合体(例えば、任意に表5のCDRを含む式(I-5)による免疫複合体)は、別個の製剤として、または単一剤形として、DNA損傷剤とともに投与され得る。一実施形態において、別個の剤形として投与される場合、免疫複合体は、DNA損傷剤の投与の前、同時、または後に投与され得る。別の実施形態において、別個の剤形として投与される場合、免疫複合体の1つ以上の用量は、DNA損傷剤の前に投与され得る。別の実施形態において、別個の剤形として投与される場合、DNA損傷剤の1つ以上の用量は、免疫複合体の前に投与され得る。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、または免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0305】

本発明の方法において、本明細書に記載される免疫複合体は、消化器癌を有する患者へのDNA損傷剤の投与の前(例えば、5分前、15分前、30分前、45分前、1時間前、2時間前、4時間前、6時間前、12時間前、24時間前、48時間前、72時間前、96時間前、1週間前、2週間前、3週間前、4週間前、5週間前、6週間前、8週間前、もしくは12週間前)、それに付随して、または後(例えば、5分後、15分後、30分後、45分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、8週間後、もしくは12週間後)に投与され得る。いくつかの実施形態において、免疫複合体及びDNA損傷剤は、同じ患者診察の間に投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0306】

いくつかの実施形態において、免疫複合体(例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式(I-5)による免疫複合体)及びDNA損傷剤は、患者、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトに、本明細書に提供される第1の薬剤が第2の薬剤と一緒に作用して、それらを別の方法で投与した場合よりも優れた利点をもたらすことができるように、逐次的かつある時間間隔で投与される。例えば、免疫複合体及びDNA損傷剤は、同時、または異なる時点で任意の順序で逐次的に投与され得るが、同時に投与される場合、それらは、所望される治療または予防効果をもたらすことができるように、十分に近い時間に投与され

るべきである。一実施形態において、免疫複合体及びDNA損傷剤は、重複する時点でこれらの効果を発揮する。いくつかの実施形態において、免疫複合体及びDNA損傷剤は、それぞれ、適切な形態かつ任意の好適な経路で、別個に投与される。他の実施形態において、免疫複合体及びDNA損傷剤は、単一剤形で同時に投与され得る。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0307】

いくつかの実施形態において、一連の治療は、付随的に患者に施される、すなわち、免疫複合体及びDNA損傷剤の個々の用量は、別個に投与されるが、2つの薬剤が一緒に作用するような時間間隔内で投与される。換言すると、投薬レジメンは、治療薬が同時または同日中に投与されない場合ですら、付随的に実行される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0308】

いくつかの実施形態において、免疫複合体(例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式(I-5)による免疫複合体)及びDNA損傷剤は、周期的に患者に投与される。周期的治療は、第1の薬剤(例えば、第1の予防的もしくは治療的薬剤)をある期間投与した後に、第2の薬剤及び/または第3の薬剤(例えば、第2及び/もしくは第3の治療的もしくは予防的薬剤)をある期間投与し、この逐次投与を反復することを伴う。周期的治療により、治療薬のうちの1つ以上に対する耐性の発生を低減する、治療薬のうちの1つの副作用を回避もしくは低減する、及び/または治療の有効性を向上させることができる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0309】

いくつかの実施形態において、薬剤が投与される治療期間の後に、治療剤が患者に投与されない特定の期間の非治療期間が続く。この非治療期間の後に、同じかまたは異なる頻度で同じかまたは異なる長さの一連の後続治療及び非治療期間が続く。いくつかの実施形態において、治療及び非治療期間は、交互である。周期的治療における治療の期間は、患者が完全な応答及び部分的な応答を達成するまで継続され得、その時点で治療が停止され得ることが理解される。あるいは、中期的治療における治療の期間は、患者が完全な応答または部分的な応答を達成するまで継続され、その時点で、治療期間は、特定の周期数、継続されてもよい。いくつかの実施形態において、治療期間の長さは、患者の応答に関係なく、特定の周期数であり得る。いくつかの他の実施形態において、治療期間の長さは、患者が再発するまで継続してもよい。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0310】

これらの治療剤(例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式(I-5)による免疫複合体、及び/またはDNA損傷剤)のうちのいずれかが投与され得る頻度は、約2日間、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、約20日間、約28日間、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約1カ月、約2カ月毎、約3カ月毎、約4カ月毎、約5カ月毎、約6カ月毎、約7カ月毎、約8カ月毎、約9カ月毎、約10カ月毎、約11カ月毎、約1年毎、約2年毎、約3年毎、約4

10

20

30

40

50

年毎、または約 5 年毎の期間にわたって 1 回または 1 回を上回り得ることが理解される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

【0311】

例えば、本発明の免疫複合体（例えば、任意に表 5 の CDR を有する Ab を含む式 (I-5) による免疫複合体）は、DNA 損傷剤と組み合わせて、指定期間の間、1 週間に 1 回、1 週間に 2 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回、または 1 カ月に 1 回投与され得る。ある特定の実施形態において、DNA 損傷剤は、免疫複合体の投薬スケジュールとは異なる投薬スケジュールを有する。例えば、免疫複合体は、1 週間に 1 回または 3 週間に 1 回投与され得、DNA 損傷剤は、ある特定の量の DNA 損傷剤が指定の治療期間にわたって 2 日間毎日投与された後、5 日間の非処置期間が続く（2 日間の投薬／5 日間の休薬）、投薬スケジュールを有し得る。別の実施形態において、免疫複合体は、1 週間に 1 回、または 3 週間に 1 回投与され得、DNA 損傷剤は、ある特定の量の DNA 損傷剤が指定の治療期間過程にわたって 3 日間の期間にわたり毎日投与された後、4 日間の非処置期間が続く（3 日間の投薬／4 日間の休薬）、投薬スケジュールを有し得る。別の実施形態において、免疫複合体は、1 週間に 1 回または 3 週間に 1 回投与され得、DNA 損傷剤は、DNA 損傷剤が指定の治療期間過程にわたって 1 週間に 2 回投与され得る投薬スケジュールを有し得る。別の実施形態において、免疫複合体は、1 週間に 1 回または 3 週間に 1 回投与され得、DNA 損傷剤は、DNA 損傷剤が指定の治療期間過程にわたって 2 週間に 1 回投与され得る投薬スケジュールを有し得る。さらに別の実施形態において、免疫複合体は、1 週間に 1 回または 3 週間に 1 回投与され得、DNA 損傷剤は、DNA 損傷剤が指定の治療期間にわたって各週の 1 日目及び 3 日目に投与され得る投薬スケジュールを有し得る、いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

【0312】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される免疫複合体（例えば、任意に表 5 の CDR を含む式 (I-5) の免疫複合体）での治療は、別の方法で同様の腫瘍量の低減または腫瘍成長の遅延を達成するために必要とされるであろうものよりも低い頻度の DNA 損傷剤の投与を可能にする。例えば、いくつかの実施形態において、免疫複合体及び DNA 損傷剤を治療レジメンに加えることにより、DNA 損傷剤の投与頻度を、DNA 損傷剤単独の投与頻度と比較して、少なくとも約 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、1 週間、2 週間、または 3 週間減少させる。結果として、DNA 損傷剤は、例えば、2 日、3 日、4 日、5 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、または 5 週間毎に 1 回を超えない頻度で、患者に投与され得る。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

【0313】

DNA 損傷剤は、免疫複合体（例えば、任意に表 5 の CDR を含む式 (I-5) の免疫複合体）の前、免疫複合体に付随して、それと同時に、または免疫複合体の後に、投与され得る。

【0314】

一実施形態において、組み合わせ投与は、免疫複合体（例えば、任意に表 5 の CDR を有する Ab を含む式 (I-5) による免疫複合体）の第 1 の用量が、3 または 4 週間の期間にわたる週 2 回の DNA 損傷剤の投与と組み合わせて、3 または 4 週間の間、週 1 回投与される、3 または 4 週間の投薬スケジュールで行われる（例えば、免疫複合体の 1 日目

及びDNA損傷剤の1日目が同日内で実質的に同時にまたは付随して生じるように、免疫複合体は各週の1日目に投与され、DNA損傷剤は各週の1日目及び2日目に投与される）。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0315】

別の実施形態において、組み合わせ投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）の第1の用量が、4週間のスケジュールにわたる週2回のDNA損傷剤の投与と組み合わせ、4週間のスケジュール過程にわたり2週間毎に投与される、4週間の投薬スケジュールで行われる（例えば、4週間のスケジュールにわたって、免疫複合体は1日目及び14日目に投与され、DNA損傷剤は各週の1日目及び2日目に投与される）。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

10

【0316】

さらに別の実施形態において、投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを含む式（I-5）による免疫複合体）が、3週間のスケジュールにわたるDNA損傷剤の週2回の投与と組み合わせ、1日目で開始して投与された後に20日の非処置期間が続く、3週間の投薬スケジュールで行われ、例えば、免疫複合体は、1日目に投与された後20日間の非処置が続く、DNA損傷剤は、3週間のスケジュールにわたって各週の1日目及び2日目に投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

20

【0317】

さらに別の実施形態において、投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを含む式（I-5）による免疫複合体）が、3週間のスケジュールにわたるDNA損傷剤の週3回の投与と組み合わせ、1日目で開始して投与された後に20日間の非処置期間が続く、3週間の投薬スケジュールで行われ、例えば、免疫複合体は、1日目に投与された後に20日間の非処置が続く、DNA損傷剤は、3週間のスケジュールにわたって各週の1日目、2日目、及び3日目に投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果をもたらす。

30

【0318】

さらに別の実施形態において、投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）が、3週間のスケジュールにわたって各週の1日目及び2日目に投与されるDNA損傷剤と組み合わせ、週1回投与される、3週間の投薬スケジュールで行われる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果をもたらす。

40

【0319】

さらに別の実施形態において、投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）が、3週間のスケジュールにわたって各週の1日目、2日目、及び3日目に投与されるDNA損傷剤と組み合わせ、週1回投与される、3週間の投薬スケジュールで行われる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果をもたらす。

【0320】

さらに別の実施形態において、投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）が、3週間のスケジュールにわたって1

50

週目の1日目に投与されるDNA損傷剤と組み合わせて、週1回投与される、3週間の投薬スケジュールで行われる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果をもたらす。

【0321】

さらに別の実施形態において、投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）が、3週間のスケジュールにわたって1週目及び2週目のそれぞれの1日目に投与されるDNA損傷剤と組み合わせて、週1回投与される、3週間の投薬スケジュールで行われる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果をもたらす。

【0322】

さらに別の実施形態において、投与は、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）が、3週間のスケジュールにわたって各週の1日目及び3日目に投与されるDNA損傷剤と組み合わせて、週1回投与される、3週間の投薬スケジュールで行われる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果をもたらす。

【0323】

いくつかの実施形態において、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAを含む式（I-5）による免疫複合体）及びDNA損傷剤は、それぞれ、単一の薬剤として使用される場合にその薬剤に典型的に用いられる用量及びスケジュールで投与される。いくつかの他の実施形態において、免疫複合体及びDNA損傷剤は、付随的に投与され、薬剤のうちの一方または両方が、その薬剤が単一の薬剤として使用される場合に典型的に投与されるものよりも低い用量で投与され得、その結果、用量は、副作用が誘起される閾値よりも低くなる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0324】

組み合わせでの免疫複合体及びDNA損傷剤の治療有効量または好適な投薬量は、治療される状態の重症度の性質、具体的な阻害剤、投与の経路、ならびに個々の患者の年齢、体重、全般的な健康状態、及び応答性を含む、多数の要因に依存する。ある特定の実施形態において、好適な用量レベルは、皮膚の有糸分裂指標の増加、または腫瘍有糸分裂細胞における染色体アライメント及び紡錘体双極性の減少、または細胞増殖性障害を有する患者における効果的な曝露の他の標準的な尺度によって測定される、効果的な曝露を達成するものである。ある特定の実施形態において、好適な用量レベルは、腫瘍退縮、または疾患進行、無憎悪生存率、もしくは全体的生存率の他の標準的な尺度によって測定される、治療応答を達成するものである。他の実施形態において、好適な用量レベルは、治療応答を達成し、さらに治療剤の投与に伴う任意の副作用を最小化するものである。

【0325】

免疫複合体の好適な一日投薬量は、一般に、DNA損傷剤と組み合わせて投与した場合に、単一または分割もしくは複数回用量で、単一薬剤としての最大耐容量の約10%～約120%の範囲に及び得る。ある特定の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約20%～約100%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約25%～約90%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約30%～約80%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約40%～約75%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約45%～約60%である。他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約105%、約110

10

20

30

40

50

%、約 115%、または約 120%である。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

【0326】

免疫複合体の好適な投薬量は、日中または夜間の任意の時間に投与され得ることを理解されたい。いくつかの実施形態において、免疫複合体の好適な投薬量は、朝に投与される。いくつかの他の実施形態において、免疫複合体の好適な投薬量は、夕方に投与される。いくつかの他の実施形態において、免疫複合体の好適な投薬量は、朝及び夕方の両方に投与される。

10

【0327】

DNA 損傷剤の好適な一日投薬量は、一般に、本発明の抗 G C C 免疫複合体と組み合わせて投与した場合に、単一または分割もしくは複数回用量で、単一剤としての最大耐容量の約 10%～約 120%に及び得る。ある特定の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約 20%～約 100%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約 25%～約 90%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約 30%～約 80%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約 40%～約 75%である。いくつかの他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約 45%～約 60%である。他の実施形態において、好適な投薬量は、単一剤としての最大耐容量の約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 100%、約 105%、約 110%、約 115%、または約 120%である。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト 1 からの 1 つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体 (f) もしくは DNA 損傷剤 (h) に対する腫瘍耐性への効果、または (i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの 1 つ以上をもたらす。

20

【0328】

したがって、いくつかの実施形態において、本開示は、それを必要とする患者に、免疫複合体（例えば、任意に表 5 の C D R を有する A b を含む式 (I-5) による免疫複合体）を、（例えば、癌、例えば結腸癌を治療するために）イリノテカンの用量と組み合わせて投与することを提供する。イリノテカンの用量は、例えば、約 10 mg/kg、15 mg/kg、もしくは 30 mg/kg（例えば、マウスへの投与について）、または約 0.81 mg/kg、1.2 mg/kg、もしくは 2.4 mg/kg（例えば、ヒトへの投与について）、またはこれらの値のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%であり得る。いくつかの実施形態において、イリノテカン量は、約 0.4～3.0 mg/kg、0.4～0.6 mg/kg、0.6～0.8 mg/kg、0.8 mg/kg～1.0 mg/kg、1.0～1.2 mg/kg、1.2～1.5 mg/kg、1.5～2.0 mg/kg、2.0～2.5 mg/kg、2.5～3.0 mg/kg、またはこれらの下限及び／もしくは上限のいずれかの±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で投与される。投与のタイミングもまた、単位時間当たりの用量を計算する際に考慮され得る。いくつかの実施形態において、イリノテカンは、2日投薬/5日休薬のスケジュールにおいて10 mg/kgの用量で、すなわち、2.9 mg/kg/日で；2日投薬/5日休薬のスケジュールにおいて15 mg/kgの用量で、すなわち、4.3 mg/kg/日で；または1週間に1回310 mg/kgの用量で、すなわち、4.3 mg/kg/日、またはこれらの値のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%で（例えば、マウスに）投与される。いくつかの実施形態において、イリノテカンは、2日投薬/5日休薬のスケジュールにおいて、81 mg/kgの用量で、すな

30

40

50

わち、 0.24 mg/kg/day で；2日投薬／5日休薬のスケジュールにおいて 1.2 mg/kg の用量で、すなわち、 0.35 mg/kg/day で；または1週間に1回 2.4 mg/kg の用量で、すなわち、 0.35 mg/kg/day 、またはこれらの値のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%で（例えば、ヒトに）投与される。いくつかの実施形態において、イリノテカン、約 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.2 \sim 0.3 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.3 \sim 0.4 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.2 \sim 0.4 \text{ mg/kg/day}$ 、もしくは $0.4 \sim 0.5 \text{ mg/kg/day}$ 、またはこれらの下限及び／もしくは上限のいずれか±10%、20%、30%、40%、または50%の投薬量範囲で投与される。いくつかの実施形態において、イリノテカン、 $80 \text{ mg/m}^2 \sim 200 \text{ mg/m}^2$ 、例えば、 $80 \sim 180 \text{ mg/m}^2$ 、 $80 \sim 150 \text{ mg/m}^2$ 、 $90 \sim 120 \text{ mg/m}^2$ 、 120 mg/m^2 未満、またはこれらの上限及び／もしくは下限のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で、場合によっては、1日目、8日目、15日目、22日目のスケジュールで、次の周期が43日目に開始するような休薬スケジュールをとまって、または1日目、15日目及び29日目に、次の周期が43日目に開始するような休薬スケジュールを伴って、投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0329】

他の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者に、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）を、（例えば、癌、例えば結腸癌を治療するために）指定用量のシスプラチンと組み合わせて投与することを提供する。例えば、いくつかの実施形態において、シスプラチンは、約 4.0 mg/kg もしくは 6.0 mg/kg （例えば、マウスに）、またはこれらの値のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。シスプラチンはまた、約 0.33 mg/kg もしくは 0.49 mg/kg （例えば、ヒトに）、またはこれらの値のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与され得る。したがって、いくつかの実施形態において、シスプラチンは、約 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.2 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.3 \sim 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.4 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 、もしくは $0.5 \sim 0.6 \text{ mg/kg}$ 、またはこれらの下限及び／または上限のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で投与され得る。投与のタイミングもまた、単位時間当たりの用量を計算する際に考慮され得る。例えば、いくつかの実施形態において、シスプラチンは、（例えば、マウスに）毎週1回 4.0 mg/kg 、すなわち、 0.57 mg/kg/day ；2週間に1回 4.0 mg/kg 、すなわち 0.29 mg/kg/day ；毎週1回 6.0 mg/kg 、すなわち 0.86 mg/kg/day ；もしくは2週間に1回 6.0 mg/kg 、すなわち 0.43 mg/kg/day 、またはこれらの値のいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。ある特定の実施形態において、シスプラチンは、（例えば、ヒトに）毎週1回 0.33 mg/kg 、すなわち 0.046 mg/kg/day ；2週間に1回 0.33 mg/kg 、すなわち 0.023 mg/kg/day ；毎週1回 0.49 mg/kg 、すなわち 0.070 mg/kg/day ；もしくは2週間に1回 0.49 mg/kg 、すなわち 0.035 mg/kg/day 、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。したがって、いくつかの実施形態において、シスプラチンは、約 $0.01 \sim 0.08 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.01 \sim 0.02 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.2 \sim 0.4 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.4 \sim 0.6 \text{ mg/kg/day}$ 、 $0.2 \sim 0.6 \text{ mg/kg/day}$ 、もしくは $0.06 \sim 0.08 \text{ mg/kg/day}$ 、またはこれらの下限及び／もしくは上限のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で投与される。いくつかの実施形態において、シスプラチンは、 $30 \text{ mg/m}^2 \sim 120 \text{ mg/m}^2$ 、例えば、 $30 \sim 100 \text{ mg/m}^2$ 、 $40 \sim$

70 mg/m²、50～70 mg/m²、100 mg/m²未満、またはこれらの下限及び／もしくは上限のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で、場合によっては、3週間に1回または1カ月に1回のスケジュールで投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a)相乗性、(c)投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f)もしくはDNA損傷剤(h)に対する腫瘍耐性への効果、または(i)治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0330】

他の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者に、免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式(I-5)による免疫複合体）を、（例えば、癌、例えば結腸癌を治療するために）指定用量の5-FU（5-FU）と組み合わせることを提供する。例えば、いくつかの実施形態において、5-FUは、約15 mg/kgもしくは25 mg/kg（例えば、マウスに）、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。5-FUはまた、約1.2 mg/kgもしくは2.0 mg/kg（例えば、ヒトに）、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与され得る。したがって、いくつかの実施形態において、5-FUは、約0.8～2.4 mg/kg/日、0.8～1.0 mg/kg、1.0～1.2 mg/kg、1.2～1.4 mg/kg、1.0～1.4 mg/kg、1.4～1.6 mg/kg、1.6～1.8 mg/kg、1.8～2.0 mg/kg、2.0～2.2 mg/kg、1.8～2.2 mg/kg、もしくは2.2～2.4 mg/kg、またはこれらの下限及び／もしくは上限のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で投与される。投与のタイミングもまた、単位時間当たりの用量を計算する際に考慮され得る。例えば、いくつかの実施形態において、5-FUは、（例えば、マウスに）3日投薬／4日休薬の投薬スケジュールにおいて15 mg/kg、すなわち6.4 mg/kg/日、または3日投薬／4日休薬の投薬スケジュールにおいて25 mg/kg、例えば、10.7 mg/kg/日、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。ある特定の実施形態において、5-FUは、（例えば、ヒトに）3日投薬／4日休薬の投薬スケジュールにおいて1.2 mg/kg、すなわち0.51 mg/kg/日、または3日投薬／4日休薬の投薬スケジュールにおいて2.0 mg/kg、例えば、0.86 mg/kg/日、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。したがって、いくつかの実施形態において、5-FUは、0.3～0.5 mg/kg/日、0.5～0.7 mg/kg/日、0.7～0.9 mg/kg/日、0.9～1.1 mg/kg/日、0.4～0.6 mg/kg/日、0.7～1.0 mg/kg/日、もしくは0.3～1.1 mg/kg/日、またはこれらの下限及び／もしくは上限のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で投与される。いくつかの実施形態において、5-FUは、3～12 mg/kg、例えば、3～9 mg/kg、例えば、3～6 mg/kg、例えば、6 mg/kg未満、またはこれらの下限及び／もしくは上限のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で、場合によっては、4日間投薬した後、6日目、8日目、10日目、及び12日目に追加の投与が行われるスケジュールで、投与される。いくつかの実施形態において、5-FUは、200 mg/m²～700 mg/m²、例えば、200～600 mg/m²、300～600 mg/m²、300～500 mg/m²、600もしくは500 mg/m²未満、またはこれらの下限及び／もしくは上限のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で、場合によっては、1日目、8日目、15日目、及び29日目のスケジュールで、次の週が43日目に開始されるように休薬スケジュールを伴って、または1日目、2日目、14日目、15日目、29日目、及び30日目に、次の周期が43日目に開始するように休薬スケジュールを伴って、投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（

a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f) もしくはDNA損傷剤(h) に対する腫瘍耐性への効果、または(i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0331】

他の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者に、免疫複合体(例えば、任意に表5のCDRを含む式(I-5)による免疫複合体)を、(例えば、癌、例えば膵臓癌を治療するために) 指定用量のゲムシタビンと組み合わせて投与することを提供する。例えば、いくつかの実施形態において、ゲムシタビンは、例えば、マウスに、約15mg/kgもしくは20mg/kg、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、ゲムシタビンは、例えば、ヒトに、約1.2mg/kgもしくは1.6mg/kg、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。したがって、いくつかの実施形態において、ゲムシタビンは、約0.8~2.0mg/kg、0.8~1.0mg/kg、1.0~1.2mg/kg、1.2~1.4mg/kg、1.0~1.4mg/kg、1.4~1.6mg/kg、1.6~1.8mg/kg、1.4~1.8mg/kg、もしくは1.8~2.0mg/kg、またはこれらの下限及び/もしくは上限のうちのいずれかの±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で投与される。投与のタイミングもまた、単位時間当たりの用量を計算する際に考慮され得る。例えば、いくつかの実施形態において、ゲムシタビンは、(例えば、マウスに)、1週間に2回15mg/kg、すなわち4.3mg/kg/日、または1週間に2回20mg/kg、すなわち5.7mg/kg/日、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で投与される。ゲムシタビンはまた、例えば、ヒトに、1週間に2回1.2mg/kg、すなわち0.34mg/kg/日、または1週間に2回1.6mg/kg、すなわち0.48mg/kg/日、またはこれらの値のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の投薬量範囲で投与される。いくつかの実施形態において、ゲムシチビン(gemcitabine)は、700~1300mg/m²、例えば、800~1250mg/m²、例えば、800~1000mg/m²、例えば、1000mg/m²未満、またはこれらの下限及び/もしくは上限のうちのいずれか±10%、20%、30%、40%、もしくは50%の用量で、場合によっては、1週間に1回7週間の後、1週間の休薬スケジュールが続き、場合によってはその後に1週間に1回で3週間の周期が続く、スケジュールで、投与される。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、(a) 相乗性、(c) 投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体(f) もしくはDNA損傷剤(h) に対する腫瘍耐性への効果、または(i) 治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0332】

DNA損傷剤の好適な投薬量は、日中または夜間の任意の時間に投与され得ることを理解されたい。いくつかの実施形態において、DNA損傷剤の好適な投薬量は、朝に投与される。いくつかの他の実施形態において、DNA損傷剤の好適な投薬量は、夕方に投与される。いくつかの他の実施形態において、DNA損傷剤の好適な投薬量は、朝及び夕方の両方に投与される。

【0333】

いくつかの実施形態において、DNA損傷剤の第1の量が投与される第1の治療期間の後に、同じかまたは異なるDNA損傷剤の同じかまたは異なる量が投与される別の治療期間が続き得る。広範な種類の治療剤は、本発明による免疫複合体とDNA損傷剤との組み

合わせと組み合わせて、治療的に関連する付加利益を有し得る。本明細書に記載される免疫複合体及びDNA損傷剤を、1つ以上の他の治療剤とともに含む組み合わせ治療を用いて、例えば、：1）本発明の方法及び／もしくは1つ以上の他の治療剤の治療効果（複数可）を強化することができる；2）本発明の方法及び／もしくは1つ以上の治療剤によって示される副作用を低減させることができる；ならびに／または3）免疫複合体及びDNA損傷剤ならびに／または1つ以上の他の治療剤の有効用量を低減させることができる。例えば、そのような治療剤は、本明細書に記載される免疫複合体及びDNA損傷剤と組み合わせて、望ましくない細胞成長、例えば、望ましくない良性状態もしくは腫瘍成長をもたらす不適切な細胞成長を阻害することができる。いくつかの実施形態において、治療は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を
10
終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす。

【0334】

本明細書に記載される免疫複合体及びDNA損傷剤とのさらなる組み合わせで使用され得る治療剤の例としては、抗増殖剤、抗癌剤、抗生剤、ホルモン剤、植物由来の薬物、及び生物剤が挙げられるがこれらに限定されない。

【0335】

抗生剤は、天然産物の修飾形として抗生物質に類似の様式で産生される薬物群である。抗生剤の例としては、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、
20
エピルビシン、イダルビシン、及びアントラセンジオン）、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、プリカトマイシン（plicatomycin）が挙げられるがこれらに限定されない。これらの抗生剤は、異なる細胞成分を標的とすることによって細胞成長を遮断する。例えば、アントラサイクリンは、一般に、転写的に活性なDNAの領域内におけるDNAトポイソメラーゼIIの作用を遮断し、これが、DNA鎖の切断をもたらすとかんがえられる。ブレオマイシンは、一般に、鉄をキレート化し、活性化された複合体を形成し、これが、次いで、DNAの塩基に結合し、鎖の切断及び細胞死をもたらす。免疫複合体及びDNA損傷剤に加えて、抗生剤を含む組み合わせ治療は、癌に対して治療上の相乗効果を有し、これらの化学療法剤と関連する副作用を低減させ得る。

【0336】

ホルモン剤は、それらの標的器官の成長及び発達を制御する薬物群である。ホルモン剤のほとんどが、性ステロイドならびにその誘導体及び類似体、例えば、エストロゲン、アンドロゲン、及びプロゲステンである。これらのホルモン剤は、受容体発現及び生存遺伝子の転写を下方制御するための性ステロイドの受容体のアンタゴニストとして機能し得る。そのようなホルモン剤の例は、合成エストロゲン薬（例えば、ジエチルスチベストロール（diethylstilbestrol））、抗エストロゲン薬（例えば、タモキシフェン、トレミフェン、フルオキシメステロール（fluoxymesterol）、及び
40
ラロキシフェン）、抗アンドロゲン薬（ビカルタミド、ニルタミド、及びフルタミド）、アロマターゼ阻害剤（例えば、アミノグルテチミド、アナストロゾール、及びテトラゾール）、ケトコナゾール、酢酸ゴセレリン、ロイプロリド、酢酸メゲストロール、及びミフェプリストンである。免疫複合体及びDNA損傷剤に加えてホルモン剤を含む組み合わせ治療は、癌に対する治療上の相乗効果を有し、これらの化学療法剤と関連する副作用を低減させ得る。

【0337】

植物由来の薬物は、植物に由来するか、または薬剤の化学構造に基づいて修飾される、薬物群である。植物由来の薬物の例としては、ビンカアルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビンゾリジン（vinzolidine）、及び
50
ビノレルビン）、ポドフィロトキシン（例えば、エトポシド（VP-16）及びテニポシド（VM-26））、ならびにタキサン（例えば、パクリタキセル及びドセタキセル）が挙げられるがこれらに限定されない。これらの植物由来の薬剤は、一般に、チューブリンに

結合し、有糸分裂を阻害する、抗有糸分裂剤として作用する。エトポシド等のポドフィロトキシンは、トポイソメラーゼⅠと相互作用することによってDNA合成を遮断し、DNA鎖の切断をもたらすと考えられる。免疫複合体及びDNA損傷剤に加えて、植物由来の薬剤を含む組み合わせ治療は、癌に対して治療上の相乗効果を有し、これらの化学療法剤と関連する副作用を低減させ得る。

【0338】

生物剤は、単独または化学療法もしくは放射線両方と組み合わせて使用した場合に、癌／腫瘍退縮を誘起する生体分子の群である。生物剤の例としては、免疫調節タンパク質、例えば、サイトカイン、腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体、腫瘍抑制遺伝子、及び癌ワクチンが挙げられるがこれらに限定されない。免疫複合体及びDNA損傷剤に加えて、生物剤を含む組み合わせ治療は、癌に対する治療上の相乗効果を有し、腫瘍発生シグナルに対する患者の免疫応答を強化し、この化学療法薬と関連する可能性のある副作用を低減させ得る。

【0339】

別の態様において、本発明は、医薬品の製造における本明細書に記載される抗GCC免疫複合体（例えば、任意に表5のCDRを有するAbを含む式（I-5）による免疫複合体）のDNA損傷剤と組み合わせた使用を特徴とする。ある実施形態において、医薬品は、癌、例えば、消化器癌、例えば、原発性または転移性の結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、または食道癌の治療に有用である。いくつかの実施形態において、医薬品は、表1～6に要約される1つ以上の特徴を有する抗GCC抗体分子を含む。いくつかの実施形態において、医薬品は、5F9抗体分子を含む。いくつかの実施形態において、医薬品は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす特徴を有する。

【0340】

いくつかの態様において、本発明は、DNA損傷剤をさらに含有する医薬品の製造における、表1～6に要約される1つ以上の特徴を有する抗GCC抗体分子を含む免疫複合体の使用を特徴とする。そのような医薬品は、消化器癌、例えば、結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、または食道癌を含むがこれらに限定されない、癌の治療に有用である。一実施形態において、医薬品のうちの免疫複合体は、式（I-5）によって特徴付けられ、式中、Abは、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体分子であり、mは約4であり、医薬品のうちのDNA損傷剤は、トポイソメラーゼⅠ阻害剤、例えばイリノテカンである。別の実施形態において、医薬品のうちの免疫複合体は、式（I-5）によって特徴付けられ、式中、Abは、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体分子であり、mは約4であり、医薬品のうちのDNA損傷剤は、アントラサイクリン、例えばシスプラチンまたはオキサリプラチンである。さらに別の実施形態において、医薬品のうちの免疫複合体は、式（I-5）によって特徴付けられ、式中、Abは、本明細書に記載される抗GCC抗体分子、例えば、5F9抗体分子であり、mは約4であり、医薬品のうちのDNA損傷剤は、抗代謝剤、例えばゲムシタビンである。いくつかの実施形態において、医薬品は、本明細書のリスト1からの1つ以上の治療効果、例えば、（a）相乗性、（c）投与を終了した後の腫瘍再成長の予防、免疫複合体（f）もしくはDNA損傷剤（h）に対する腫瘍耐性への効果、または（i）治療薬を投与した後の腫瘍成長阻害のうちの1つ以上をもたらす特徴を有する。

【0341】

腫瘍のGCC発現及び／または抗GCC免疫複合体感受性に基づく抗GCC療法の調整

本明細書に記載される方法は、GCCを発現する癌に使用することができる。いくつかの実施形態において、本方法は、例えば、GCCに結合する抗GCC抗体、例えば、標識された抗GCC抗体、またはリガンド、例えば、ペプチドリガンド、例えば、標識されたペプチドリガンドを使用して、例えば、生体試料中のGCCの存在を検出するか、または

対象におけるG C Cの存在もしくは分布を検出するために、G C Cの存在を検出することを含み得る。本明細書に使用される「検出する」という用語には、定量的または定性的検出が包含される。G C CまたはG C Cタンパク質を検出するとは、本明細書に使用される
とき、検出抗G C C抗体分子またはG C C結合リガンドが結合するエピトープを含む、イン
タクトなG C Cタンパク質を検出すること、またはG C Cタンパク質の部分を検出する
ことを意味する。いくつかの実施形態において、本方法は、標的腫瘍上のG C Cのレベル
を検出することを含み、抗腫瘍療法は、検出ステップの結果に基づいて選択される。いく
つかの実施形態において、本方法は、対象におけるG C C発現レベルに関する情報を取得
し、その情報に基づいて抗腫瘍療法を選択することを含む。いくつかの実施形態において
、本方法は、G C Cを発現する癌を有する対象を治療することを含む。腫瘍上のG C C発
現を検出するための抗G C C抗体の使用に関するさらなる詳細は、国際出願第W O 2 0 1
3 / 1 6 3 6 3 3号に見出され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる
。

【0342】

いくつかの実施形態において、腫瘍上のG C C発現を検出するために使用される抗体は
、本明細書の表22のV HもしくはV L配列を有する抗体、または本明細書の表22のV
HもしくはV L配列内の1つ以上の（例えば、6つの）C D R、例えば、本明細書の表2
4に記載されるC D Rを有する抗体である。例えば、抗体は、抗G C Cウサギm A b M
I L-44-148-2またはその一部分を含み得る。

【0343】

したがって、別の態様において、本方法は、G C Cタンパク質を検出すること、例えば
、G C C発現細胞もしくは組織、例えば、腫瘍細胞、またはG C Cを発現する腫瘍保持細
胞を検出することを含み得る。本方法は、材料、例えば、細胞または組織、例えば、G C
Cを発現する腫瘍の試料と、抗G C C抗体分子、例えば、本明細書に記載される抗G C C
抗体分子またはG C C結合リガンドとを、抗G C C抗体分子またはリガンドとG C Cタン
パク質との間で複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、ならびに抗体分子ま
たはリガンドとG C Cタンパク質との間の複合体形成を検出して、それによってG C Cタ
ンパク質の存在を検出する、例えば、G C C発現細胞または腫瘍を検出することを含む。

【0344】

ある特定の実施形態において、組織には、他の組織、例えば、B細胞及び／またはB細
胞関連組織等の他の組織と比較してより高いレベルでG C Cを発現する正常及び／または
癌性組織が含まれる。

【0345】

別の態様において、本明細書に記載される方法は、インビトロで（例えば、対象由来の
腫瘍組織に由来する組織生検といった、生物学的試料において）またはインビボで（例
えば、対象におけるインビボ撮像によって）G C Cタンパク質の存在を検出することを含
み得る。本方法は、（i）試料を、抗G C C抗体分子もしくはG C C結合リガンドと接触さ
せること、または抗G C C抗体分子もしくはG C C結合リガンドを対象に投与すること、
及び（i i）抗G C C抗体分子またはリガンドとG C Cタンパク質との間の複合体形成を
検出することを含む。複合体形成は、G C Cの存在またはレベルを示す。本方法は、任意
で、例えば、以下に記載されるように、D N A損傷剤と組み合わせた、本明細書に記載さ
れる免疫複合体を用いて対象を治療することをさらに含む。

【0346】

実施形態において、試料または対象において検出された複合体のレベルを、参照値、例
えば、複合体形成の値またはG C Cのレベルと比較する。ある実施形態において、参照値
を上回るG C Cの値はG C C媒介性障害を示し、医師を、本明細書に記載される免疫複合
体を用いた好適な治療レジメンへと導く。

【0347】

ある実施形態において、本方法は、参照試料、例えば、対照試料（例えば、対照生体試
料、例えば、血漿、組織、生検）または対照対象）を、抗G C C抗体分子またはG C C結

合リガンドと接触させ、それにおいて検出される複合体のレベルを、試料もしくは対象において検出されたレベルと比較することを含む。

【0348】

対象または試料におけるG C C抗原密度は、高度、比較的高度、中等度、または低度（降順）として分類され得る。G C C抗原密度は、任意の好適な方法によって測定され得る。例えば、Hスコア法が使用され得、この方法は、以下の段落及び国際出願第WO／2013／163633号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される。別の例として、患者の腫瘍のうちの1つ以上におけるG C C抗原密度は、インビボ検出方法によって、例えば、検出可能な標識に複合体化された抗G C C抗体を投与し、MRI等の撮像システムを用いてその複合体を検出することによって、判定することができる。ある特定の実施形態において、試料または対象において検出された抗原密度は、例えば、本明細書の実施例3及び5に記載されるような、半定量IHCスコアシステムを使用して記載される。例えば、いくつかの実施形態において、4+のIHCスコアは、高度なG C C抗原密度として分類され、2～3+のIHCスコアは、比較的高度なG C C抗原密度として分類され、2+のIHCスコアは、中等度のG C C抗原密度として分類され、1+のIHCスコアは、低度のG C C抗原密度として分類される。他の方法もまた、対象または試料におけるG C C抗原密度を判定するために使用できることを理解されたい。

【0349】

Hスコアを計算するために、染色が、以下のように行われ得る。試料を、抗G C C抗体とともに一晚インキュベートする。この手順は、TechMate 500またはTechMate 1000（Roche Diagnostics）を使用して完全に自動化されてもよい。染色した後、スライドを、アルコール系を通して無水エタノールまで脱水した後、キシレンですすぐ。スライドを、カバーガラス及びCyto Sealで恒久的に密封する。スライドを顕微鏡下で調べて染色を評価する。陽性染色は、茶色（DAB-HRP）の反応生成物の存在によって示される。ヘマトキシリンでの対比染色は、細胞及び組織の形態学を評価するための青色の核染色をもたらす。

【0350】

Hスコア法は、以下のように染色細胞に行われ得る。0～3+の範囲の染色強度を有する腫瘍内の細胞のパーセンテージ（0～100）が提供される。例えば、0、0.5、1、2、及び3の強度でスコアが提供される。マーカーに応じて、0.5の染色は、陽性または陰性としてスコア付けされ得、軽度だが認知できる、マーカーの染色を反映する。Hスコアを得るためには、腫瘍細胞のパーセンテージに各強度を乗じ、一緒に加算する。

【0351】

$Hスコア = (腫瘍\% \times 1) + (腫瘍\% \times 2) + (腫瘍\% \times 3)$ 。例えば、腫瘍が、20%陰性（0）、30%+1、10%+2、40%+3である場合、170のHスコアが得られるであろう。

【0352】

腫瘍細胞の100%が3+強度を有する場合、細胞内局所化（すなわち、頂端または細胞質）当たりの最大Hスコアは300（100%×3）である。いくつかの実施形態において、例えば、対照として、総Hスコアは単独では試料の比較には使用されないが、各強度における細胞のパーセンテージの内訳の確認に加えて、評価される。例えば、90のスコアは、腫瘍細胞の90%が1+強度で染色されているか、細胞の30%が3+強度で染色されていることを表し得る。これらの試料は、同じHスコアを有するが、G C C発現は大きく異なる。各強度にスコア付けされる細胞のパーセンテージは多様であり得るが通常は10%の増分でスコア付けされるが、しかしながら、単一の成分のわずかな比率のスコア付けは、何らかのレベルの染色が存在することを示すためには、同様に1%～5%と推定され得る。G C Cについては、頂端染色は、1及び5%等の低いレベルの増分で評価することが考慮され得る。

【0353】

異なる細胞内局在化は、Hスコアを用いてG C Cに関してスコア付けすることができる

。これらには、細胞質染色及び頂端関連染色が含まれる。細胞質染色パターンは、一般に、腫瘍細胞の細胞質全体に広がる拡散として観察される。しかしながら、いくつかの事例においては細胞質染色の変化形が存在し、これには、強力な球状染色または点状染色、粗い粒状の染色が挙げられる。強力な粒状染色は、3+の細胞質染色としてスコア付けされ得る。点状染色は、頂端染色と関連し、この種類の細胞質染色には別個のスコアは与えられない。GCC頂端染色は、内腔が存在する場合に観察される。観察される他のGCC染色パターンには、膜様、非内腔染色（1例）及び腫瘍内腔に存在する細胞外染色が含まれる。正常な結腸組織では、染色は、一般に、拡散した細胞質染色を伴って頂端側である。

【0354】

Hスコアは、細胞質及び頂端側の両方のGCC発現に対して得ることができるため、すべてのデータを捕捉してもよく、いくつかの事例では、頂端及び細胞質の両方のGCC発現の合計を使用して、集合的なHスコアを生成してもよい。そのような事例では、最大Hスコアは、集合的スコアの600となる（頂端300+細胞質300）。

【0355】

ある実施形態において、対象由来の試料または対象におけるGCCのレベルは、参照レベル、例えば、対照材料、例えば、対象の細胞と同じ組織起源の正常細胞、またはそのような正常細胞と同程度のレベルのGCCを有する細胞におけるGCCのレベルと比較される。本方法は、例えば、検出されたGCCレベルに応答して、障害の診断、予後、その治療の有効性の評価、またはその段階付けを提供することを含み得る。対照材料と比較して、試料または対象におけるより高いレベルのGCCは、GCCの発現の上昇と関連する障害の存在を示す。対照材料と比較して、試料または対象におけるより高いレベルのGCCはまた、疾患の治療の有効性の相対的欠如、比較的不良な予後、または疾患の後期であることを示し得る。GCCのレベルはまた、今後の治療、例えば、より積極的かもしくはあまり積極的でない治療の必要性、または1つの治療レジメンから別のものへ切り替える必要性の評価または選択を行うために使用され得る。

【0356】

GCCのレベルはまた、患者の選択または評価に使用され得る。

【0357】

表5のCDRを有するAbを含む抗GCC免疫複合体（例えば、免疫複合体（I-5））に対する腫瘍の応答性は、治療する医師が適切な抗腫瘍療法、例えば、例として表5のCDRを有するAbを含む免疫複合体（I-5）を、DNA損傷剤と組み合わせて用いる治療を決定することを導き得る。本明細書の実施例5は、免疫複合体治療に対する腫瘍の応答性を測定する方法を開示し、本明細書の実施例6は、抗GCC免疫複合体に対する様々な程度の感受性を有する腫瘍の適切な治療様式を開示する。

【0358】

所与の治療薬（例えば、免疫複合体またはDNA損傷剤）に対する腫瘍または癌細胞の感受性または耐性は、強力、中等度から強力、中等度、または耐性（降順）として分類され得る。感受性は、任意の好適な方法によって決定され得る。例えば、いくつかの実施形態において、「強力な抗腫瘍活性」または「強力な感受性」とは、本明細書の実施例5に示されるように、少なくとも、おおよそでPHTX-09c細胞を5F9 v c MMAEで処置した際に観察される抗腫瘍活性のレベルを指し、「中等度から強力な」抗腫瘍活性または感受性とは、おおよそで、PHTX-21c細胞を5F9 v c MMAEで処置した際に観察される抗腫瘍活性のレベルを指し、「中等度の抗腫瘍活性」または「中等度の感受性」とは、おおよそで、PHTX-17c細胞を5F9 v c MMAEで処置した際に観察される抗腫瘍活性のレベルを指し、「耐性」とは、おおよそで、PHTX-11c細胞を5F9 v c MMAEで処置した際に観察される抗腫瘍活性のレベルか、またはそれよりも低い物を指す。別の例として、薬物感受性は、目的の薬物を、関連癌細胞（例えば、癌患者の腫瘍から生検を取った細胞）に投与して、細胞毒性活性を判定する、細胞培養アッセイを用いて判定され得る。さらに別の例として、治療剤に対する腫瘍感受性は、その薬剤に対する対象の応答性を監視することによって、例えば、患者がその薬剤での治

療を受けている間に異なる時点で腫瘍寸法を視覚化することによって、判定され得る。免疫複合体またはDNA損傷剤に対する対象または試料の感受性を判定するために、他の方法もまた使用され得ることを理解されたい。

【0359】

いくつかの態様において、本開示は、感受性（例えば、強力な感受性、強力から中等度の感受性、中等度の感受性、または耐性）を特定するために、抗GCC治療（例えば、（I-5）の免疫複合体）に対する感受性に関して腫瘍を試験する方法を提供する。

【0360】

例えば、実施形態において、腫瘍細胞が多量のGCCをその表面に発現する患者は、薬物と複合体化した抗GCC抗体分子での治療の良好な候補と考えられる。実施形態において、腫瘍細胞が少量のGCCをその表面に発現する患者は、抗GCC抗体分子と追加の治療方法、例えば、DNA損傷剤との組み合わせの候補であり得る。別の例において、抗GCC抗体分子の用量は、腫瘍細胞の表面に発現するGCC分子の数を反映して調節され得る。多量のGCC分子を腫瘍細胞表面に有する患者は、少量のGCC分子を有する患者よりも低い用量で治療され得る。GCC発現腫瘍細胞の存在をインビボで検出することは、一次GCC発現腫瘍が転移した組織の特定を可能にし得る。どの組織が転移を有するかの認識は、標的化された腫瘍治療の適用をもたらし得る。

【0361】

上述のように、抗GCC抗体分子及びGCC結合リガンドは、正常組織と悪性腫瘍組織におけるGCCタンパク質の存在の評価を可能にし、それを通じて、疾患の存在もしくは重症度、疾患進行、及び／または治療の有効性を評価することができる。例えば、治療（例えば、（I-5）等の免疫複合体をDNA損傷剤と組み合わせた治療）を監視し、有効性を評価することができる。一実施例において、GCCタンパク質は、細胞増殖性疾患（例えば、結腸癌、胃癌、及び食道癌）を有する対象から得られた第1の試料において検出及び／または測定され得、治療が開始され得る。その後、第2の試料を対象から得、試料中のGCCタンパク質が、検出及び／または測定され得る。第2の試料で検出または測定されるGCCタンパク質の量の減少は、治療の有効性を示す。

【0362】

抗GCC抗体配列

抗GCC抗体を、実施例でより詳細に考察されるように、いくつかの方法によって生成した。「5F9」と指定される1つの具体的な抗GCC抗体を、まず、Abgenix XENOMOUSEトランスジェニック技術を用いて、完全ヒトIgG2抗体を生成するトランスジェニックマウスを使用して生成し、ハイブリドーマ技術を使用して単離した。（抗体5F9は、次いで、本明細書の実施例4に記載されるように、CHO細胞において産生された）。ヒトmAb Abx-229を、完全ヒトIgG2抗体を生成するトランスジェニックマウスを使用して生成した。単一の抗体を、Abgenix SLAM技術を使用して単離した。これらを使用して、完全ヒトIgG1抗体を作製した。GCCに対する抗体の特異性を、ELISA及びフローサイトメトリー（FCM）によって試験した。

【0363】

以下の表1は、抗体分子5F9を作製するために使用した方法、抗体を生成するために使用した免疫原、使用した動物、供給源、種、及びアイソタイプ単離物を要約する。

【0364】

【表1】

表1

Ab	免疫原	動物	供給源	種	アイソタイプ
5F9	TOK10 7-h Ig	Xenomouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2、k

【0365】

軽鎖及び重鎖可変領域の配列を決定した。(表2)。5F9抗GCC抗体の重鎖及び軽鎖のそれぞれの可変領域のアミノ酸及び核酸配列は、それぞれ、表3及び4に示される。5F9抗GCC抗体の重鎖及び軽鎖のCDRのそれぞれのアミノ酸及び核酸配列は、それぞれ、表5及び6に示される。

【0366】

CDRのシーケンシングにより、毒素複合体化部位として機能し得る豊富な残基の決定を可能にした。抗原結合領域内の非対合遊離システインは、オーリスタチン複合体化の部位であり得、リジンは、マイタンシン複合体化の部位であり得る。CDRのアミノ酸と毒素の複合体化は、GCCに対する抗体の結合親和性を変化させる懸念をもたらす。したがって、実施形態において、CDRは、治療剤と複合体化され得るアミノ酸を欠いている。

10

【0367】

【表2】

表2. モノクローナル抗体の可変領域の配列番号。

mAb	IgG鎖	NA配列番号	AA配列番号
5F9	重鎖	17	18
	軽鎖	19	20

【0368】

【表3】

表3. mAb可変領域のアミノ酸配列

mAb	Ig鎖	配列番号	アミノ酸配列
5F9	重鎖	18	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGG SFSGYYSWIRQPPGKGLEWIGEINHR GNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQFALK LSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDH WGQGTLVTVSS
	軽鎖	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ SVSRNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTR ATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSE DFAVYYCQQYKTPRTFGQGTNVEIK

30

【0369】

【表 4】

表 4. mAb 可変領域の核酸配列

	mAb	I g G 鎖	配列番号	核酸配列
9	5 F 9	重鎖	1 7	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAG GACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTC CCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCC TTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCC GCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAAC ACCAACGACAACCCGTCCTCAAGAGTC GAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCT GTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATT ACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGGCCAGGGA ACCCTGGTCAACCGTCTCCTCA
1 0	5 F 9	軽鎖	1 9	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCA CCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGC CACCCTCTCCTGCGAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGAAACTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT CATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACT GGAATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAT CGGCAGCCTGCGAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCT GGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAA CGTGGAAATCAAA

10

20

【0 3 7 0】

30

【表 5 - 1】

表 5 : CDR のアミノ酸配列

mAb	I g G 鎖	配列番号	アミノ酸配列
5 F 9	VH CDR 1	2 5	GYYSWS
5 F 9	VH CDR 2	2 6	E I N H R G N T N D N P S L K S
5 F 9	VH CDR 3	2 7	ERGYTYGNFDH
5 F 9	VL CDR 1	2 8	RASQSVSRNLA
5 F 9	VL CDR 2	2 9	GASTRAT

40

【表 5 - 2】

mAb	I g G鎖	配列番号	アミノ酸配列
5F9	VL CDR3	30	QQYKTPRT

【0371】

【表 6】

表 6. CDRの核酸配列

mAb	I g G鎖	配列番号	アミノ酸配列
5F9	VH CDR1	10	GGTTACTACTGGAGC
5F9	VH CDR2	11	GAAATCAATCATCGTGGAAACACC AACGACAACCCGTCCCTCAAG
5F9	VH CDR3	12	GAACGTGGATACACCTATGGTAAC TTTGACCAC
5F9	VL CDR1	13	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGA AACTTAGCC
5F9	VL CDR2	14	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
5F9	VL CDR3	15	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGG ACG

【0372】

mAb 5F9の重鎖及び軽鎖の両方のコード配列を含有する発現ベクターを上述のように作製した。

【0373】

本発明は、以下の実施例によって例証されるが、これらは、さらなる制限と見なされるものではない。

【実施例】

【0374】

実施例 1：抗 G C C 抗体の生成及び特徴付け

免疫付与及びスクリーニングのための G C C タンパク質の生成を、以下のように行った。以下の G C C 配列（シグナル配列及び細胞外ドメイン）を含む配列をコードする G C C 遺伝子の一部分を発現ベクターにサブクローニングすることによって、G C C 抗原を調製した。

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSNCHNGSYEISVL
MMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNA
TFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVL I
GPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRL
MSPARKLMYFLVNFWKTNLDLPFKTYSWSTS YVYKNGTETE
DCFWYLNAL EASVSYSFSELGFKVVL RQDKEFQDILMDHN
RKS NVIIMCGGPEFLYKLGKDR AEAEDIVIILVDL FNDQY
FEDNVTAPDYMKNV LVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKR D
FALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKF AHA FRNLTF
EGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVL LTYDTH
VNKTYPVDMSP TFTWKNSKL（配列番号 16）

【0375】

発現ベクター（pLKTOK107）は、G C C 配列と融合するための C 末端 I g G 1

Fc領域をもたらした。このベクターはIgG1ヒンジ、CH2及びCH3ドメインを有するエクソンを含み、CH1フラグメントから非対合システインを排除するように突然変異させた。このIgG1Fc領域を、リジン235及びグリシン237をアラニンでさらに突然変異させた。構築物を、SV40 T抗原の遺伝子をトランスフェクトしたヒト胎児由来腎臓（HEK）293細胞において、C末端ヒトIgG1 Fcに融合した分泌GCC配列（配列番号3のアミノ酸残基24～430）として、組み換えにより発現させた。TOK107-hIgと称されるタンパク質（別称hGCC-ECD/hIgG1 Fc、配列番号62）を、プロテインAクロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【0376】

マウスIgG2a膜貫通領域のC末端への融合を可能にするpLKTOK111等の発現ベクターに、上述の融合タンパク質をサブクローニングすることによって、GCC抗原もまた調製した。この構築物をCHO細胞において組み換えにより発現させると、GCC細胞外ドメインが、細胞表面で検出される。GCC-Ig融合タンパク質（配列番号61）の細胞表面発現は、pLKTOK111ベクターを、マウスCD79a（MB-1）及びCD79b（B29）を含むpLKTOK123とともにコトランスフェクトしたときに達成される。このトランスフェクションに由来するクローン#27（CHO-GCC#27）を、免疫原として使用した。HT-29-GCC#2細胞もまた、免疫原として使用した。

【0377】

ハイブリドーマ上清及び精製されたmAbのELISAによるスクリーニングについては、GCC融合構築物をコードする核酸を、pCMV1発現ベクター（Sigma）にクローニングした。精製タグ：FLAGタグ（N末端）及びHisタグ（C末端）を、同様に構築物にクローニングした。融合タンパク質構築物を293細胞にトランスフェクトし、発現させ、組み換えタンパク質を、抗FLAG（登録商標）M2アガロース親和性カラム（Sigma）で精製した。

【0378】

試薬及び細胞系。HEK293細胞、CHO、及びT84ヒト結腸癌細胞を、ATCCから入手し、ATCCのプロトコルに従って維持した。

【0379】

マウス：マウスハイブリドーマの生成のために4～6週齢の雌性C57BL/6マウスを、Taconic Farms, Inc.（Germantown, NY）から購入した。ヒトハイブリドーマの生成のためにヒトIgG2抗体を産生する4～6週齢まで社内で飼育したXenomiceを、Abgenix, Inc.（Fremont, CA）から入手した。すべての動物は、Institutional Animal Care and Use Committee of Millennium Pharmaceuticals, Inc.の指導書に従って入手し、維持した。

【0380】

細胞系：機能的アッセイに使用した細胞系は、GCCトランスフェクト細胞及びベクター対照HEK293もしくはHT29細胞の細胞対であった。HT29細胞に、EF-1αプロモーターまたは空のベクター（pLKTOK4）の制御下で全長GCCをトランスフェクトし、G418において選択した。これらの細胞におけるGCCは、STペプチド（1～18または5～18）と接触したときに、cGMP応答を有することが確認された。HEK293細胞は、CMVプロモーターまたは空のベクター（pN8mycSV40）の制御下で全長GCCをトランスフェクトし、プラスチジンにおいて選択した。これらの細胞におけるGCCは、mycタグを有する。最も高いGCC発現について選択されたクローンは、293-GCC#2、HT29-GCC#2、及びHT29-GCC#5であった。HT29-GCC#2もまた、抗GCC抗体分子を生成するための免疫原として使用した。追加のGCC発現細胞は、CT26細胞である。GCCを発現するCT26細胞系を開発するために、pTOK58Dベクターを使用した。全長GCCを、重鎖クロ

10

20

30

40

50

ーニングに通常使用される部位にクローニングし、ルシフェラーゼを、軽鎖クローニングに通常使用される部位にクローニングした。C T 2 6 細胞にトランスフェクトした後、G C C 及びルシフェラーゼの両方の独立した発現を確認した。G C C の表面発現を、5 F 9 抗体を使用したフローサイトメトリーによって確認した。クローン # 3 2 を、さらなる研究に選択した。

【0381】

T 8 4 結腸癌細胞系は、G C C を内在的に発現する。広範な細胞系パネルにおける G C C の T a q m a n 分析により、T 8 4 が、G C C の m R N A を発現する唯一の細胞系であったことが明らかとなった。T 8 4 細胞の細胞ペレットの G C C を G C C 選択的 m A b で染色することにより、有意な G C C タンパク質発現が示された。

10

【0382】

放射標識リガンド (S T 毒素) での G C C 受容体レベルの定量化は、2 9 3 - G C C # 2 細胞が、T 8 4 細胞よりも多くの G C C を発現し、一方で H T 2 9 - G C C # 2 または # 5 は、細胞 1 つ当たりで最も少ない G C C 分子を発現したことを示唆した。

【表 b】

細胞系	全細胞結合アッセイ (受容体/細胞)
HT-29-GCC # 2 / # 5	100,000
T84 内在性 GCC	300,000
293-GCC	600,000

【0383】

ヒト m A b の生成。遺伝子操作されたマウスである X E N O M O U S E (A b g e n i x, F r e m o n t, C A) (8 ~ 10 週齢) に、ヒトモノクローナル抗体の産生のために免疫付与を行った。M e n d e z e t a l. N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 (1997)、G r e e n a n d J a k o b o v i t s J. E x p. M e d. 1 8 8 : 4 8 3 - 4 9 5 (1998) を参照されたい。複数の免疫付与スキームを用いた。1 つのスキームにおいて、100 ミリグラムのヒト G C - C 細胞外ドメイン/ヒト I g 融合タンパク質 (T O K 1 0 7 - h I g) を、ダルベッコリン酸緩衝食塩水 (P B S, G I B C O, G r a n d I s l a n d, N Y) 中に懸濁させ、同量の完全フロイントアジュバント (S i g m a C h e m i c a l C o., S t. L o u i s, M O) で乳化させた。X E N O M O U S E (商標) に、皮下部位 3 箇所、尾の付け根、及び腹腔内部位 1 箇所へのエマルジョンの注射によって免疫付与を行った。最初の免疫付与の 14 日後に、マウスに、フロイント不完全アジュバント中の 50 μ g の T O K 1 0 7 - h I g で追加免疫付与を行った。血清試験により不十分な力価が示されたため、数週間の休止後、50 μ g のヒト T O K 1 0 7 - h I g で第 2 の追加免疫付与を行った。2 週間後に、少量の血液を尾静脈から採取し、T O K 1 0 7 - I g に対する血清活性を E L I S A によって滴定し、H T 2 9 - G C C # 2 細胞に対するものを F A C S によって滴定した。マウスは、それらの力価が E L I S A によって 1 : 2 4, 300 または F A C S によって 1 : 500 を超えた場合に融合に選択した。追加免疫のほぼ 3 カ月後に、マウスに、10⁷ の H T - 2 9 # 2 細胞で追加免疫付与を行い、翌日に 50 μ g の T O K 1 0 7 - h I g で追加免疫付与を行った (いずれもフロイント不完全アジュバント中)。このスキームで免疫付与したマウスは、5 F 9 及び 1 D 2 ヒト抗 G C C 抗体分子を産生した。このスキームで免疫付与したマウスは、5 F 9 及び 1 D 2 ヒト抗 G C C 抗体分子を産生した。

20

30

40

【0384】

4 日後に、融合のために、マウスを安楽死させ、脾臓細胞懸濁液を調製し、P B S で洗浄した。融合細胞を、非 G C C 抗原と比較したまたは I g G の F c 領域と比較した T O K 1 0 7 - h I g への結合については E L I S A によって、ベクター対照と比較したまた非 G C C 発現 M C F - 7 細胞と比較した T 8 4 細胞または H T - 2 9 クローン # 2 細胞への結合については F A C S によって、G C C に特異的に結合する抗体の産生に関して試験した。アイソタイプを、I g G または I g M 特異的二次抗体を使用して、E L I S A または F A C S を用いて判定した。このスキームで免疫付与したマウスは、5 F 9 ヒト抗 G C C

50

抗体分子を産生した。

【0385】

ヒトmAbを産生するハイブリドーマ：脾細胞を計数し、脾臓：黒色腫の比率2：1で、重鎖または軽鎖のいずれの免疫グロブリン鎖も分泌することができないSP 2/0骨髓腫細胞(ATCC番号CRL 8-006、Rockville, MD)と混合した。細胞を、標準的な手順に従って、HAT選択培地中、12個の96ウェル組織培養プレートにおいてポリエチレングリコール1450(ATCC)と融合した。融合の10～21日後に、ハイブリドーマコロニーが見えるようになり、培養上清を採取した後、ELISA及びFACSによってスクリーニングした。

【0386】

ELISAによるmAbの分析。高タンパク質結合96ウェルEIAプレート(Costar/Corning, Inc. Corning, NY)に、50µl/ウェルでTK107-hIgの2µg/ml溶液(0.1µg/ウェル)をコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。過剰な溶液を吸引し、プレートをPBS/0.05%Tween-20(3回)で洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン(BSA、画分V、Sigma Chemical Co., MO)を用いて室温で1時間ブロッキングして、非特異的結合を阻害した。BSA溶液を除去し、各融合プレートのウェルから50µl/ウェルのハイブリドーマ上清を添加した。プレートを、次いで、37℃で45分間インキュベートし、PBS/0.05%Tween-20で3回洗浄した。1%BSA/PBS中1：4000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と複合体化したヤギ抗マウスまたは抗ヒトIgG F(ab)2(H&L)(Jackson Research Laboratories, Inc., West Grove, PA)を、各ウェルに添加した後、プレートを37℃で45分間インキュベートした。洗浄した後、50µl/ウェルのABTS溶液(Zymed, South San Francisco, CA)を添加した。405nmでの陽性ウェルの緑色の強度を、Vmaxマイクロタイタープレートリーダー(Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA)で評価した。陽性の応答を示したすべてのハイブリドーマウェルを、次いで、24ウェル培養物に拡張し、限界希釈によってサブクロニングし、ELISA及びFACSによって分析した。最も良く産生する3つのサブクローンをさらに拡張させた。

【0387】

フローサイトメトリーによるmAbの分析。フローサイトメトリー(FACS)スクリーニングを、ELISAスクリーニングと並行して、すべての融合プレート上清に行った。HT-29クローン#2または非トランスフェクトHT-29細胞を、10%ウシ胎仔血清(GIBCO)を補充したDMEM(GIBCO)中で、T225フラスコ(Costar/Corning, Inc., Corning, NY)において成長させた。Versene(GIBCO)を使用して細胞をフラスコ表面から分離させ、DMEMで2回洗浄した後、1%BSA/PBS溶液で1回洗浄した。細胞を1%BSA/PBS中に再懸濁させ、 2×10^6 の細胞をV底96ウェルプレート(Costar)の各ウェルに添加し、2500 RPM(洗浄)で5分間遠心分離した。洗浄溶液を廃棄し、各融合プレートのウェルから50µl/ウェルの上清を添加した。プレート封止剤(Linbro/MP Biomedicals, LLC, Solon, OH)を適用し、プレートを、次いで、穏やかにボルテックスして、細胞を再懸濁させ、上清と混合し、4℃(氷上)で30分間インキュベートした。次いで、プレートを低温1%BSA/PBS(3回)で洗浄し、1：50に希釈した50µl/ウェルFITC複合体化ロバ抗マウスIgG F(ab)2(H&L)またはFITC複合体化ヤギ抗ヒトIgG F(ab)2(H&L)(Jackson)を、4℃(暗所で氷上)で30分間各ウェルに添加した。プレートを低温1%BSA/PBS中で再度3回洗浄し、低温1%パラホルムアルデヒド(Sigma)/PBS中に固定した。細胞をクラスター管(Costar)に移し、FACS caliberフローサイトメーター(Becton Dickinson, San Jose, CA)で分析した。陽性のシフトを示したすべてのハイブリドーマウェルを、次いで、

10

20

30

40

50

24 ウェル培養に拡張し、限界希釈によってサブクローニングした。

【0388】

内部移行アッセイ。抗GCC抗体分子の内部移行を、GCC発現細胞及びベクター対照細胞の両方において、免疫蛍光顕微鏡検査法を用いて試験した。細胞をカバーガラス上で成長させ、10分間氷上に置いた後、低温培養培地中、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体とともに氷上で20分間インキュベートした。内部移行のために、抗体含有培地を新しい培養培地と置き換え、細胞を2～3時間 37°C にシフトさせたか、または氷上で維持した。PBS中ですすぎ、室温で4%パラホルムアルデヒド中に短時間固定した後、細胞を0/5%TRITON X-100中で15分間透過処理した。試験細胞の局在化を、蛍光標識した抗IgG抗体を使用して、レーザー走査共焦点顕微鏡によって判定した。抗体分子は、氷上に置かれるとGCC発現細胞の細胞表面に局在化した。 37°C でインキュベートした後、5F9は、内部移行の指標である細胞膜内での点状染色を示した。ベクター細胞には内部移行は検出されなかった。

10

【0389】

抗GCC抗体分子の特性の要約表7は、5F9 mAbのインビトロ特性を要約する。(T84=ヒト結腸腫瘍細胞、MCF7=ヒト乳房腫瘍細胞、WB=ウエスタンブロット、IP=免疫沈降、IHC=免疫組織化学；T84細胞を用いた内部移行をMCF-7細胞と比較)。

【0390】

【表7】

20

表7. 抗GCC抗体分子の特性

Ab	ELISA		FACS							
	TOK107-hIg	TOK82-hIg	HT-29#2	HT-29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	内部移行
5F9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+

【0391】

さらに、5F9抗体分子を、それらがGCC発現細胞STペプチドに誘発されるカルシウムイオン流出を阻害する能力に関して試験した。cGMPアッセイを、抗GCC抗体分子の存在または不在下において、 50nM STの存在下でHT29-GCC#18細胞において行った。5F9によるカルシウムイオン流出の用量依存性阻害が存在した。

30

【0392】

抗GCC抗体分子の相対的親和性の推定5F9抗GCC抗体分子の相対的親和性(EC_{50} 、半最大結合の抗体濃度)を、TOK107-hIgに対するELISA測定及びGCC発現細胞でのFACS測定によって、推定した。以下の表は、結果を示す。

【0393】

【表8】

表8. 抗GCC抗体分子の EC_{50}

40

抗体	EC_{50} 、TOK107-hIg、M	EC_{50} 、細胞、M
5F9	3.65×10^{-8}	1.24×10^{-9}

【0394】

抗GCC抗体分子の親和性の測定。BIAcore (商標) T100システム (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用して、 22°C で抗GCC 5F9抗体の親和性を測定した。

【0395】

ステップ1: MAbs 5F9 (調製物A) を 10mM 酢酸ナトリウム、 $\text{pH}4.0$ 中2

50

0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、参照5F9 mAb（調製物B）を10 mM酢酸ナトリウム、pH 4.0中10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。各mAbを、標準的なアミンカップリングを使用して複数のCM4 BIA COREチップに固定化した。調製した各CM4チップについて、調製物A 5F9を、およそ75～100 RUで2つのフローセルに固定し、一方で調製物B 5F9は、およそ70～80 RUで1つのフローセルに固定した。各CM4チップの残りの4番目のフローセルは、参照フローセルとして使用した。

【0396】

ステップ2：GCC-ECD-Fc（TOK107-hIg）のストック濃度を、Pace et al. in Protein Science, 4:2411（1995）及びPace and Grimsley in Current Protocols in Protein Science 3.1.1-3.1.9（2003）に詳述される方法を使用して決定した。

10

【0397】

ステップ3：ステップ1に記載される各調製したCM4チップについて、GCC-ECD-Fcを202 nM～1.6 nM（2倍連続希釈）の濃度範囲で2分間注入した後、7分間解離させた。試料を、二重参照のために散在する複数の緩衝液注入サイクルで、無作為に三連に注入した。より有意な解離速度（off-rate）減衰データを得るために、3回の追加の101 nM GCC-ECD-Fcの注入及び3回の追加の緩衝液の注入を、2分間の注入及び4時間の解離時間で行った。100 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流量をすべての実験に使用し、すべての表面を、10 mMグリシン-HCl（pH 2.0）の20秒のパルスで再生させた。すべての試料を、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSAが添加されたHepes緩衝食塩水、0.005%ポリソルベート20、pH 7.4（HBS-P）である泳動緩衝液中で調製した。

20

【0398】

ステップ4：すべてのセンサグラム（時間に対する表面プラズモン共鳴のプロット）データを、Scrubber 2.0ソフトウェア（BioLogic Software, Campbell, Australia）で処理し、CLAMP（商標）ソフトウェア（Myszka and Morton Trends Biochem. Sci. 23:149-150（1998））を使用して、質量輸送計数 k_m についての項を含む1:1相互作用モデルに全体として当てはめた。

30

【0399】

mAb固定化レベルが十分に低く保たれ、したがってセンサグラムの大域分析から得られる R_{max} が各表面について少なくとも12 RUを下回る限りは、1:1モデルにより、データへの非常に良好な当てはめがもたらされた。ほとんどの場合において、2つの調製物A 5F9表面のうちの1つは、信頼できる動的測定には低すぎる R_{max} （2 RU未満）を有した。しかしながら、可能な限り、同じCM4チップ由来の調製物A 5F9に結合するGCC-ECD-Fcの2つのフローセルからのデータを、同時に当てはめた。より高い R_{max} （>12 RU）をもたらすmAb表面を調製した場合、センサグラムは、複雑な動態を明確に示し、したがって、1:1モデルはデータに良く当てはまらなかった。これは、GCC-ECD-Fcが二価構築物であり、固定化mAbのより高い表面密度は、GCC-ECD-Fcがその表面により強力に結合する確率を高める可能性が高いという事実のため、意外なことではない。この研究に報告された反復試験は、1:1相互作用モデルに良好に当てはまるデータのみを含む。調製物A 5F9及び調製物B参照mAbのすべての複製物についての結果として得られた K_D 定数及び速度定数を、それぞれ、表9及び表10に示す。

40

【0400】

【表 9】

表 9：固定化した調製物 A 5 F 9 mAb に対する G C C - F c 結合

複製物	R_{max} (RU)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
A	11	1.06×10^5	1.19×10^{-5}	112
B	8	1.20×10^5	1.10×10^{-5}	91.7
C	5	1.07×10^5	2.15×10^{-5}	201
D	9	1.22×10^5	1.11×10^{-5}	91.0
E	6, 4	9.64×10^4	1.77×10^{-5}	184
平均 (95%信頼区間)		$1.10 (0.13) \times 10^5$	$1.46 (0.59) \times 10^{-5}$	136 (65)

10

【0401】

【表 10】

表 10：固定化した調製物 B 5 F 9 mAb に対する G C C - F c 結合

複製物	R_{max} (RU)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
F	9	9.68×10^4	7.64×10^{-6}	78.9
G	8	1.20×10^5	1.24×10^{-5}	103
H	7	9.09×10^4	9.57×10^{-6}	105
I	12	1.21×10^5	1.54×10^{-5}	127
平均 (95%信頼区間)		$1.07 (0.25) \times 10^5$	$1.13 (0.54) \times 10^{-5}$	103 (31)

20

【0402】

抗体への毒素の複合体化

30

オーリスタチン。オーリスタチンによる複合体化は、公開されている手順（例えば、Doronina et al., Nature Biotech., 21:778-784 (2003)）を用いて行うことができる。一般に、オーリスタチンを、抗体鎖のシステインに連結させる。システインへの連結は、まず、抗体分子におけるジスルフィド結合の還元によって達成される。還元プロセスの制御により、還元を、必ずしもすべてではないが、いくつかの鎖間ジスルフィド結合に制限することを試みる。結果として、オーリスタチンは、遊離システインに結合することができる。複合体化反応の反応停止処理の後に、反応副生成物を除去し、緩衝液交換して所望される生成物を得る。

【0403】

簡単に述べると、7.6 mg/mL の抗 G C C 抗体分子を、37°C で事前に平衡化し、次いで、15% 体積量の 500 mM ホウ酸ナトリウム、pH 8.0 を添加して、pH を 7.5 ~ 8.0 に上昇させる。この溶液はまた、1 mM DTPA を含有する。抗 G C C 抗体分子 1 モル当たり 2.6 当量のトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）を添加し、37°C で攪拌することによって抗体を部分的に還元する。28 分後に、還元した抗 G C C 抗体分子の溶液を氷上に置き、次いで、DMSO 中の 20.5 mM 溶液として 4.8 ~ 4.9 モル当量（抗 G C C 抗体分子に対して）の薬物リンカー（例えば、mc-vc-MMAF または mc-vc-MMAE または mc-MMAF）で即座に処置する。追加の DMSO を導入して、混合物を 10 体積% DMSO にする。反応混合物を約 90 分間氷上で攪拌した後、5 倍モル過剰の N-アセチルシステイン（mc-vc-MMAF に対して）で処置する。複合体を、接線流濾過によって単離し、まず約 10 mg/mL に

40

50

濃縮した後、約10透析体積 (d i a v o l u m e) のPBSで透析濾過する。結果として得られる抗体薬物複合体は、抗体1つ当たり約4つの薬物-リンカー単位の平均薬物負荷量を有した。便宜上、以下の実施例及び添付の図において、オーリスタチン免疫複合体は、薬物負荷量に関係なく、次の略語形式で称される：「A b - v c - M M A F」は、m c - v c - M M A Fと複合体化した抗G C C抗体分子を指し、「A b - v c - M M A E」は、m c - v c - M M A Eと複合体化した抗G C C抗体分子を指し、「A b - m c - M M A F」は、m c - M M A Fと複合体化した抗G C C抗体分子を指す。特定の抗G C C抗体分子を含む免疫複合体は、同じ形式、例えば、例えば、5 F 9 - v c - M M A F、5 F 9 - v c - M M A E、及び5 F 9 - m c - M M A Fで言及される。

【0404】

抗体1つ当たり約2の薬物-リンカー単位の平均薬物負荷量を有する抗体薬物複合体を調製するために、プロトコル(上述)を、T C E Pの量を50%低減させることにより修正した。薬物リンカーの量もまた、50%低減させる。対応する抗体薬物複合体は、A b - v c - M M A F (2)と略される。

【0405】

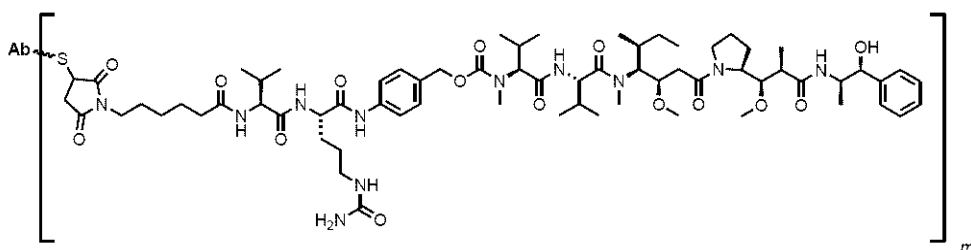
5 F 9 v c M M A E の調製

上述の一般方法に類似の方法を使用して、5 F 9 m A bを、本明細書に記載されるv c (V a l - C i t) リンカーを用いてM M A E (式 (X I I I)) と示されるオーリスタチン誘導体と複合体化して、5 F 9 v c M M A Eと称される免疫複合体を作製した。M M A E (S e a t t l e G e n e t i c s, I n c., B o t h e l l, W A) へのv c リンカーの複合体化は、以前に説明されているように達成した(例えば、米国第U S 2 0 0 6 / 0 0 7 4 0 0 8 号を参照されたい)。

【0406】

簡単に述べると、p H 5. 8で100mM酢酸中の5 F 9 m A bの17. 8m g / m L溶液を、0. 3M二塩基性リン酸ナトリウムでp H 8に調節し、11. 3m g / m lの最終m A b濃度を得た。次いで、反応混合物の最終濃度を1mMにするためにD T P Aを添加した。次いで、2. 28モル当量のT C E P (m A bのモルに対して)を添加することによってm A bを部分的に還元した後、37℃で1. 5時間攪拌した。次いで、部分的に還元したm A b溶液を4℃に冷却し、4. 4モル当量のv c M M A E (抗体のモル数に対して)をD M S O中の20. 3mMの溶液として添加した。混合物を22℃で30分間攪拌した後、5モル当量のN-アセチルシステイン(v c M M A Eに対して)を添加した後さらに15分間攪拌した。過剰な反応停止処理したv c M M A E及び他の反応成分を、10透析体積のPBS、p H 7. 4での免疫複体の限外濾過/透析濾過によって除去した。結果として得られた免疫複合体は、5 F 9 v c M M A Eと指定され、以下の式を有し、

【化23】



式中、A bは5 F 9 m A bであり、mは1~8である。平均薬物負荷量 (m) は、約3. 6である。複数の複合体を含む組成物において、抗体に結合するM M A E分子の平均数は3. 6である。

【0407】

細胞毒性アッセイ。標的発現細胞に結合し、内部移行し、それを殺滅させる能力を測定するために、細胞毒性アッセイを行った。このアッセイにおいて、種々の濃度の非複合体化一次抗G C C抗体及び固定した非毒性濃度のD M 1複合体化抗ヒトF c二次抗体(間接

的細胞毒性）とともに、または種々の濃度の毒素複合体化抗GCC mAb（直接的細胞毒性）とともに、細胞をインキュベートした。細胞生存率を、4日間のインキュベーションの後、WSTアッセイによって測定した。293-GCC#2細胞に対するヒト抗GCC抗体の相対的強度を、表8に示し、これは、DM1複合体化マウス抗ヒトIgG mAb（MAH-IgGは、クローンHP607（CRL1753、ATCC）から精製した）を用いて決定した。5F9及び229は、26及び78 pMのLD50を有する最も強力な抗GCC mAbである。ここには示されないが、誤差は、一般に、複製物の範囲または2を超える複製物の標準偏差によって測定すると、これらの平均の20%以内である。

【0408】

【表11】

表11. 293-GCC#2細胞に対する抗GCC抗体の細胞毒性アッセイ結果

抗GCC抗体	LD50 (pM)
5F9	26

【0409】

細胞表面結合。非複合体化5F9またはオーリスタチンに複合体化した5F9の結合を、フローサイトメトリーを使用して間接的免疫蛍光アッセイによって評価した。1×10⁶の細胞／ウェルを、V底96ウェルプレートに播種し、1～0.001 μg/mlの連続抗体希釈物とともに、氷上で1時間インキュベートした。細胞を氷冷PBS中において3% FBSで2回洗浄し、1:200のマウス抗ヒトPE IgG（Southern Biotech 2043-09）とともに氷上で1時間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、BD FACS Canto IIフローサイトメーターでフローサイトメトリーによって分析した。FACS Canto IIシステムソフトウェアを使用してデータを分析し、蛍光強度を決定した。

【0410】

GCC切断突然変異体への細胞表面結合。GCC ECDの切断突然変異体をおおよそ50のアミノ酸欠失増分を表すFLAGタグ構築物（pFLAG-CMV-3）として生成した（FL成熟ペプチド及び8つの切断体（Δ1～32、Δ1～49、Δ1～94、Δ1～128、Δ1～177、Δ1～226、Δ1～279、Δ1～229、及びΔ1～379）。構築物を、293細胞に発現させた後、抗GCC抗体分子による免疫沈降を行い、GCC ECD突然変異体をトランスフェクトした293細胞の溶解物におけるFLAGエピトープについてウエスタンブロットを行った。抗体5F9は、Δ1～32突然変異を有する細胞に結合するが、Δ1～49突然変異を有する細胞には結合しない。GCCへの5F9の結合は、タンパク質がアミノ酸33～50の間で切断されると失われ、この領域が、5F9によるGCC上のその結合エピトープの認識に関与することを示唆した。しかしながら、ラット及びマウスGCC配列は、この領域においてヒトGCCに同一であり、5F9は、マウスまたはラットGCCには結合しないため、5F9抗体は、ヒトGCCのアミノ酸33～50の存在によって形成される立体構造エピトープに結合する可能性が高い。

【0411】

実施例2. 毒素-リンカーの選択／ADCの特徴付け

抗体薬物複合体（ADC）戦略において、抗体への高度に強力な毒素の複合体化、毒素の細胞毒性は、標的特異的方式により腫瘍を対象とし、正常組織の抗原陰性細胞に影響を及ぼすことなく抗原を発現する腫瘍細胞に毒素を送達し、したがって、全身毒性を低減させることができる。オーリスタチン（ドラスタチン10の類似体）及びマイタンシンクラス毒素を、抗GCC mAbとのADCとして評価した。これらの毒素は、すべて、微小管重合の阻害剤であり、抗有糸分裂剤として作用する。細胞を遊離毒素と接触させる試験により、遊離毒素の細胞毒性が、GCC発現細胞とGCCを有さない対照細胞とを区別しなかったことを示した。これらの遊離毒素は、表12に示されるように、293-ベク

10

20

30

40

50

ター、293-GCC#2細胞に対して、HT29-ベクター対HT29-GCC#5細胞において、強力であった。

【0412】

【表12】

表12. 遊離毒素の細胞毒性

細胞系	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
	LD50	標準偏差	LD50	標準偏差	LD50	標準偏差	LD50	標準偏差
293ベクター	0.07	6	3.37	2.34	2.83	2.00	0.79	0.79
293GCC#2	4	3	2.07	1.48	2.96	2.23	0.83	1.03
HT29	4	1	5.21	1.91	2.69	1.09	0.57	0.27
HT29GCC#5	7	4	7.65	3.32	1.00	0.14	0.40	0.17

10

【0413】

異なる毒素を抗体に複合体化することによる化学的性質は異なり、リンカー安定性に影響を及ぼす。リンカー安定性は、腫瘍での薬物放出と対比して血中もしくは非標的組織における薬物放出に影響を及ぼすことによって、治療域に影響する。理想的なADCリンカーは、血中では高い安定性を有するが、標的媒介性細胞侵入時には効率的な放出を有する。

20

【0414】

オーリスタチン

3つのオーリスタチン-リンカー対を評価した。まずこれらの複合体をインビトロで評価した後、どの毒素-リンカーを大規模なインビボ研究に用いるかを決定するために、5F9を、vcMMAE、vcMMAF、及びmcMMAF（複合体当たり20mg）と複合体化させた。

【0415】

オーリスタチンは、天然産物ドラスタチン10に関連する合成毒素である。MMAE及びMMAFは、わずかに異なり、MMAFは、R2位置にカルボン酸基を有し、遊離毒素としての細胞透過性及び効力が低下している。MMAEは、Pgp薬物ポンプ基質であるが、MMAFはそうでない。

30

【0416】

オーリスタチンを、部分的抗体還元、マレイミド薬物誘導体との反応、過剰システインでの反応停止処理、濃縮、及びPBSへの緩衝液交換のプロセスによって、鎖間システインと複合体化させる。オーリスタチンを、細胞内取り込みの際に切断されるか、または非切断可能リンカーを有するカテプシンB感受性ジペプチドリinkerと結合させてもよい。

【0417】

vcモノメチルオーリスタチンリンカーにおいて、バリシトルリンジペプチド連結を、p-アミノベンジルカルバメート（PAB）基を通じて薬物に結合し、マレイミドカプロイル複合体化基を通じて抗体に結合させる。内部移行されると、ジペプチドリinkerが、リソソームプロテアーゼカテプシンBによって切断され、PAB基は自己破壊し、遊離毒素が放出される。このリンカーは、血清安定性を維持すると同時に、カテプシンBによる細胞内薬物放出を最大化するように設計された。

40

【0418】

オーリスタチンまた、ペプチダーゼ感受性リンカーを用いずにマレイミド複合体化基に直接結合したMMAF等の非切断可能リンカーを通じて抗体に連結されてもよい。MC複合体化ADCもまた、標的媒介性細胞殺滅に有効である。

【0419】

50

非切断可能オーリスタチン複合体の薬物放出機序は、リソソームでの一般的な抗体分解を通じたものであると見られる。LC/MS研究を通じて、Ab-mcMMAF複合体が、単一のシステイン付加物の形態で毒素を放出することが報告されている。

【0420】

抗体薬物複合体の結合

5F9抗体薬物複合体のすべてが、293-GCC#2細胞に同様に良好に結合した。表10は、漸増濃度の293-GCC#2での5F9複合体の平均蛍光強度を示す。他の研究により、5F9-SPDB-DM4複合体が、濃度依存性様式で293-GCC#2細胞に結合したが、209-SPDB-DM4抗体は結合しなかったことが決定された。

【0421】

【表13】

表13. 293-GCC#2細胞における5F9及び5F9複合体の結合アッセイからのMFI:

	5F9または5F9複合体の $\mu\text{g}/\text{ml}$					
	0.001	0.004	0.016	0.063	0.25	1
5F9	500	937	2465	6615	7816	8026
vcMMAE	445	696	1787	4854	7296	7416
vcMMAF	440	707	1502	4830	7563	7779
mcMMAF	483	776	2106	5353	7398	7585

【0422】

5F9-オーリスタチン毒素複合体を、GCC核酸をトランスフェクトし、GCCの発現に関して選択した種々の細胞の直接的な細胞毒性アッセイにおいて試験した。GCCの表面発現のレベルに関する調査により、293-GCC#2細胞は多量のGCCを発現し、HT29#2及びCT26#2.5細胞は中等度から低レベルでGCCを発現し、CT26#3.2細胞は高レベルでGCCを発現し、HT29-GCC#5及びHT29-GCC#18は少量のGCCを発現することがわかった。表11は、標的を発現する細胞または野生型細胞もしくはベクター対照細胞における3つのオーリスタチンに対する細胞毒性データが得られた複数の研究の比較を示す。標的が強化された殺滅が、293

GCC#2細胞での5F9複合体化毒素のすべての事例に観察され、MMAEに対してMMAFを使用した場合に域が大幅に増加した。MMAFの切断可能及び非切断可能のいずれの形態も、類似の効力であった。陰性対照として、無関係の標的に対するヒトIgG1モノクローナル抗体であり、GCCに対して反応性のないsc209抗体との抗体薬物複合体も作製した。5F9-vcMMAF-ADCと対比して209-ADCを用いた直接的な細胞毒性アッセイにより、293細胞モデル及びHT29細胞モデルにおける標的が強化された細胞殺滅が示された。細胞系の中での5F9複合体化毒素活性の比較は、細胞毒性のレベルが、細胞が発現するGCCの量と何らかの相関関係を有することを示す。これらのデータは、最大量のGCCを発現する少なくともいくつかの細胞系が、少量のGCCを発現する細胞よりも、複合体の細胞毒性活性を受けやすかったことを示唆する。細胞当たりの相対GCC数については、実施例1を参照されたい。細胞毒性レベルの差における別の要因は、野生型細胞系の間で多様であり得る複合体の内部移行または細胞内プロセッシングにおける差であり得る。

【0423】

【表 1 4 - 1】

表 1 4 . 抗GCCオーリスチンADCの細胞毒性。

	5 F 9 複合体のLD 5 0 (nM)			2 0 9 複合体のLD 5 0 (nM)
細胞系	v c MMAE	v c MMAF	m c MMAF	
2 9 3 ベクター	1 2 8	> 1 0	> 1 0	
2 9 3 GCC # 2	0. 3 7	0. 0 0 1	0. 0 0 2	
2 9 3 ベクター	1. 8	> 1 0	> 1 0	

10

【表 1 4 - 2】

	5 F 9 複合体のLD 5 0 (nM)			2 0 9 複合体のLD 5 0 (nM)
細胞系	v c MMAE	v c MMAF	m c MMAF	
2 9 3 GCC # 2	0. 1 3	0. 0 0 5	0. 0 0 7	
2 9 3 ベクター		> 1 0		> 1 0
2 9 3 GCC # 2		0. 0 0 0 4		> 1 0
HT 2 9 WT	8 4	> 1 0	> 1 0	
HT 2 9 GCC # 2	2 4. 1	0. 1 2 7	3. 1	
CT 2 6 WT	> 5 0 0	> 1 0	> 1 0	
CT 2 6 GCC # 2. 5	> 5 0 0	> 1 0	> 1 0	
CT 2 6 GCC # 3 2	2 6 7	0. 0 0 4	0. 0 6 4	
HT 2 9 ベクター	5 2 0. 6	> 1 0, 0 0 0	> 1 0, 0 0 0	
HT 2 9 GCC # 5	6 5 3. 5	5 6 3. 2	> 1 0, 0 0 0	
HT 2 9 GCC # 1 8	5 5 4. 6	> 1 0, 0 0 0	> 1 0, 0 0 0	
HT 2 9	0. 9 3	> 1 0	> 1 0	
HT 2 9 GCC # 5	0. 5 9	0. 3 2	> 1 0	
HT 2 9		> 1 0		> 1 0
HT 2 9 GCC # 5		0. 0 3 5		> 1 0

20

30

40

【0 4 2 4】

これらの効力をm c とv c MMAFとの間で同等の有効性でインビボに変換すると、より高く予想されるm c MMAFのMTDは、この複合体のより大きな治療域を示唆する。

【0 4 2 5】

実施例 3 : インビボ評価

腫瘍モデル :

5 F 9 ADCのインビボ細胞毒性を、マウス異種移植片モデルで評価した。最初のインビボ研究は、HT 2 9 - GCC # 5 及び # 1 8 細胞系を用いて行った。2 9 3 - GCC

50

2 細胞系もまた、インビボ成長に関して試験し、連続的に移植可能なトロカールモデルとして開発した。

【0426】

異種移植片モデルにおけるG C C 発現レベルが、転移性結腸癌を有する患者におけるG C C 発現のレベルと関連するかどうかという疑問に取り組むため、G C C 発現レベルを、異種移植片組織、ヒト原発性結腸腫瘍、及び転移のI H C 分析によって比較した。新鮮凍結細胞系及び組織のパネルを、G C C 3 G 1 に対するマウスm A b でのI H C によるG C C の定量化に用いた。I H C 定量化に関して、スコア付けは、半定量的0 ~ 3 スコアシステムを用いて行った。腫瘍モデルのG C C レベルが臨床G C C レベルを下回る場合、モデル化は、正確であるか、または臨床的に必要とされる曝露を過大評価する可能性が高い。腫瘍モデルのG C C レベルが、臨床G C C レベルを上回る場合、モデル化は、臨床的に必要とされる曝露を過小評価し得る。

10

【0427】

転移試料におけるG C C の発現にはいくらかの変動性があったが、H T 2 9 - G C C # 5 及び# 1 8 細胞による発現は、転移試料の多くの範囲内であった。I H C によって、H T 2 9 - G C C # 5 及び# 1 8 細胞でのG C C の染色は、転移細胞でのものと同等であるか、またはそれよりも少なかった。このデータは、腫瘍モデルが、m e t C R C の臨床試料に見出されるレベルと同程度のレベルでG C C を発現することを示唆する。

【0428】

表16は、192時間の時点で採取した種々の組織のシンチレーション計数を、示される3つの動物の平均で表す。5 F 9 は、H T 2 9 - ベクター腫瘍と対比してH T 2 9 - G C C # 5 腫瘍では優先的に集積したが、209は、それほど異なった集積を示さなかった。この結果は、5 F 9 抗体薬物複合体がG C C 発現腫瘍に集積すると予測され得ることを裏付ける。評価したすべての他の組織において、5 F 9 とm A b 209とでは抗体の集積レベルにほとんど差はなかった。

20

【0429】

H T 2 9 - G C C # 5 及びH T 2 9 - ベクター腫瘍保持マウスにおける放射標識した5 F 9 のインビボ分布。

腫瘍保持マウスにおける放射性撮像研究を行って、抗G C C 抗体5 F 9 及び陰性対照抗体s c 209（無関係の細胞表面標的を標的とするヒトI g G 1 モノクローナル抗体）の腫瘍標的化及びインビボ生体分布を評価した。抗体を、二官能性キレート剤としてD T P A を用いて¹¹¹Inで放射標識した。正常組織において経時的な腫瘍標的化及び生体分布を含むインビボ挙動を、G C C (-) 及びG C C (+) の両方の腫瘍を有するマウス二重腫瘍モデルを用いて調査した。インビボ画像(S P E C T / C T)を取得し、組織放射能計数を使用して空間分解能を補った。

30

【0430】

皮下腫瘍を、右側にH T 2 9 - ベクター腫瘍、左側にH T 2 9 - G C C # 5 腫瘍で、ヌードマウスにおいて成長させた。抗体を、動物1匹当たり0.3 m C i = 15 µ g で投薬した。1群当たり3匹の動物が存在し、群は、1時間、24時間、48時間、72h時間、120時間、及び192時間で採取する。

40

【0431】

192時間の群の動物からの組織の調査は、5 F 9 及び209のいずれも、ほとんどの正常組織（例えば、血液、心臓、胃、小腸、大腸、筋肉、及び皮膚）ならびにH T 2 9 - ベクター対照腫瘍において類似の程度に集積したことを示す。抗体209は、肝臓においては5 F 9 よりもわずかに高いレベルで集積し、5 F 9 は、肺、脾臓、及び腎臓においては209よりもわずかに高いレベルで集積した。H T 2 9 - G C C # 5 腫瘍においては、5 F 9 は、209のレベルよりも2倍を上回って高いレベルで優先的に集積した。この結果は、5 F 9 抗体薬物複合体がG C C 発現腫瘍に集積すると予測され得ることを裏付ける。

【0432】

腫瘍における抗体集積の動態を理解するために、各抗体の腫瘍データを、研究のすべて

50

の時点で取得した。集積を示した唯一の組織は、G C Cを発現する腫瘍における5 F 9抗体であった。すべての他の組織における放射活性レベルは、比較的平坦なままであり、5 F 9レベルと2 0 9レベルとの間にほとんど差はなかった。5 F 9は、H T 2 9－G C C # 5腫瘍において優先的に集積したが、2 0 9は、いずれの集積も示さなかった。この結果は、5 F 9抗体薬物複合体がG C C発現腫瘍に集積すると予測され得ることを裏付ける。

【0 4 3 3】

【表 1 6】

表 1 6. ^{111}In 標識したG C C特異的m A bはG C Cを発現する腫瘍に集積するが、対照m A bは集積しない。

	平均% I D 5 F 9	平均% I D 対照 I g G
1 時間	2. 8 1 6 ± 0. 1 3 3	2. 4 9 4 ± 0. 1 6 7
2 4 時間	3. 0 5 7 ± 0. 1 0 7	3. 0 1 0 ± 0. 6 3 0
7 2 時間	4. 4 8 5 ± 1. 0 2 9	3. 5 6 4 ± 0. 1 5 2
1 2 0 時間	5. 1 6 2 ± 1. 0 1 2	3. 4 1 2 ± 0. 0 4 8
1 9 2 時間	6. 5 5 0 ± 1. 0 1 5	2. 7 8 2 ± 0. 0 8 5

【0 4 3 4】

7 日間にわたるG C Cを発現する腫瘍における放射標識5 F 9の集積は週 1 回の投薬スケジュールを支持した。

【0 4 3 5】

H T 2 9－G C C # 5 皮下腫瘍における試験的な有効性研究

研究を行って、H T 2 9－G C C # 5 腫瘍を保持するマウスにおける有効な複合体及び投薬レジメンを決定した。マウスに、単一または複数回用量を投薬した。これらの研究により、より高いレベルで毒素複合体を過剰な頻度（例えば、1 5 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の5 F 9 v c M M A F を3 日に1 回（× 5）のスケジュールで）で投薬すると毒性があると判断された。別の研究により、1 4 日に1 回（× 5）のスケジュールは、このモデルでは、頻度が少なすぎるため、毒素複合体が対照と対比して有意な有効性を示すことが出来なかったと判断された。さらに、このモデルでのマイタンシノイドー抗体複合体を用いたP D 研究は、D M 4 毒素でのみ用量依存性のホスホヒストン（p h o s p h o h i s t o n e）集積を示し、D M 1 毒素では示さなかった。このモデルにおける別の研究は、非G C C 特異的2 0 9－毒素複合体によるいくらかの腫瘍成長阻害を示した。これらの結果は、他のインビボモデルを評価する必要があることを示唆した。

【0 4 3 6】

2 9 3－G C C # 2 腫瘍を有するマウスにおける5 F 9 A D C でのP K / P D 研究。

代替的な腫瘍モデルでは2 9 3－G C C # 2 細胞を使用した。2 9 3－G C C # 2 腫瘍保持マウスにおける5 F 9 A D C のP D 研究を行った。マウスに、7 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または1 5 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で単回用量の5 F 9 v c M M A F を投薬し、ホスホヒストンH 3 のP D 分析のために血清を1 時間から4 日の時点で採取して、腫瘍細胞に対する毒素の抗有糸分裂効果を試験した。ホスホヒストンH 3 を、腫瘍のパラフィン埋め込み切片の抗体（U p s t a t e B i o t e c h n o l o g y、現在のM i l l i p o r e, B i l l e r i c a, M A）の染色によって検出した。表 1 7 のデータは、A D C のそれぞれが、腫瘍内のp H 3 陽性細胞集団の有意な増加をもたらしたことを示し、A D C のそれぞれが、7 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び1 5 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の両方の毒素用量相当量で腫瘍に到達し、腫瘍細胞に対して所望される抗有糸分裂効果を有することを示す。

【0 4 3 7】

【表 17-1】

表 17. 5F9-ADC の単回静脈内投薬後の有糸分裂における細胞の停止によって評価される PD 応答 (pH3 陽性腫瘍細胞%)。

	平均 pH3 陽性腫瘍 細胞%	標準偏差
ビヒクル対照	2.556801	2.37707
5F9-vcMMAE 75 μ g / kg 1時間	4.525187	0.178882
4時間	2.551616	1.688255
8時間	4.243988	0.352938
24時間	9.8199	4.82057
48時間	8.692061	4.756786
96時間	8.628345	1.065456
5F9-vcMMAE 150 μ g / kg 1時間	3.334943	1.351667
4時間	2.78543	1.690216
8時間	4.575611	1.130484

10

20

【表 17-2】

	平均pH3陽性腫瘍細胞%	標準偏差
24時間	13.78776	3.343155
48時間	14.26067	5.448921
96時間	14.67942	1.827724
5F9-v cMMAF 75 μ g / kg 1時間	4.235245	0.617585
4時間	4.18364	0.846752
8時間	4.930098	0.54746
24時間	20.22484	2.453935
48時間	9.920771	3.788795
96時間	10.38187	1.896461
5F9-v cMMAF 150 μ g / kg 1時間	3.465674	1.341187
4時間	4.416646	0.807636
8時間	8.594385	4.005021
24時間	21.53718	7.25212
48時間	15.15814	4.28407
96時間	11.12288	2.150476
5F9-m cMMAF 75 μ g / kg 1時間	5.365582	1.14198
4時間	4.044478	0.992449
8時間	8.228597	3.098222
24時間	14.10734	1.611093
48時間	19.37223	8.146504
96時間	7.749388	1.180759
5F9-m cMMAF 150 μ g / kg 1時間	3.212482	0.509604
4時間	4.722554	1.577531
8時間	9.105349	5.963128

【表 17-3】

	平均pH3陽性腫瘍細胞%	標準偏差
24時間	27.51416	10.96057
48時間	13.34043	3.414961
96時間	15.60917	3.386154

10

20

30

40

50

【0438】

類似の研究により、5F9vcMMAF、5F9-SPDB-DM4、及び5F9-SMCC-DM1で処置した293-GCC#2腫瘍保持マウスにおけるホスホヒストンレベルを測定した。マウスに、150ug/kgの単回用量を投薬し、抗体及び毒素複合体化抗体の両方のPK分析のために、血清を1時間～21日の時点で採取した。293-GCC#2腫瘍におけるホスホヒストンH3陽性細胞の割合は、3つすべてのADCs：5F9vcMMAF、5F9-SMCC-DM1、及び5F9-SPDB-DM4に応答して増加した。最大ホスホヒストンH3レベルは、ベースラインを上回って3～5倍増加し、ピークは注入24時間後であった。

【0439】

293-GCC#2皮下腫瘍における5F9vcMMAF及び5F9-DMxでの有効性研究

5F9-SPDB-DM4、5F9-SMCC-DM1、及び5F9vcMMAFを、293-GCC#2腫瘍モデルにおいて2つの用量（75μg/kg及び150μg/kgの毒素）で、14日に1回（x5）のスケジュールで有効性について試験した。具体的には、この研究は、ビヒクル処置対照、Sc209-DM1（150μg/kg DM1当量）、Sc209-DM4（150μg/kg DM4当量）、Sc209-vcMMAF（150μg/kg MMAF当量）、5F9-DM1（150μg/kg DM1当量）、5F9-DM4（150μg/kg DM4当量）、5F9-DM4（75μg/kg DM4当量）、5F9-vcMMAF（150μg/kg MMAF当量）、及び5F9-vcMMAF（75μg/kg MMAF当量）を含んだ。293-GCC#2細胞を保持するTaconicの雌性マウス（1群当たり10匹のマウス）を使用した。

【0440】

図1は、14日に1回のスケジュールにおいて5F9vc-MMAF、-DM1、及び-DM4で処置した293-GCC#2保持SCIDマウスにおける腫瘍成長を示す。用量依存性の有効性が、293-GCC#2モデルにおいて5F9-SPDB-DM4で観察されたが、209-SPDB-DM4対照は効果を有さなかった。5F9-SMCC-DM1もまた有効であったが、150ug/kgの5F9-SPDB-DM4ほどではなかった。5F9vcMMAF（75ug/kg及び150ug/kg）が最も有効であったが、209vcMMAFもまた、いくらかの活性を有した。したがって、これらの用量及びスケジュールでは、5F9-SPDB-DM4がその対照複合体からの最も大きな有効な差を有した。

【0441】

293-GCC#2皮下腫瘍における5F9vcMMAF及び5F9-DMxでの有効性研究

5F9-SPDB-DM4及び5F9-SMCC-DM1を、7日に1回（x5）のスケジュールにおいて2つの用量（75ug/kg及び150ug/kgの毒素）で、293-GCC#2腫瘍モデルにおける有効性に関して試験した。具体的には、この研究は、ビヒクル対照、5F9単独（15mg/kg）、DM1（300μg/kg）、DM4（300μg/kg）、Sc209-DM1（150μg/kg DM1当量）、Sc209-DM4（150μg/kg DM4当量）、Sc209-vcMMAF（150μg/kg MMAF当量）、5F9-DM1（150μg/kg DM1当量）、5F9-DM4（150μg/kg DM4当量）、及び5F9-DM4（75μg/kg DM4当量）を含んだ。293-GCC#2細胞を保持するTaconicの雌性マウス（1群当たり10匹のマウス）を使用した。

【0442】

293-GCC#2腫瘍におけるオーリスタチン複合体を用いた有効性研究

293-GCC#2腫瘍保持SCIDマウスを、3つの用量でvcMMAE、vcM

10

20

30

40

50

M A F、またはm c M M A Fとの5 F 9複合体で処置し、これらの毒素の2 0 9複合体、または遊離毒素もしくはビヒクル対照と比較した。用量を、7日に1回(×4)のスケジュールで静脈内投与した。腫瘍を、3日目、7日目、10日目、13日目、及び17日目に採取した。対照試料で処置したマウスにおける腫瘍は、体積の継続的な増加を示した。5 F 9オーリスタチン複合体で処置した腫瘍は、この腫瘍成長の用量及び時間依存的阻害を示した。表18は、結果の要約を提供する(T G I = 腫瘍成長阻害、T / C = 処置 / 対照、T G D = 腫瘍成長遅延、C R / P R = 完全応答 / 部分応答、p 値 = 統計学的有意性を判断するための尺度、N S = 有意でない)。

【0443】

【表18-1】

表18. 293 GCC #2腫瘍保持マウスにおけるオーリスタチンADCの分析

群	T G I	T / C	T G D	C R / P R	P 値
2 0 9 - v c M M A E 3 0 0 μ g / k g	2 4 . 5	0 . 7 6	0 . 9	0	0 . 3 8 > 0 . 0 5 N S
2 0 9 - v c M M A F 1 5 0 μ g / k g	2 9 . 4	0 . 7 1	1 . 4	0	0 . 2 7 > 0 . 0 5 N S
2 0 9 - m c M M A E 1 5 0 μ g / k g	3 6 . 5	0 . 6 3	1 . 4	0	0 . 1 5 > 0 . 0 5 N S
遊離MMAE 3 0 0 μ g / k g	3 5 . 6	0 . 6 4	2	0	0 . 1 8 > 0 . 0 5 N S
遊離m c M M A F 1 5 0 μ g / k g	- 3 . 4	1 . 0 3	- 1 . 3	0	0 . 7 3 > 0 . 0 5 N S

【表18-2】

群	T G I	T / C	T G D	C R / P R	P 値
5 F 9 - v c M M A E 3 0 0 μ g / k g	9 6 . 9	0 . 0 3		9 / 1 0 P R	< 0 . 0 0 1
5 F 9 - v c M M A E 1 5 0 μ g / k g	8 3 . 5	0 . 1 7		2 / 1 0 P R	< 0 . 0 1
5 F 9 - v c M M A F 1 5 0 μ g / k g	9 7	0 . 0 3		9 / 1 0 P R	< 0 . 0 0 1
5 F 9 - m c M M A F 1 5 0 μ g / k g	9 7	0 . 0 3		9 / 1 0 P R	< 0 . 0 0 1
5 F 9 - v c M M A E 7 5 μ g / k g	5 4 . 5	0 . 4 5	4 . 4		0 . 0 1 < p < 0 . 0 5
5 F 9 - v c M M A F 7 5 μ g / k g	8 8 . 5	0 . 1 2		6 / 1 0 P R	< 0 . 0 0 1
5 F 9 - m c M M A F 7 5 μ g / k g	8 7 . 5	0 . 1 3		7 / 1 0 P R	= 0 . 0 0 1
5 F 9 - v c M M A F 3 7 . 5 μ g / k g	6 5 . 2	0 . 3 5	7 . 1		= 0 . 0 1
5 F 9 - m c M M A F 3 7 . 5 μ g / k g	6 3 . 6	0 . 3 6	5 . 8		= 0 . 0 1

【0444】

これらのADCの3つすべてが、7日に1回のスケジュールで293 G C C # 2モデルにおいて有効であった。5F9-v c MMA F及び5F9-m c MMA Fは、5F9-v c MMA Eよりも強力であり、これは、インビボPD (p H i s H 3) 及びインビトロ細胞毒性データと相関する。

【0445】

T84皮下腫瘍における5F9 v c MMA F及び5F9-DM xを用いた有効性研究

5F9-S P D B-DM 4及び5F9-S M C C-DM 1を、7日に1回(×5)のスケジュールにおいて、2つの用量(75 µ g / k g及び150 µ g / k gの毒素)でT84腫瘍モデルにおける有効性に関して試験した。具体的には、この研究は、ビヒクル対照、5F9単独(15 m g / k g)、DM 1(300 µ g / k g)、DM 4(300 µ g / k g)、S c 209-DM 1(150 µ g / k g DM 1当量)、S c 209-DM 4(150 µ g / k g DM 4当量)、S c 209-v c MMA F(150 µ g / k g MMA F当量)、5F9-DM 1(150 µ g / k g DM 1当量)、5F9-DM 1(75 µ g / k g DM 1当量)、5F9-DM 4(150 µ g / k g DM 4当量)、及び5F9-DM 4(75 µ g / k g DM 4当量)を含んだ。T84細胞を保持するT a c o n i cの雌性マウス(1群当たり10匹のマウス)を使用した。(「S c 209-[毒素]」または「209-[毒素]」は、本明細書に記載される研究において対照として使用した非G C C標的化ADCを指す)。

【0446】

一次腫瘍モデルにおけるADCの抗腫瘍活性

種々の用量及び投薬スケジュールで、P H T X-9 c 原発性ヒト結腸腫瘍異種移植片マウスにおける5F9-v c MMA Eのインビボ抗腫瘍活性を判定するため、ならびに5F9-v c MMA Eの抗腫瘍活性を遊離毒素MMA E及び非G C C v c MMA E抗体毒素複合体(209-v c MMA E)と比較するため、ならびに処置後の再成長動態を判定するために、2つの類似の研究を行った。雌性C B-17 S C I Dマウス(8週齢)の側腹部に、P H T X-9 c 腫瘍フラグメント(2 mm×2 mm)を、皮下接種した。ノギスを使用して腫瘍成長を週2回監視し、式(0.5×[長さ×幅²])を使用して平均腫瘍体積を計算した。平均腫瘍体積がおおよそ150 mm³(研究A)または160 mm³(研究B)に達したときに、動物を無作為に処置群(研究Aについてはn=10/群、研究Bについてはn=9/群)に分けた。

【0447】

マウスを、週1回(QW)の投薬スケジュールで0.938、1.875、3.75、または7.5 m g / k gの5F9-v c MMA Eで20日間静脈内(I V)処置したか、あるいは、ビヒクル(0.9%食塩水)、QW(週1回)スケジュールで0.075もしくは0.15 m g / k gのMMA E(静脈内)、またはQW投薬スケジュールで1.875もしくは3.75 m g / k gの209-v c MMA E(静脈内)を含む対照で20日間処置した(研究A)。第2の研究(研究B)では、マウスを、週1回のスケジュール(3回用量)において0.938、1.875、3.75、7.5、もしくは10.0 m g / k gの5F9-v c MMA E(静脈内)で、または週2回(B I W)のスケジュール(6回用量)において3.75 m g / k g(静脈内)で、あるいは、週1回のスケジュールで20日間静脈内投与される、ビヒクル、7.5もしくは10 m g / k gの209-v c MMA E、または0.135もしくは0.18 m g / k gのMMA Eを含む対照で、処置した。用量は、週1回のスケジュールでは1日目、8日目、及び15日目に投与し、週2回のスケジュールでは1日目、4日目、8日目、11日目、15日目、及び18日目に投与した。遊離MMA Eの用量は、次の論理的根拠によって免疫複体の用量中のMMA Eの用量と一致するように計算した：MMA Eの当用量は、M L N 0 2 6 4用量の1.8%である。リンカー+MMA Eの当用量は、5F9-v c MMA E用量の4%である。これらの計算は、抗体1つ当たり平均3.9個のMMA E分子及び150 k Dの遊離抗体分子量に基づいた。実際の抗体の分子量は、グリコシル化の程度に応じてわずかに変動する。

【0448】

10

20

30

40

50

腫瘍体積及び体重は週2回測定し、これは、腫瘍成長遅延（TGD）から明らかなように、再成長動態を測定するために、治療期間を超えて継続された。腫瘍体積測定は、腫瘍体積が処置群内の単一のマウスにおいて体重の10%に達するまで継続し、この時点でこの群は終了させた。腫瘍成長阻害（TGI）パーセント（〔対照群の平均腫瘍体積－処置群の平均腫瘍体積〕／対照群の平均腫瘍体積；T／C比）を、20日目に決定した。処置群全体のT／C比を、両側Welch検定を使用して、対照群のT／C比と比較した。1つの腫瘍が寸法限度（およそ1000mm³）に達したときに群全体を終了させたため、TGDは平均再成長が緩徐であった群に関して計算することができなかった。

【0449】

処置群の対間の経時的な腫瘍成長傾向における差を、線形混合効果回帰モデルを用いて評価した。これらのモデルから、各動物を複数の時点で測定したという事実が明らかとなる。各比較のために別個のモデルを当てはめ、そのモデルから予測される値を使用して各処置群の曲線下面積（AUC）を計算した。次いで、参照群と比較したAUCの減少パーセント（dAUC）を計算した。統計学的に有意なP値（<0.05）は、2つの処置群の経時的な傾向が異なっていたことを示唆する。結果を、以下の表19及び20に要約する。

【0450】

いずれの研究においてもすべての5F9－vcMMAE処置群で抗腫瘍活性が観察され、その効果は用量依存性であることが示された。2つの研究の結果は、同程度であった。1週間に1回のスケジュールにおいて0.938mg/kgの5F9－vcMMAE（静脈内）で処置したマウスにおいて、ビヒクル群と比較して、TGIは20.7～21.4%であり、p値は<0.05であった。1週間に1回のスケジュールにおいて静脈内投与した1.875mg/kgの処置群では、TGIは41.3～44.7%であり、p値は<0.001であった。1週間に1回のスケジュールで静脈内投与した3.75mg/kgの処置群では、ビヒクル群と比較して、TGIは65.3～65.7%（p<0.001）であった。1週間に1回7.5mg/kgを静脈内投与した5F9－vcMMAEは、84.1～84.3%のTGI（p<0.001）をもたらし、1週間に1回静脈内の10mg/kg（研究Bのみ）は91.2%のTGI（p<0.001）をもたらした。3.75mg/kgを1週間に2回のスケジュール（S）で静脈内投与した場合、84.9%のTGI（p<0.001）で有意な阻害が観察された。

【0451】

中等度の抗腫瘍活性が、7.5及び10.0mg/kgのより高用量の209－vcMMAEにおいて、それぞれ、35.7及び45.4%のTGI（p<0.001）で観察されたが、低用量の209－vcMMAE（1.875及び3.75mg/kg）は、阻害を示さなかった（p>0.05）。高209－vcMMAEによって観察された抗腫瘍活性は、免疫複合体のMMAE部分による非特異的な活性によるものである可能性が高い。

【0452】

遊離毒素MMAEの投与は、入り混じった結果をもたらした：週1回静脈内投与した0.075、0.135、及び0.15mg/kgは、腫瘍成長阻害をもたらさなかった（p>0.05）が、週1回の0.18mg/kgの静脈内投与は、50.4%のTGI（p<0.001）をもたらした。

【0453】

処置期間中に観察された最大の体重減少は、研究Bの遊離毒素0.18mg/kg MMAE群及び同じ研究の0.938mg/kg 5F9－vcMMAE群における7日目の2.3%であった。これは、薬物が十分に耐容されたことを示す。

【0454】

腫瘍体積測定は、腫瘍体積が処置群内の単一のマウスにおいて体重の10%に達するまで処置期間を超えて継続した後、処置群を終了させた。これらの研究において、腫瘍再成長は、用量依存性であると見られた。

10

20

30

40

50

【 0 4 5 5 】

【表 1 9】

表 1 9. 原発性ヒト結腸腫瘍異種移植片 S C I D マウスの処置の研究 A の結果。

処置	用 量 (m g / k g)	投与方法／頻度	T G I	体重変化 (平均最 大パーセ ント)	T G D (日 数) / (ま たは最初 の腫瘍が 1 0 0 0 m m ³ を 超えるまで の日数)
ビヒクル	0	週 1 回静脈内× 3 用量	該当なし	- 0 . 2	0
2 0 9 - v c M M A E	1 . 8 7 5	週 1 回静脈内× 3 用量	- 2 . 0 (p > 0 . 0 5)	8 . 3	0 . 6
2 0 9 - v c M M A E	3 . 7 5	週 1 回静脈内× 3 用量	4 . 5 (p > 0 . 0 5)	6 . 9	0 . 4
M M A E	0 . 0 7 5	週 1 回静脈内× 3 用量	5 . 0 (p > 0 . 0 5)	8 . 3	1 . 0
M M A E	0 . 1 5	週 1 回静脈内× 3 用量	1 1 . 1 (p > 0 . 0 5)	1 0 . 8	2 . 0
5 F 9 - v c M M A E	0 . 9 3 8	週 1 回静脈内× 3 用量	2 1 . 4 (p > 0 . 0 5)	9 . 0	3 . 3
5 F 9 - v c M M A E	1 . 8 7 5	週 1 回静脈内× 3 用量	4 4 . 7 (p > 0 . 0 0 1)	1 0 . 6	8 . 2
5 F 9 - v c M M A E	3 . 7 5	週 1 回静脈内× 3 用量	6 5 . 3 (p > 0 . 0 0 1)	9 . 0	1 7 . 8
5 F 9 - v c M M A E	7 . 5	週 1 回静脈内× 3 用量	8 4 . 1 (p > 0 . 0 0 1)	7 . 5	(最初の腫 瘍が 5 8 日 超)

10

20

30

【 0 4 5 6 】

【表 20】

表 20. 原発性ヒト結腸腫瘍異種移植片 S C I Dマウスの処置の研究 B の結果。

処置	用 量 (m g / k g)	投与方法／頻度	T G I	体重変化 (平均最大パーセント)	T G D (日数) / (または最初の腫瘍が 1 0 0 0 m m ³ を超えるまでの日数)
ビヒクル	0	週 1 回静脈内× 3 用量	該当なし	- 1 . 8	0
2 0 9 - v c M M A E	7 . 5	週 1 回静脈内× 3 用量	3 5 . 7 (p > 0 . 0 0 1)	4 . 2	4 . 2
2 0 9 - v c M M A E	1 0 . 0	週 1 回静脈内× 3 用量	4 5 . 4 (p > 0 . 0 0 1)	2 . 6	1 1 . 3
M M A E	0 . 1 3 5	週 1 回静脈内× 3 用量	2 . 2 (p > 0 . 0 5)	9 . 3	0 . 2
M M A E	0 . 1 8	週 1 回静脈内× 3 用量	5 0 . 4 (p > 0 . 0 0 1)	- 2 . 3	8 . 6
5 F 9 - v c M M A E	0 . 9 3 8	週 1 回静脈内× 3 用量	2 0 . 7 (p > 0 . 0 0 1)	- 2 . 3	3 . 8
5 F 9 - v c M M A E	1 . 8 7 5	週 1 回静脈内× 3 用量	4 1 . 3 (p > 0 . 0 0 1)	5 . 6	6 . 6
5 F 9 - v c M M A E	3 . 7 5	週 1 回静脈内× 3 用量	6 5 . 7 (p > 0 . 0 0 1)	- 2 . 2	1 6
5 F 9 - v c M M A E	3 . 7 5	週 2 回静脈内× 6 用量	8 4 . 9 (p > 0 . 0 0 1)	- 1 . 8	3 1 . 9
5 F 9 - v c M M A E	7 . 5	週 1 回静脈内× 3 用量	8 4 . 3 (p > 0 . 0 0 1)	6 . 5	(最初の腫瘍が 4 7 日超)
5 F 9 - v c M M A E	1 0 . 0	週 1 回静脈内× 3 用量	9 1 . 2 (p > 0 . 0 0 1)	7 . 2	(最初の腫瘍が 5 6 日超)

【 0 4 5 7 】

C T 2 6 h G C C / l u c # 3 2 播種性モデル (b a l b / c マウス) におけるネイキッド 5 F 9 抗 h G C C 抗体を用いた試験的な有効性研究

このモデルは、循環中の G C C 発現腫瘍細胞に結合し、新たな腫瘍の確立を予防するネイキッド抗体の能力を試験する。雌性 b a l b / c マウスに、 1×10^5 / マウス及び 5×10^5 / マウスで、C T 2 6 h G C C / l u c # 3 2 細胞を静脈内に接種した。ネイキッド 5 F 9 の投与との比較のために、ビヒクル 0 . 9 % N a C l 及び非特異的抗体 (ネイキッド 2 0 9) を対照群に投与した。いずれの抗体も、I g G 1 アイソタイプを有するように遺伝子操作され (p L K T O K 5 8 ベクターにおいて)、そのため、それらの F c 領域は、細胞表面抗原 (すなわち、5 F 9 については G C C 及び 2 0 9 については無関係の標的) に結合した後に、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性応答を誘起することができた。投薬は、静脈内で接種の 1 日前に開始し、1 回 / 週の静脈内× 4 (7 日に 1 回 (× 4)) の投薬スケジュールで行った。腫瘍成長を、週 2 回、X e n o g e n 撮像システムによ

て監視した。体重及び生存を、同様に週2回監視した。肺の重量及びMRI画像を含む画像を、この研究の終了時に取得した。

【0458】

図2に示されるように、いずれの5F9群(40mg/kg及び10mg/kg、 1×10^5 /マウス)も、有効性を示す(接種後34日目:T/C(処置/対照)は、0.04~0.05である)。接種後34日目における5F9群のT/Cは、209群と比較して、0.18~0.14である。209 40mg/kg群のT/Cは、0.9%NaCl(生理食塩水)群と比較して、0.64である。 5×10^5 群の5F9では利点は見出されなかった。

【0459】

この研究の終了時における各群の肺重量を、図3に示した。T検定:ビヒクルと対比した209 40mg/kg $P=0.4$ 、ビヒクルと対比した5F9 40mg/kg $P<0.05$ 、ビヒクルと対比した5F9 10mg/kg $P<0.01$ 。肺の目視検査により、5F9処置群では、ビヒクルまたは209処置群よりも少ない腫瘍小結節が確認された。マウスのインビボMRIは、ビヒクル処置マウスにおける肺腫瘍の周囲組織への大規模な浸出(exfiltration)及び心臓偏位(heart displacement)を示した。5F9 40mg/kg処置マウスでは、腫瘍の根拠はなく、正常な肺の状態が見られた。

【0460】

生存曲線を、図4に示す。5F9処置群(1×10^5)での生存の有意な増加が観察され、5F9の10及び40mg/kgの群間に差はなかった。

【0461】

実施例4:抗体産生細胞系の生成

600mg/Lを上回る生産性で5F9を発現する安定なCHO細胞系クローンを生成するために、野生型ヒトIgG1 Fc及びネオマイシン耐性遺伝子を含む軽鎖可変領域(配列番号19)及び重鎖可変領域(配列番号17)をpLKTK58発現ベクターにサブクロニングすることによって、5F9の発現ベクターを生成した。5F9可変領域-IgG1融合産物の発現は、EF-1αプロモーターの制御下である。

【0462】

抗GCCヒトモノクローナル抗体5F9可変領域のクローニング及びシークエンシング
全RNAを、ヒトハイブリドーマ46.5F9サブクローン8.2から単離した(Qiagen's RNeasyキット)。このハイブリドーマは、軽鎖の「標準的な」公開されたκ定常領域(GenBank受託番号#AW383625またはBM918539)及び重鎖の「標準的な」公開されたIgG2定常領域(GenBank受託番号#BX640623またはAJ294731)を保持する。5'race-readyのポリG尾部を有するcDNAを、従来の方法によって合成した(Nature Methods 2, 629-630(2005))。軽鎖可変領域を、ポリCアンカーオリゴをκ定常領域に特異的な逆方向プライマーと組み合わせて使用して、5'raceによってcDNAからPCRで増幅させた。重鎖可変領域を、既知の重鎖リーダー配列に特異的な順方向プライマーとの複数の組み合わせでIgG2定常領域に特異的な逆方向プライマーを用いて増幅させた。PCR産物を、TOPO(登録商標)クローニングし(Invitrogen(商標), Life Technologies, Inc.)、M13F及びM13Rプライマーを用いてシークエンシングした。

【0463】

抗GCCヒトモノクローナル抗体5F9を保持する哺乳動物発現ベクターの構築

5F9軽鎖及び重鎖可変領域を保持する哺乳動物発現ベクターを構築して、産生CHO細胞系を生成した。天然の構築物のために、5F9軽鎖及び重鎖の可変領域を、pLKTK58Dにサブクロニングした(米国特許出願第20040033561号)。このベクターは、ネオマイシン耐性及びDHFR/メトトレキサート(増幅のため)の2つの哺乳動物選択マーカーを保持する。このベクターにより、それぞれ、ベクターのリーダー

10

20

30

40

50

ーκ構築物及びリーダー-IgG1（野生型Fc）定常領域の上流に位置するタンデムEF1αプロモーターからの軽鎖及び重鎖の両方の同時発現を可能となる。サブクロニングのために、軽鎖及び重鎖の可変領域を、配列が確認されているTOPOKローンから、ベクターのそれぞれのリーダー-κ及びリーダー-IgG領域の接合部への方向性クロニングのための固有の制限部位を含有する遺伝子特異的プライマーを用いて、PCR増幅した。プライマーの配列は、次の通りである（5F9可変領域特異的配列を太字で示す）：

天然の5F9軽鎖リーダー-可変プライマー：

順方向NotI

5' **at a a g a a t G C G G C C G C C T C A C C A T G G G A T G G A G C T G T A**
T C A T C C T C T T C T T G G T A G C A A C A G C T A C A G G T G T C C A C T C
C G A A A T A G T G A T G A C G C A G T C T C C A G C C A C C C T G - 3'（配列
 番号21） 10

逆方向BsiWI

5' - **G C C A C C G T A C G T T T G A T T T C C A C G T T G G T C C C T T G G**
C C G A A C G T C - 3'（配列番号22）

天然の5F9重鎖リーダー-可変プライマー

順方向EcoRI 5' **c c g G A A T T C C T C A C C A T G G G A T G G A G C**
T G T A T C A T C C T C T T C T T G G T A G C A A C A G C T A C A G G T G T C C
A C T C C C A G G T G C A G C T A C A G C A G T G G G G C G C A G G A C - 3'（
 配列番号23） 20

逆方向B1p1

5' - **G G A G G C T G A G C T G A C G G T G A C C A G G G T T C C C T G G C C C**
C A G T G G T C - 3'（配列番号24）

【0464】

クローンは、軽鎖及び重鎖の両方の二本鎖DNAシーケンシングによって確認した。

【0465】

従来のMPIプロセス及びCrucellプロセスの2つのトランスフェクション方法を使用して、構築物をCHO細胞に導入した。CHO細胞のトランスフェクションは、従来のMPIプロセスを使用して、天然の5F9構築物で開始した。エレクトロポレーションまたはリポフェクタミン2000 CDトランスフェクションのいずれかとともに、線状化または非線状化DNAを使用した。G418、非ヌクレオチド培地及び5nMメトトレキサートにおける選択を通じて、おおよそ30個の安定なプールを生成した。抗体産生レベルのFMA T分析に基づいて、3つの安定なプールをクロニングに選択した。最も高い産生を有するプールは、12.2ug/mlで抗体を分泌した。これらの3つのプールを凍結させた。 30

【0466】

Crucell STAR要素を評価して、STAR要素を含有する5F9発現ベクターを作製することができる。

【0467】

5F9/hIgG1重鎖ヌクレオチド配列は、以下である。

G A A T T C C T C A C C A T G G G A T G G A G C T G T A T C A T C C T C T T C T
T G G T A G C A A C A G C T A C A G G T G T C C A C T C C C A G G T G C A G C T
A C A G C A G T G G G G C G C A G G A C T G T T G A A G C C T T C G G A G A C C
C T G T C C C T C A C C T G C G C T G T C T T T G G T G G G T C T T T C A G T G
G T T A C T A C T G G A G C T G G A T C C G C C A G C C C C A G G G A A G G G
G C T G G A G T G G A T T G G G G A A A T C A A T C A T C G T G G A A A C A C C
A A C G A C A A C C C G T C C C T C A A G A G T C G A G T C A C C A T A T C A G
T A G A C A C G T C C A A G A A C C A G T T C G C C C T G A A G C T G A G T T C
T G T G A C C G C C G C G G A C A C G G C T G T T T A T T A C T G T G C G A G A 50

GAACGTGGATACACCTATGGTAAC TTTGACCACTGGGGCC
AGGGAACCCCTGGTCAACCGTCAAGCTCAAGCCTCCACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCC
TCTGGGGGGCACAGCGGGCCCTGGGGCTGCCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCCGAACCGGTGACGGGTGTCGTGGAAC TCAAGGCGC
CCTGACCAGCGGGCGTGCACACCTTCCCGGGCTGTCTCTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGC
CCTCCAGCAGCTTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAAGCCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT
GAGCCCAAAATCTTTGTGACAAAACTCACACATGCCCAACCGT 10
GCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGGACCGTCAAGTCTTCTCT
CTTCCCCCCCCAAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGG
ACCCCTTGAGGTCAACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCCTGAGGTCAAGTTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCAATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCCCTCACCGTCC
TGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCCCTCCCAAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCCGAGAACCCACAGGTGT
ACACCCCTGCCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA 20
GGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAAGC
GACATCGCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAAGCCGGAGA
ACAAC TACAAGACCAACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTTGCAACAACCACTACACGCGAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAAACAGGGTAATACT
AGAG (配列番号31)

【0468】

5F9/h IgG1重鎖タンパク質配列は、以下である。

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQQWAGLLKPSETLSLT
CAVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNP
SLKSRVTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCAREREGY
TYGNFDHWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV 40
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号32)

【0469】

5F9/h κ軽鎖ヌクレオチド配列は、以下である。

GCGGCCGCGCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTT
CTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTG
ATGACGCGAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG
CAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT
CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAAGGGCCACTG 50

G A A T C C C A G C C A G G T T C A G T G G C A G T G G G T C T G G G A C A G A
 G T T C A C T C T C A C C A T C G G C A G C C T G C A G T C T G A A G A T T T T
 G C A G T T T A T T A C T G T C A G C A G T A T A A A A C C T G G C C T C G G A
 C G T T C G G C C A A G G G A C C A A C G T G G A A A T C A A A C G T A C G G T
 G G C T G C A C C A T C T G T C T T C A T C T T C C C G C C A T C T G A T G A G
 C A G T T G A A A T C T G G A A C T G C C T C T G T T G T G T G C C T G C T G A
 A T A A C T T C T A T C C C A G A G A G G C C A A A G T A C A G T G G A A G G T
 G G A T A A C G C C C T C C A A T C G G G T A A C T C C C A G G A G A G T G T C
 A C A G A G C A G G A C A G C A A G G A C A G C A C C T A C A G C C T C A G C A
 G C A C C C T G A C C C T G A G C A A A G C A G A C T A C G A G A A A C A C A A
 A G T C T A C G C C T G C G A A G T C A C C C A T C A G G G C C T G A G C T C G
 C C C G T C A C A A A G A G C T T C A A C A G G G G A G A G T G T T A G T C T A
 G A (配列番号 33)

10

【0470】

5F9/h κ軽鎖タンパク質配列は、以下である。

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L
 S C R A S Q S V S R N L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P A R
 F S G S G S G T E F T L T I G S L Q S E D F A V Y Y C Q Q Y K T W P R T F G Q G
 T N V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P
 R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L
 S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 34)

20

【0471】

以下に列挙される5F9の重鎖及び軽鎖核酸配列を、pTOK58Dベクターに挿入した。

a t g g g a t g g a g c t g t a t c a t c c t c t t c t t g g t a g c a a c a g
 c t a c a g g t g t c c a c t c c g a a a t a g t g a t g a c g c a g t c t c c
 a g c c a c c c t g t c t g t g t c t c c a g g g g a a a g a g c c a c c c t c
 t c c t g c a g g g c c a g t c a g a g t g t t a g c a g a a a c t t a g c c t
 g g t a t c a g c a g a a a c c t g g c c a g g
 c t c c c a g g c t c c t c a t c t a t g g t g c a t c c a c c a g g g c c a c
 t g g a a t c c c a g c c a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g g a c a
 g a g t t c a c t c t c a c c a t c g g c a g c c t g c a g t c t g a a g a t t
 t t g c a g t t t a t t a c t g t c a g c a g t a t a a a a c c t g g c c t c g
 g a c g t t c g g c c a a g g g a c c a a c g t g g a a a t c a a a c g t a c g
 g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a t c t g a t g
 a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t g c c t g c t
 g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a g t g g a a g
 g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g g a g a g t g
 t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a g c c t c a g
 c a g c a c c c t g a c c c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a g a a a c a c
 a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c c t g a g c t
 c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t g t t a g (配
 列番号 35)

30

40

a t g g g a t g g a g c t g t a t c a t c c t c t t c t t g g t a g c a a c a g
 c t
 a c a g g t g t c c a c t c c c a g g t g c a g c t a c a g c a g t g g g g c g
 c a g g a c t g t t g a a g c c t t c g g a g a c c c t g t c c c t c a c c t g
 c g c t g t c t t t g g t g g g t c t t t c a g t g g t t a c t a c t g g a g c

50

t g g a t c c g c c a g c c c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g a t t g
 g g g a a a t c a a t c a t c g t g g a a a c a c c a a c g a c a a c c c g t c
 c c t c a a g a g t c g a g t c a c c a t a t c a g t a g a c a c g t c c a a g
 a a c c a g t t c g c c c t g a a g c t g a g t t c t g t g a c c g c c g c g g
 a c a c g g g c t g t t t a t t a c t g t g c g a g a g a a c g t g g a t a c a c
 c t a t g g t a a c t t t g a c c a c t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t c
 a c c g t c a g c t c a g c c t c c a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c
 c c c t g g c a c c c t c c t c c a a g a g c a c c t c t g g g g g c a c a g c
 g g c c c t g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g
 g t g a c g g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g
 t g c a c a c c t t c c c g g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a
 c t c c c t c a g c a g c g t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t g
 g g c a c c c a g a c c t a c a t c t g c a a c g t g a a t c a c a a g c c c a
 g c a a c a c c a a g g t g g a c a a g a a a g t t g a g c c c a a a t c t t g
 t g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c a g c a c c t g a a
 c t c c t g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c c c c c a a a a c
 c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c a c
 a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a c c c t g a g g t c
 a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c a t a a t g
 c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a a c a g c a c g t a
 c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a c c a g g a c t g g
 c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a a c a a a g
 c c c t c c c a g c c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c a a a g c c a a
 a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c c c t g c c c c c a
 t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c c t
 g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a t c g c c g t g g a
 g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c a a g a c c
 a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t
 a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g c a g g g
 g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t c t g c a c
 a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c c g g g t a
 a a t a a (配列番号 36)

【0472】

以下のA b x - 2 2 9 重鎖及び軽鎖配列をコードする配列を、p T O K 5 8 D ベクターに挿入した。

a t g g a g t t t g g g c t g a g c t g g c t t t t t c t t g t g g c t a t t
 t t a a a a g g t g t c c a g t g t g a g g t g c a g c t g t t g g a g t c t g
 g g g g a g g c t t g g t a c a g c c t g g g g g g t c c c t g a g a c t c t c
 c t g t g c a g c c t c t g g a t t c a c c t t t a g c c g c t a t g c c a t g
 a a c t g g g t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g
 t c t c a g g t a t t a g t g g g a g t g g t g g t a g g a c a t a c t a c g c
 a g a c t c c g t g a a g g g c c g g t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a t
 t c c a a g a a c a c a c t a t a t c t g c a a a t g a a c a g c c t g a g a g
 c c g a g g a c a c g g c c g t a t a t t a c t g t g c g a a a g a t c g c g a
 t t t t t g g a g t g g t c c a t t t g a c t a c t g g g g c c a g g g a a c c
 c t g g t c a c c g t c a g c t c a g c c t c c a c c a a g g g c c c a t c g g
 t c t t c c c c c t g g c a c c c t c c t c c a a g a g c a c c t c t g g g g g
 c a c a g c g g c c c t g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c
 g a a c c g g t g a c g g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a
 g c g g c g t g c a c a c c t t c c c g g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g

a c t c t a c t c c c t c a g c a g c g t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c
 a g c t t g g g c a c c c a g a c c t a c a t c t g c a a c g t g a a t c a c a
 a g c c c a g c a a c a c c a a g g t g g a c a a g a a a g t t g a g c c c a a
 a t c t t g t g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c a g c a
 c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c c c c c
 c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a
 g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a c c c t
 g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c
 a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a a c a g
 c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a c c a g
 g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a
 a c a a a g c c c t c c c a g c c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c a a
 a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c c c t g
 c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c
 t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a t c g c
 c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c
 a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t
 t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a
 g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t
 c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c
 c g g g t a a a t a a (配列番号 37)

a t g a g g c t c c c t g c t c a g c t t c t c
 t t c c t c c t g c t a c t c t g g c t c c c a g a t a c c a c t g g a g a a a
 t a g t g a t g a c g c c g t c t t c a g c c a c c c t g t c t g t g t c t c c
 a g g g g a g a g a g c c a c c c t c t c c t g c a g g g c c a g t c a g a g t
 g t t a g t a g a a a c t t a g c c t g g t a c c a g c a g a a a c c t g g c c
 a g g c t c c c a g g c t c c t c a t c t a t g g t g c a t c c a c c a g g g c
 c a c t g g t a t c c c a g c c a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g g
 a c a g a a t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g t c t g a a g
 a t t t t g c a g t t t a t t a c t g t c a c c a g t a t a g t a a c t g g a t
 g t g c a g t t t t g g c c a g g g g a c c a a g c t g g a g a t c a a a c g t
 a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a t c t g
 a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t g c c t
 g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a g t g g
 a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g g a g a
 g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a g c c t
 c a g c a g c a c c c t g a c c c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a g a a a
 c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c c t g a
 g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t g t t a
 g (配列番号 38)

【0473】

実施例 5：原発性ヒト転移結腸直腸腫瘍における G C C 発現

ウサギモノクローナル抗 G C C 抗体（本明細書において M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 と称される）を開発して、S C I D マウスにおいて m C R C 患者試料由来の 4 つの異なる原発性ヒト腫瘍異種移植片（「P H T X」）における G C C 発現を定量的に評価した（本明細書において P H T X - 0 9 c、P H T X - 2 1 c m、P H T X - 1 7 c、及び P H T X - 1 1 c と称される）。高レベルの G C C 発現を有することが既に確認されている、G C C をトランスフェクトした細胞系に由来する腫瘍異種移植片モデル（H E K 2 9 3 - G C C # 2）を対照として使用した。

【0474】

E p i t o m i c s (B u r l i n g a m e , C A) による R a b M A b (登録商標) サービスを使用して、2つの突然変異した F c 受容体結合領域 (F c R) が F c 受容体結合 (m I g G 2 a F c R m u t I I) を防止するように突然変異させたマウス I g G 2 a F c 領域に融合したヒト G C C の細胞外領域を組み合わせた組み換えタンパク質に対する抗 G C C ウサギモノクローナル抗体を、生成した。免疫付与したウサギから単離した B 細胞を E p i t o m i c s 所有の融合パートナー細胞系と融合させることによって、ウサギ-ウサギハイブリドーマを E p i t o m i c s で生成した (米国特許第 7, 402, 409 号、同第 7, 429, 487 号、同第 7, 462, 697 号、同第 7, 575, 896 号、同第 7, 732, 168 号、及び同第 8, 062, 867 号を参照されたい) 。 G C C に対する抗体の特異性を、E L I S A 及びフローサイトメトリー (F C M) によって試験し、確認した。抗 G C C 抗体の特異性を、E L I S A 及びフローサイトメトリー (F C M) によって試験し、確認した。いくつかのクローンを、免疫組織化学における使用に関してスクリーニングし、M I L - 44 - 148 - 2 クローンを、最適な活性を有するとして選択した。

10

【0475】

軽鎖及び重鎖可変領域の配列を決定した。以下の表 2 1 は、M I L - 44 - 148 - 2 抗 G C C 抗体の可変領域の配列番号の要約である。重鎖及び軽鎖のそれぞれの可変領域のアミノ酸及び核酸配列を、それぞれ、表 2 2 及び 2 3 に示す。

20

【0476】

M I L - 44 - 148 - 2 抗体の重鎖及び軽鎖の C D R のそれぞれのアミノ酸及び核酸配列を、それぞれ、表 2 4 及び 2 5 に示す。

【0477】

【表 2 1 - 1】

表 2 1 : 抗 G C C ウサギ m A b の重鎖及び軽鎖の配列番号の要約

m A b	I g G 鎖	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
M I L - 44 - 14	重鎖	39	40

【表 2 1 - 2】

30

8-2 H2			
M I L - 44 - 14 8-2 L5	軽鎖	41	42

【0478】

M I L - 44 - 148 - 2 H2 核酸 (配列番号 39)

A T G G A G A C T G G G C T G C G C T G G C T T C T C C T G G T C G C T G T G C
T C A A A G G T G T C C A G T G T C A G T C A G T G A A G G A G T C C G G G G G
A G G C C T C T T C A A G C C A A C G G A T A C C C T G A C A C T C A C C T G C
A C C G T C T C T G G A T T C T C C C T C A G T A G T C A T A G A A T G A A C T
G G G T C C G C C A G A C T C C A G G G A A G G G G C T G G A A T G G A T C G C
A A T C A T T A C T C A T A A T A G T A T C A C A T A C T A C G C G A G C T G G
G C G A A A A G C C G A T C C A C C A T C A C C A G A A A C A C C A G C G A G A
A C A C G G T G A C T C T G A A A A T G A C C A G T C T G A C A G C C G C G G A
C A C G G C C A C T T A T T T C T G T G C C A G A G A G G A T A G T A T G G G G
T A T T A T T T T G A C T T G T G G G G C C C A G G C A C C C T G G T C A C C A
T C T C C T C A
G G G C A A C C T A A G G C T C C A T C A G T C T T C C C A C T G G C C C C C T
G C T G C G G G G A C A C A C C C A G C T C C A C G G T G A C C C T G G G C T G
C C T G G T C A A A G G G T A C C T C C C G G A G C C A G T G A C C G T G A C C
T G G A A C T C G G G C A C C C T C A C C A A T G G G G T A C G C A C C T T C C

40

50

CGTCCGTCCGGGCAGTCCCTCAGGCCCTCTACTCGCTGAGCAG
CGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTGACCTGCG
AACGTGGCCCCACCCAGCCACCAACCAAAAGTGGACAAGA
CCGTTTGCGCCCTCGACATGCAAGCAAGCCCAAGTGGCCACC
CCCTGAACCTCCTGGGGGGGACCGTCTGTCTTTCATCTTCCCC
CCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCACGCACCCCCG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCC
CGAGGTGCGAGTTTACATGGTACATAAACCAACGAGCAGGTG
CGCACCGGCCCGGCCCGCTACGGGAGCAGCAGTTTCAACA
GCACGATCCGCGGTGGTCAAGCACCCCTCCCCATCGCGCACCA
GGACTGGCTGAGGGGGCAAGGAGTTTCAAGTGCAAAGTCCAC
AACAAAGGCACCTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAGAGGGCAGCCCTTGGAGCCGAAGGTCTACACCAT
GGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTTCGGTCAGC
CTGACCTGCGATGATCAACGGCTTCTTACCCTTTCGACATCT
CGGTGGAGTGGGAGAAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACCTA
CAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTAC
TTCCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCCAAGAGTGAGTGGC
AGCGGGGGCGACGTCTTCAACCTGCTCCGTGATGCACGAGGC
CTTGCAACAACCACTACACGCAGAAAGTCCATCTCCCGCTCT
CCGGGGTAAATGA

【0479】

MIL-44-148-2 H2アミノ酸（配列番号40）

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESGGGLFKPTDTLTLTC
TVSGFSLSSHRMNWVRQTPGKGLEWIAIIITHNSITYYASW
AKSRSTITRNTSENTVTCLKMTSLTAADTATYFCAREDSMG
YYFDLWGPGLVTISSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSSTVT
LGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSPVRQSSGLYS
LSSVVSVTSSSQPVT CNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT
CPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
DDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPI
AHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKV
YTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAE
DNYKTTTPAVLDS DGSYFLYSKLSVP TSEWQRGDVFTCSVM
HEALHNHYTQKSISRSPGK

【0480】

MIL-44-148-2 L5核酸（配列番号41）

ATGGACACGAGGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGGCTCCTGCG
TGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCTTATGATATGAC
CCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCAACA
GTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAAGAGCATTAGTAACCT
GGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGCAGTCTCCCAA
GCCCCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGGCATCTGGGGGTC
TCATCGCGGTTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTTCA
CTCTCACCATCAGTGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCAC
TTACTACTGT CAGCAGACTTATACTAATAATCATCTTGAT
AATGGTTTTCGGCGGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA
GGTGATCCAGTTTGCACCTACTGTCTCTCATCTTCCCAACAG
CTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCAACCATCGTGTTG
TGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCAACCTGG

GAGGTGGATGGCACCCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACAG
 GTAAACACCGGCAGAAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCT
 CAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAGC
 CACAAAGAGTACACCTGCAGGGGTGACCCAGGGGCACGACCT
 CAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

【0481】

MIL-44-148-2 L5アミノ酸（配列番号42）

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCA YDMTQTPASVEVAVGGT
 VTIKCQASQSISNWLAWYQQKPGQSPKPLIYRASTLASGV
 SSRFRGSGSGTGFTLTISGVECADEAATYYCQQTYTNNHLD
 NGFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTVIVCV
 ANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTGIENSKTPQNSADCTYNLS
 STLTLTSTQYN SHKEYTCRVTTQGTTSVVQS FNRGDC

【0482】

【表22】

表22：抗GCCウサギmAbのmAb可変領域のアミノ酸配列

mAb	IgG鎖	配列番号	アミノ酸配列
MIL-44-148-2	重鎖	43	QSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLS SHRMNWVRQTPGKGLEWIA IITHNSITY YASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTA ADTATYFCAR EDSMGYYFDLWGPGLVT ISS
MIL-44-148-2	軽鎖	44	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSI SNWLAWYQQ KPGQSPKPLIYRASTLASGVSSSRFRGSGS GTQFTLTISGVECADEAATYYC QQTYTNN HLDNGFGGGTEVVVK

【0483】

【表 2 3】

表 2 3 : 抗GCCウサギmAbのmAb可変領域の核酸配列

mAb	I g G 鎖	配列 番号	核酸配列
MIL -44 -14 8-2	重鎖	45	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCT CTTCAAGCCAACGGATACCCTGACACTCA CCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGT AGTCATAGAATGAACTGGGTCCGCCAGAC TCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGCAA TCATTACTCATAATAGTATCACATACTAC GCGAGCTGGGCGAAAAGCCGATCCACCAT CACCAGAAACACCAGCGAGAACACGGTGA CTCTGAAAATGACCAGTCTGACAGCCGCG GACACGGCCACTTATTTCTGTGCCAGAGA GGATAGTATGGGGTATTATTTTGACTTGT GGGGCCCAGGCACCCTGGTCAACCATCTCC TCA
MIL -44 -14 8-2	軽鎖	47	GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTC TGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCACAGTCA CCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATT AGTAACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAA ACCAGGGCAGTCTCCCAAGCCCCTGATCT ACAGGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTC TCATCGCGGTTTCAGAGGCAGTGGATCTGG GACACAGTTCACTCTCACCATCAGTGGCG TGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTAC TGTCAGCAGACTTATACTAATAATCATCT TGATAATGGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGG TGGTGGTCAAA

10

20

【0484】

【表 2 4】

表 2 4 : 抗GCCウサギmAbのCDRのアミノ酸配列

mAb	I g G	配列番号	アミノ酸配列
MIL-44-14 8-2 H2	VH CDR1	49	SHRMN
MIL-44-14 8-2 H2	VH CDR2	50	IITHNSITYYAS WAKS
MIL-44-14 8-2 H2	VH CDR3	51	EDSMGYFFDL
MIL-44-14 8-2 H2	VK CDR1	52	QASQSI SNWLA
MIL-44-14 8-2 H2	VK CDR2	53	RASTLAS
MIL-44-14 8-2 H2	VK CDR3	54	QQTYTNNHLDNG

30

40

【0485】

【表 2 5 - 1】

表 2 5 : 抗 G C C ウサギ m A b の C D R の核酸配列

m A b	I g G	配列番号	核酸配列
M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 H 2	V H C D R 1	5 5	A G T C A T A G A A T G A A C
M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 H 2	V H C D R 2	5 6	A T C A T T A C T C A T A A T A G T A T C A C A T A C T A C G C G A G C T G G G C G A A A A G C
M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 H 2	V H C D R 3	5 7	G A G G A T A G T A T G G G G T A T T A T T T T G A C T T G
M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 H 2	V K C D R 1	5 8	C A G G C C A G T C A G A G C A T T A G T A A C T G G T T A G C C
M I L - 4 4 - 1 4	V K C D R 2	5 9	A G G G C A T C C A C T

10

【表 2 5 - 2】

8 - 2 H 2			C T G G C A T C T
M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 H 2	V K C D R 3	6 0	C A G C A G A C T T A T A C T A A T A A T C A T C T T G A T A A T G G T

20

【 0 4 8 6】

M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 を用いた免疫組織化学

原発性ヒト腫瘍異種移植片のホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）組織における G C C タンパク質レベルを、厚さ 5 μ m の切片において評価し、M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 抗体（3. 5 μ g / m L）とともに V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s（T u c s o n, A Z）D i s c o v e r y X T（登録商標）自動化染色装置において 1 時間インキュベートした。抗体をウサギ抗ヤギ二次抗体（V e c t o r L a b o r a t o r i e s）でビオチニル化し、3, 3'-ジアミノベキシジン（d i a m i n o b e x i d i n e）（D A B）基質マッピングシステム（V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s）展開した。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、A p e r i o 全スライドスキャニングシステムを使用して画像化した。

30

【 0 4 8 7】

図 5 A ～ 5 E は、種々の腫瘍異種移植片モデルにおける I H C アッセイの結果を示す。図 5 A ～ 5 E 全体に示されるように、G C C レベルは、細胞由来 H E K 2 9 3 - G C C 腫瘍異種移植片では 4 +、m C R C 患者に由来する種々の P H T X 腫瘍異種移植片では 1 +、2 +、及び 2 ～ 3 + の範囲に及ぶスコアを有し、原発性ヒト腫瘍異種移植片の間で異なっていた。

【 0 4 8 8】

5 F 9 v c M M A E 免疫複合体を、G C C 発現レベルが腫瘍感受性において役割を果たすかどうかを調査するために、多様な濃度で 4 つの原発性ヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて単一剤の抗腫瘍活性に関して試験した。ヒト I g G 1 モノクローナル抗体を用いて G C C との交差反応性を有さずに無関係の標的に対して作製した M M A E に基づく抗体薬物複合体（図 6 A ～ 6 E において 2 0 9 - v c M M A E と称される）を、陰性対照として使用した。遊離 M M A E もまた、陰性対照として使用した。種々の異種移植片モデルにおける 5 F 9 v c M M A E の用量範囲、投薬スケジュール、及び対応する有効性を、以下の表 2 6 に示す（T / C = 腫瘍 / 対照の体積）。

40

【 0 4 8 9】

【表 2 6 - 1】

表 2 6 : 原発性ヒト腫瘍異種移植片モデルにおける 5 F 9 v c MMA E インビボ有効性研究

モデル	実験数	用量	スケジュール	T/C	P
2 9 3 G C C # 2	2	1. 8 7 5 ~ 7. 5 m g / k g	週 1 回	0. 0 3	< 0. 0 0 1
P H T X - 0 9 c	3	0. 9 3 8 ~ 1 0 m	週 1 回	0. 0 9	< 0. 0

【表 2 6 - 2】

10

		g / k g			0 1
P H T X - 2 1 c	2	3. 7 5 ~ 1 0 m g / k g	週 1 回	0. 2 3	< 0. 0 0 1
P H T X - 1 7 c	2	0. 9 3 8 ~ 1 0 m g / k g	週 1 回	0. 4 6	< 0. 0 5
P H T X - 1 1 c	2	1. 8 7 5 ~ 7. 5 m g / k g	週 1 回及 び週 2 回	週 2 回は 0. 5 週 1 回は 0. 6 2	< 0. 0 5

【0 4 9 0】

20

種々の異種移植片モデルにおける単剤インビボ活性の結果を、6 A ~ 6 E に示す。図 6 A に示されるように、5 F 9 v c MMA E に誘発される強力な抗腫瘍活性が、1. 8 7 5 ~ 1 0 m g / k g (週 1 回 × 3 週間で 1 日目、8 日目、1 5 日目に静脈内投与) の範囲の用量で、上述の I H C アッセイにおいて示されるように比較的高い G C C 抗原密度 (スコア 2 ~ 3 +) を有する P H T X - 0 9 c モデルにおいて見られた。図 6 A にさらに示されるように、免疫複合体の抗腫瘍活性は、7. 5 m g / k g 及び 1 0 m g / k g レベルでの投薬後 (1 5 日目に最終投薬) さらに 3 週間維持された。腫瘍は、およそ 4 0 日目まで再成長を開始しなかった。

【0 4 9 1】

5 F 9 v c MMA E 免疫複合体に対する中等度の感受性が、0. 9 3 7 5 m g / k g ~ 1 0 m g / k g (週 1 回 × 3 週間で 1 日目、8 日目、及び 1 5 日目に静脈内投与) の範囲の用量で、中等度の G C C 抗原密度 (I H C スコア 2 +) を有する P H T X - 1 7 c モデルにおいて見られた (図 6 B)。

30

【0 4 9 2】

中等度から強力なインビボ抗腫瘍活性が、3. 7 5 ~ 1 0 m g / k g (週 1 回 × 4 で 1 日目、8 日目、1 5 日目、及び 2 2 日目に静脈内投与) の範囲の用量で、ある程度予想外に低レベルの抗原発現 (I H C スコア 1 +) が得られた P H T X - 2 1 c モデルにおいて見られた (図 6 E)。図 6 E に示されるように、3. 7 5 m g / k g 及び 1 0 m g / k g の用量が、投薬スケジュール中の腫瘍成長を効果的に予防した。驚くべきことに、抗腫瘍活性は、7. 5 m g / k g レベルでは投薬 (2 2 日目の最終投薬) 後さらに 7 ~ 8 週間維持され、予想外にも 1 0 m g / k g レベルでは投薬後 1 5 週間を超えてさらに長期間維持された。

40

【0 4 9 3】

対照的に、P H T X - 1 1 c モデルは、中等度の G C C 発現 (I H C スコア 2 +) を有するにも関わらず、1. 8 7 5 ~ 7. 5 m g / k g (週 1 回 × 3 週間で 1 日目、8 日目、及び 1 5 日目に静脈内投与) の範囲の用量で、免疫複合体に比較的耐性であった。図 6 C に示されるように、週 1 回 × 3 の投薬スケジュール中または投薬後に、抗腫瘍活性は観察されなかった。より高い濃度での週 2 回の投与は、抗腫瘍有効性にいかなる改善も示さなかった (図 6 D)。

【0 4 9 4】

50

図 7 A は P H T X - 1 1 c モデルにおける G C C 染色を示し、図 7 B は M L N 0 2 6 4 染色を示し（いずれも I H C）、染色パターンが重複していることが確認できる。したがって、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体は、不応性 P H T X - 1 1 c モデルにおいて、G C C に結合することが確認された。腫瘍との対比で血清中の遊離 M M A E レベルもまた評価して、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体が腫瘍によって処理されていること（すなわち、免疫複合体が内部移行され、M M A E が切断されていること）を確実にした。M M A E - 不応性 P H T X - 1 1 c モデル及び感受性 P H T X - 0 9 c 及び H E K 2 9 3 G C C # 2 モデルにおける遊離 M M A E の血清及び腫瘍レベルの比較を、以下の表 2 7 に示す。薬物の存在が、投薬中及び投薬後に腫瘍内で確認された。さらに、この腫瘍モデルにおける遊離 M M A E レベルは、免疫複合体に感受性であった腫瘍異種移植片モデルにおいて見られたレベルと同じであった。これらの結果は、5 F 9 v c M M A E に不応性の前臨床モデル、例えば、P H T X - 1 1 c モデルが、抗 G C C A D C に効果的に結合し、それを処理することを示す。

10

【0495】

【表 2 7】

表 2 7

MMAE		2 9 3 G C C # 2	P H T X - 1 1 c	P H T X - 9 C
AUC _{inf} (時間 * n g /mL)	血清	5 6 . 3	4 4 . 1	6 8 . 3
AUC _{inf} (時間 * n g /mL)	腫瘍	2 4 9 5 3	1 3 4 0 0	8 6 7 0
	腫瘍 / 血清	4 4 3	3 0 4	1 2 7

20

【0496】

発癌性突然変異状態もまた、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体に対する腫瘍感受性における可能性のある要因として考慮した。試験した種々の異種移植片モデルの遺伝子型を、以下の表 2 8 に示す。表 2 9 は、種々の腫瘍異種移植片モデルの抗原密度、突然変異状態、投薬レジメン、及びインビボでの有効性を要約する。5 F 9 v c M M A E 免疫複合体に対する感受性は、図 6 A ~ 6 D に示されるように、部分的には抗原密度によって左右されると見られるが、それは、発癌性突然変異状態から独立していると思われる。不応性 P H T X - 1 1 c モデルが、感受性 P H T X - 0 9 c 及び P H T X 1 7 c モデルとは異なる K R A S 突然変異を示すことに留意されたい。理論によって束縛されることを意図するものではないが、K R A S におけるコドン 1 2 及びコドン 6 1 の突然変異の間に既知の生物学的区別は存在せず、本発明者らは、これらの突然変異を有する細胞が、インビトロ細胞毒性アッセイにおいて 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体に感受性であることを示している。

30

【0497】

40

【表 28】

表 28：腫瘍異種移植片モデルの突然変異状態

	PHTX-09 c	PHTX-11 c	PHTX-17 c	PHTX-21 c
p110	野生型	野生型	野生型	545E>K/ E
BRAF	野生型	野生型	野生型	600V>E/ V
EGFR	野生型	野生型	野生型	野生型
AKT	野生型	野生型	野生型	野生型
KRAS	12G>D/G	61Q>H	12G>G/C	野生型
NRAS	野生型	野生型	野生型	野生型
HRAS	野生型	野生型	野生型	野生型
P53	120K>E	273R>C	野生型	野生型

10

【0498】

要約すると、5F9 vcMMAEが誘発する抗腫瘍活性は、腫瘍内の抗原密度に部分的に依存すると見られる。高いGCC抗原密度を有する異種移植片腫瘍モデル（293HEK GCC#2及びPHTX-09c）は、免疫複合体に対して高度に感受性であることが示されたが、一方で、低い抗原密度レベルを有する異種移植片モデルは、免疫複合体の腫瘍内でのGCCへの結合及び効果的な腫瘍処理を確認したにも関わらず免疫複合体に耐性であったPHTX-11cモデルを除き、相対的に中等度に感受性であった。PHTX-11cモデルにおける耐性の機序について、さらに探求する。

20

【表 29】

表 29：GCC抗原密度、突然変異状態、投薬スケジュール、及びインビボでの有効性の要約

異種移植片 モデル	GCC I HCスコア	遺伝子型	投薬スケ ジュール	腫瘍／対照の 体積	P値（T ／C）
293GCC C#2	4+	NA	週1回	0.03	<0.0 01
PHTX- 09c*	2-3+	kRas G12D, p 53mu	週1回	0.09	<0.0 01
PHTX- 21c*	1+	bRaf V600E、 p110a E545K	週1回	0.23	<0.0 01
PHTX- 17c*	2+	kRas G12C	週1回	0.46	<0.0 5
PHTX- 11c*	2+	kRas Q61H	週1回及 び週2回	週2回は0. 5～週1回は 0.62	<0.0 5

30

【0499】

実施例 6：抗GCC免疫複合体及びCPT-11（イリノテカン）の組み合わせ投与のインビボ評価

40

この研究の目的は、実施例 5 に記載される 4 つの原発性ヒト腫瘍異種移植片モデル（PHTX-09c、PHTX-21c、PHTX-17c、及びPHTX-11c）において、5F9 vcMMAE免疫複合体（本明細書において「MLN0264」とも称される）及びCPT-11（トポイソメラーゼⅡ阻害剤、イリノテカンまたはCamptosar（登録商標）としても知られる）の組み合わせ投与によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を評価することであった。研究を以下のように行った。

【0500】

PHTX-09C皮下異種移植片を保持する雌性CB-17 SCIDマウスに静脈内投与した5F9 vcMMAE及びCPT-11の抗腫瘍活性（研究番号CPGC-11-EF07）

50

実施例 5 に示されるように、PHTX-09c モデルは、種々の濃度で 5F9 v c MMAE 免疫複合体の単一剤活性に高度に感受性であった。この研究の目的は、CPT-11 と組み合わせた 5F9 v c MMAE 免疫複合体を評価することであった。より具体的には、この研究の目標は、PHTX-09c 皮下異種移植片 CB17 SCID マウスにおいて、2 日投薬／5 日休薬の投薬スケジュールで静脈内投与される 10 mg / kg の CPT-11 と組み合わせた、週 1 回の投薬スケジュールでの 1.875 及び 3.75 mg / kg の 5F9 v c MMAE の抗腫瘍活性を評価することであった。用量製剤を表 30 に従って調製した。研究設計を表 31 に示す。

【0501】

【表 30】

表 30：用量製剤の調製

薬剤	用量	量（液体 ml）	投薬溶液濃度（mg / mL）	ビヒクル	薬物：抗体
5F9 v c MMAE (MLN0264)	1.875 mg / kg		0.375	0.9%生理食塩水	4
5F9-v c MMAE (MLN0264)	3.75 mg / kg	0.316	0.75	0.9%生理食塩水	4
CPT-11	10.0 mg / kg	0.35	2	0.9%生理食塩水	該当なし

【0502】

【表 31-1】

表 31：CPGC-11-EF07 研究設計

群	マウス数 / 群	まず ADC	スケジュール	CPT-11	スケジュール	期間
1	10	ビヒクル 静脈内	週 1 回 1 日目		1 日目、2 日目 × 3 週間	1 週目、2 週目、3 週目
2	10	MLN0264 1.875 mg / kg 静脈内	週 1 回 1 日目			1 週目、2 週目、3 週目
3	10	MLN0264 3.75 mg / kg 静脈内	週 1 回 1 日目			1 週目、2 週目

【表 31-2】

		5 mg / kg 静脈内	1 日目			目、3 週目
4	10			10 mg / kg	1 日目、2 日目 × 3 週間	1 週目、2 週目、3 週目
5	10	MLN0264 1.875 mg / kg 静脈内	週 1 回 1 日目	10 mg / kg	1 日目、2 日目 × 3 週間	1 週目、2 週目、3 週目
6	10	MLN0264 3.75 mg / kg 静脈内	週 1 回 1 日目	10 mg / kg	1 日目、2 日目 × 3 週間	1 週目、2 週目、3 週目

【0503】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の 10% に達するか、または b) 体重減少が 20% を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、200 mm³ であった。

【0504】

投薬前 1 日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、25～30 ゲージ、長さ 1 / 2 ～ 3 / 4 インチの 1 cc のシリンジを使用しておよそ 0.1

10

20

30

40

50

ml の用量を静脈内投与で受容させた。動物に、20 グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

【0505】

ノギス (0.01 mm) を使用して腫瘍体積の測定値を週 2 回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$V = W^2 \times L / 2$ (V = 腫瘍体積、 W = 腫瘍の単軸に沿って測定した幅、 L = 腫瘍の短軸に沿って測定した長さ)。体重測定値もまた、Mettler 計量器 (0.1 g) を使用して週 2 回取得した。

【0506】

有効性を、腫瘍成長阻害 (TGI) % 及び腫瘍成長遅延 (TGD) に関して評価した。TGI は、次の式を使用して任意の日 (対照の最大腫瘍体積 (MTV が最大許容可能腫瘍体積に達したとき) に評価した： $TGI = 100 - [処置 MTV / 対照 MTV] \times 100$ 。

【0507】

TGD は、 $T - C$ を計算することによって評価し、式中、 T = 処置群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間 (日数) であり、 C = 対照群の腫瘍が所定の寸法 (例えば、1,000 mm³) に達する平均時間 (日数) である。

【0508】

図 8 A に示されるように、用量は、すべての処置群で十分に耐容された。種々の治療群の平均腫瘍体積曲線を、図 8 B に示す。投薬を終えた後の腫瘍再成長動態を、図 8 C に示す。研究の結果を表 3 2 に要約する。

【0509】

【表 3 2】

表 3 2 : CPGC-11-EF07 研究の結果

群	平均腫瘍体積 ± 標準誤差 (mm ³)	TGI	1000 mm ³ 3 までの日数	TGD	T/C
ビヒクル	1085.1 ± 114.1		21.8	0	
ML0264 1. 875 mg/kg	888.5 ± 126.2	18.1	> 23		0.8 2
ML0264 3. 75 mg/kg	861.1 ± 155.9	20.6	> 23		0.7 9
CPT-11 10 mg/kg	430.6 ± 88.1	60.3	> 23		0.4
ML0264 1. 875 mg/kg					
CPT-11 10 mg/kg	269.4 ± 32.2	75.2	> 23		0.2 5
ML0264 3. 75 mg/kg					
PT-11 10m g/kg	178.1 ± 11.98 3.6	83.6	> 23		0.1 6

【0510】

混合効果線形回帰モデルを使用して CPGC-11-EF07 研究の縦断的分析を行って、5F9 vcMMAE 免疫複合体及び CPT-11 の組み合わせ抗腫瘍有効性が、相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。すべての腫瘍値 (腫瘍体積または光子束) は、log₁₀ 変換前にそれらに 1 の値が加算された。これらの値を、処置群全体で比較して、経時的な傾向における差が統計学的に有意であるかどうかを評価した。処置群の対を比較するために、最大尤度法を使用して、以下の混合効果線形回帰モデルをデータに当てはめた：

【数 1】

$$Y_{ijk} - Y_{i0k} = Y_{i0k} + \text{処置}_i + \text{日}_j + \text{日}^2_j + (\text{処置} \times \text{日})_{ij} + (\text{処置} \times \text{日}^2)_{ij} + e_{ijk} \quad (1)$$

式中、 Y_{ijk} は、 i 番目の処置における k 番目の動物の j 番目の時点での $\log_{10}$ 腫瘍体積であり、 Y_{i0k} は、 i 番目の処置での k 番目の動物における 0 日目（ベースライン）の $\log_{10}$ 腫瘍体積であり、 j 日目は、平均が中央な時点であり（ ^2_j とともに）は連続する変数として扱われ、 e_{ijk} は残余誤差である。空間べき乗則共分散行列（*spatial power law covariance matrix*）を使用して、長時間の同じ動物に対する反復測定を説明した。相互作用項ならびに 日^2_j の項は、それらが統計学的に有意でなかった場合、除外した。

10

【0511】

尤度比試験を用いて、所与の処置群対が、統計学的に有意な差を示したかどうかを評価した。完全モデルの $-2 \log$ 尤度を、いずれの処置項も有さない（縮小モデル）と比較し、カイ二乗検定を使用して値の差を試験した。試験の自由度を、完全モデルの自由度と縮小モデルの自由度との間の差として計算した。

$\log$ 腫瘍値の予測差（ $Y_{ijk} - Y_{i0k}$ 、 $\log_{10}$ （0 日目からの倍変化）として解釈され得る）を、上述のモデルから取得して、各処置群について平均 AUC 値を計算した。次いで、 $dAUC$ 値を次のように計算した。

【数 2】

$$dAUC = \frac{\text{平均}(AUC_{ctl}) - \text{平均}(AUC_{trt})}{\text{平均}(AUC_{ctl})} * 100 \quad (2)$$

20

これは、 AUC_{ctl} が正の値であると想定した。 AUC_{ctl} が負であった場合、上述の式に -1 を乗ずる。

【0512】

相乗性分析のために、 $\log$ 腫瘍値の観測された差を使用して、各動物の AUC 値を計算した。処置群の動物が研究から除外された場合、最後に観測された腫瘍値を、すべての後続の辞典にわたって繰り越した。対照またはビヒクル群の AUC は、上述の対モデルから予測された値を使用して計算した。組み合わせ治療の効果が、個別の治療と比較して相乗的、相加的、または亜相加的（*sub-additive*）であったかどうかという問題に取り組むために、以下の統計値を計算した。

30

【数 3】

$$Frac_{A_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{A_k}}{AUC_{ctl}} \quad (3)$$

$$Frac_{B_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{B_k}}{AUC_{ctl}} \quad (4)$$

$$Frac_{AB_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{AB_k}}{AUC_{ctl}} \quad (5)$$

40

$$\text{相乗性スコア} = (\text{平均}(Frac_A) + \text{平均}(Frac_B) - \text{平均}(Frac_{AB})) * 100 \quad (6)$$

式中、 A_k 及び B_k は、個別処置群における k 番目の動物であり、 AB_k は、組み合わせ処置群における k 番目の動物である。 AUC_{ctl} は、対照群のモデル予測 AUC であり、変動性がなく一定であるとして処理した。組み合わせ治療の効果は、相乗性スコアが 0 未満であれば相乗的、相乗性スコアが 0 と等しければ相加的、相乗性スコアが 0 を超えれば亜相加的であると見なした。相乗性スコアの標準誤差は、群 A、B、及び AB にわたる標準誤差二乗の和の平方根として計算した。自由度は、*Welch-Satterthwaite* 方程式を使用して推定した。P 値を、相乗性スコアをその標準誤差で除すことによって計算し、上で計算した自由度を用いて t - 分布（両側）に対して試験した。

50

【0513】

この研究の予備的性質を考慮して、多重比較及び試験したエンドポイントについて、事前に指定された調整は存在しなかった。0.05未満のすべてのP値は、この分析において統計学的に有意と称された。

【0514】

表33は、群の記号に対する注釈の表である。表34は、対での比較の結果を挙げる。dAUCは、参照群のものと比較した、処置AUCで観察された減少パーセントである。負のdAUCは、参照と比較したAUCの増加として解釈される。P値だけでなく、dAUCの評価も行うことが重要である。有意なP値を有するがdAUC値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

10

【0515】

表35は、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ（「相乗」）を示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、亜相加的またはアンタゴニスト的組み合わせ（「アンタゴニスト」）を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的（「相加」）となるはずである。

【0516】

【表33】

表33：注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0.9パーセント生理食塩水	V
2 ML0264 1.875mg/kg/264	A
3 ML0264 3.75mg/kg/264	B
4 CPT-11 10mg/kg/CPT-11	C
5 ML0264 1.875mg/kg CPT-11 1 10mg/kg/CPT-11+264	D
6 ML0264 3.75mg/kg CPT-11 10mg/kg/CPT-11+264	E

20

【0517】

【表34】

表34：対での比較の結果

参照	処置	dAU C	P値
1 V	A	16.1	0.077
2 V	B	25.4	<0.001
3 V	C	49.5	<0.001
4 V	D	77.6	<0.001
5 V	E	104.7	<0.001

30

40

【0518】

【表35-1】

表35：組み合わせ分析の結果

スコア	平均 誤差	P値	評価
D -1	1	0.4	相加

【表 3 5 - 2】

	0. 5	4.	7 4	
		5		
E	- 3	1	0. 0	相乗
	2. 5	2.	1 7	
		4		

【0 5 1 9】

表 3 5 に示されるように、相乗的活性は、3. 7 5 m g / k g 用量の免疫複合体を週 1 回 × 3 週間で静脈内投与し、1 0 m g / k g 用量の C P T - 1 1 を 1 日目及び 2 日目（2 日投薬、5 日休薬のスケジュール）に静脈内投与する投薬レジメンを使用して達成された。より低い 1. 8 7 5 m g / k g 用量の免疫複合体を週 1 回静脈内投与し、それと組み合わせて 1 0 m g / k g の C P T - 1 1 を 2 日投薬 5 日休薬のスケジュールにおいて 3 週間静脈内投与することにより、相加効果がもたらされた。

【0 5 2 0】

図 8 B 及び 8 C に示されるように、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体及び C P T - 1 1 の両方が、比較的高度な G C C 抗原密度（I H C スコア 2 ~ 3 +）を有することが示されたモデルである P H T X - 0 9 c モデルにおいて、それぞれ強力及び中等度の単一剤活性を有した。驚くべきことに、各剤の個別の有効性は、準最適濃度の免疫複合体を用いる投薬レジメンで 2 つの薬剤を組み合わせる投与することによってさらに改善することができた。免疫複合体と C P T - 1 1 との組み合わせは、組み合わせの投薬レジメンの際に腫瘍の成長を防止するように作用し、さらに、投薬を終えた後（最終投薬は 1 5 日目）さらに 3 ~ 4 週間、腫瘍再成長を防止した。

【0 5 2 1】

P H T X - 2 1 C 皮下異種移植片を保持する雌性 C B - 1 7 S C I D マウスに静脈内投与した M L N 0 2 6 4、C P T - 1 1 の抗腫瘍活性（研究番号 C P G C - 1 1 - 0 4）

実施例 5 に示されるように、P H T X - 2 1 c モデルは、低い G C C 抗原密度レベル（I H C スコア 1 +）を有するにも関わらず、種々の濃度で 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体の単一剤活性に対して中等度に感受性であった。この研究の目的は、P H T X - 2 1 c モデルにおける 5 F 9 v c M M A E 及び C P T - 1 1 の抗腫瘍活性を評価することであった。上述の C P G C - 1 1 - 0 7 研究で示されるように、3. 7 5 m g / k g 用量の免疫複合体を週 1 回静脈内投与し、それと組み合わせて 1 0 m g / k g 用量の C P T - 1 1 を 2 日投薬 5 日休薬のスケジュールで静脈内投与することにより、相乗的活性がもたらされた。C P G C - 1 1 - 0 7 研究から習得したことを適用し、C P T - 1 1 のさらなる投薬レジメンを探求して、週 1 回の投薬スケジュールにおける 3. 7 5 m g / k g の 5 F 9 v c M M A E の投与を、2 日投薬 / 5 日休薬の投薬スケジュールの 1 0 m g / k g または 1 5 m g / k g の C P T - 1 1、及び週 1 回のスケジュールの 3 0 m g / k g と組み合わせて、P H T X - 2 1 c モデルにおいて評価した。用量製剤を表 3 6 に従って調製した。研究設計を表 3 7 に示す。

【0 5 2 2】

【表 3 6】

表 3 6 : 用量製剤の調製

薬剤	用量	量 (液体 m l)	投薬溶液濃度 (m g / m L)	ビヒクル	薬物 : 抗体
5 F 9 v c MMAE (MLN 0 2 6 4)	3. 7 5 m g / k g	0. 4 6 5	0. 6 9 7 5	0. 9 % 生 理食塩水	3. 9
C P T - 1 1	1 0. 0 m g / k g		1. 8 6	0. 9 % 生 理食塩水	
C P T - 1 1	1 5. 0 m g / k g		2. 7 9	0. 9 % 生 理食塩水	
C P T - 1 1	3 0. 0 m g / k g	1. 0 6 0 2	5. 5 8	0. 9 % 生 理食塩水	

10

【0 5 2 3】

1 5 m g / k g の投薬溶液を、3 0 m g / k g の投薬溶液の 1 : 1 希釈によって調製した。1 0 m g / k g の投薬溶液を、1 5 m g / k g の投薬溶液の 2 : 1 希釈によって調製した。

【0 5 2 4】

20

【表 3 7 - 1】

表 3 7 : C P G C - 1 1 - E F 0 4 研究設計

群	マウス 数 / 群	A D C	スケジ ュール	C P T - 1 1 静脈内	スケジ ュール	C P T - 1 1 週合計	期間
1	9	ビヒクル 静脈内	週 1 回 1 日目		1 日目 、 2 日 目	0	1 週目、 2 週目
2	9	MLN 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g 静脈内	週 1 回 1 日目			0	1 週目、 2 週目
3	9			1 0 m g / k g	1 日目 、 2 日 目、 1 日 1 回	2 0	1 週目、 2 週目
4	9			1 5 m g / k g	1 日目 、 2 日 目、 1 日 1 回	3 0	1 週目、 2 週目
5	9			3 0 m g / k g	週 1 回 1 日目	3 0	1 週目、 2 週目
6	9	MLN 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g 静脈内	週 1 回 1 日目	1 0 m g / k g	1 日目 、 2 日 目、 1 日 1 回	2 0	1 週目、 2 週目

30

40

【表 37-2】

群	マウス数／群	ADC	スケジュール	CPT-1 1 静脈内	スケジュール	CPT-1 1 週合計	期間
7	9	MLN0264 3.75 mg / kg 静脈内	週1回 1日目	15 mg / kg	1日目、2日目、 1日1回	30	1週目、 2週目
8	9	MLN0264 3.75 mg / kg 静脈内	週1回 1日目	30 mg / kg	週1回 1日目	30	1週目、 2週目

10

【0525】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の10%に達する、またはb) 体重減少が20%を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、200 mm³であった。

【0526】

投薬前1日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、27～30ゲージ、長さ1/2～3/4インチの1ccのシリンジを使用しておよそ0.1 mlの用量を静脈内投与で受容させた。動物に、18.6グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

20

【0527】

ノギス(0.01 mm)を使用して腫瘍体積の測定値を1週間に2回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$V = W^2 \times L / 2$ (V = 腫瘍体積、W = 腫瘍の単軸に沿って測定した幅、L = 腫瘍の短軸に沿って測定した長さ)。体重測定値もまた、Mettler計量器(0.1 g)を使用して1週間に2回取得した。

【0528】

有効性を、腫瘍成長阻害(TGI)%及び腫瘍成長遅延(TGD)に関して評価した。TGIは、次の式を使用して任意の日(対照の最大腫瘍体積(MTVが最大許容可能腫瘍体積に達したとき)に評価した： $TGI = 100 - [処置MTV / 対照MTV] \times 100$ 。

30

【0529】

TGDは、T-Cを計算することによって評価し、式中、T = 処置群の腫瘍が所定の寸法(例えば、1,000 mm³)に達する平均時間(日数)であり、C = 対照群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間(日数)である。

【0530】

図9Aに示されるように、用量は、すべての処置群で十分に耐容された。種々の治療群の平均腫瘍体積曲線を、図9Bに示す。図8Bに示されるように、免疫複合体は、3.75 mg/kg用量で単一剤として比較的低い抗腫瘍活性を有したが、一方でCPT-11は、投与した2つのより低い用量で中等度から高い単一剤活性を有した。腫瘍再成長動態曲線を図9Cに示す。図9B及び9Cに示されるように、投薬中の腫瘍体積及び投薬後の腫瘍再成長が所定の体積1000 mm³に達するまでの日数に関して、10 mg/kgの及び15 mg/kgのCPT-11群との組み合わせ処置群間に差はなかった。いずれの投薬レジメンも、投薬中の腫瘍成長を効果的に防止しただけでなく、驚くべきことに投薬後の腫瘍体積における低減も誘発した(図9Bを参照されたい)。いずれの投薬レジメンも、投薬後さらに5週間、腫瘍再成長を防止するのに有効であった。腫瘍は、およそ50日目まで再成長を開始しなかった。研究の結果を表38に要約する。

40

【0531】

【表 38】

表 38 : CPGC-11-EF04 研究の結果

群	平均腫瘍体積±標準誤差 (mm ³)	TGI	1000m m ³ 3 まで の日数	T G D	T/C
ビビクル	1365.1±115.8		11.1	0	
ML0264 3.75 mg/kg	869.1±105.2	36.3	>15		0.64
CPT-11 10mg /kg	294.2±29.6	78.4	>15		0.22
CPT-11 15mg /kg	212.9±18.9	84.4	>15		0.16
CPT-11 30mg /kg	508.3±49.4	62.8	>15		0.37
ML0264 3.75 mg/kg CPT11 10mg/kg	61.9±7.2	95.5	>15		0.05
ML0264 3.75 mg/kg CPT-1 1 15mg/kg	58.6±7	95.7	>15		0.04
ML0264 3.75 CPT-11 30mg /kg	207.9±20	84.8	>15		0.15

【0532】

混合効果線形回帰モデルを使用して CPGC-11-EF04 研究の縦断的分析を行って、5F9 vcMMAE 免疫複合体及び CPT-11 の組み合わせ抗腫瘍有効性が、相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。すべての腫瘍値（腫瘍体積または光子束）は、 $\log_{10}$ 変換前にそれらに 1 の値が加算された。これらの値を、処置群全体で比較して、経時的な傾向における差が統計学的に有意であるかどうかを評価した。処置群の対を比較するために、最大尤度法を使用して、以下の混合効果線形回帰モデルをデータに当てはめた：

【数 4】

$$Y_{ijk} - Y_{i0k} = Y_{i0k} + \text{処置}_i + \text{日}_j + \text{日}^2_j + (\text{処置} * \text{日})_{ij} + (\text{処置} * \text{日}^2)_{ij} + e_{ijk} \quad (1)$$

式中、 Y_{ijk} は、 i 番目の処置における k 番目の動物の j 番目の時点での $\log_{10}$ 腫瘍体積であり、 Y_{i0k} は、 i 番目の処置での k 番目の動物における 0 日目（ベースライン）の $\log_{10}$ 腫瘍体積であり、 j 日目は、平均が中央な時点であり（ ^2_j とともに）は連続する変数として扱われ、 e_{ijk} は残余誤差である。空間べき乗則共分散行列を使用して、長時間の同じ動物に対する反復測定を説明した。相互作用項ならびに 日^2_j の項は、それらが統計学的に有意でなかった場合、除外した。

【0533】

尤度比試験を用いて、所与の処置群対が、統計学的に有意な差を示したかどうかを評価した。完全モデルの $-2 \log$ 尤度を、いずれの処置項も有さない（縮小モデル）と比較し、カイ二乗検定を使用して値の差を試験した。試験の自由度を、完全モデルの自由度と縮小モデルの自由度との間の差として計算した。

【0534】

$\log$ 腫瘍値の予測差（ $Y_{ijk} - Y_{i0k}$ 、 $\log_{10}$ （0 日目からの倍変化）として解釈され得る）を、上述のモデルから取得して、各処置群について平均 AUC 値を計算した。次いで、dAUC 値を次のように計算した。

【数 5】

$$dAUC = \frac{\text{平均}(AUC_{ctl}) - \text{平均}(AUC_{trt})}{\text{平均}(AUC_{ctl})} * 100 \quad (2)$$

これは、 AUC_{ctl} が正の値であると想定した。 AUC_{ctl} が負であった場合、上述の式に -1 を乗ずる。

【0535】

相乗性分析のために、 $\log$ 腫瘍値の観測された差を使用して、各動物の AUC 値を計算した。処置群の動物が研究から除外された場合、最後に観測された腫瘍値を、すべての後続の辞典にわたって繰り越した。対照またはビヒクル群の AUC は、上述の対モデルから予測された値を使用して計算した。組み合わせ治療の効果が、個別の治療と比較して相乗的、相加的、または垂相加的であったかどうかという問題に取り組むために、以下の統計値を計算した。

【数 6】

$$Frac_{A_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{A_k}}{AUC_{ctl}} \quad (3)$$

$$Frac_{B_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{B_k}}{AUC_{ctl}} \quad (4)$$

$$Frac_{AB_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{AB_k}}{AUC_{ctl}} \quad (5)$$

$$\text{相乗性スコア} = (\text{平均}(Frac_A) + \text{平均}(Frac_B) - \text{平均}(Frac_{AB})) * 100 \quad (6)$$

式中、 A_k 及び B_k は、個別処置群における k 番目の動物であり、 AB_k は、組み合わせ処置群における k 番目の動物である。 AUC_{ctl} は、対照群のモデル予測 AUC であり、変動性がなく一定であるとして処理した。相乗性スコアの標準誤差は、群 A 、 B 、及び AB にわたる標準誤差二乗の和の平方根として計算した。自由度は、Welch-Satterthwaite 方程式を使用して推定した。仮説検定を行って、相乗性スコアが 0 とは異なったかどうかを判定した。P 値を、相乗性スコアをその標準誤差で除すことによって計算し、上で計算した自由度を用いて t -分布（両側）に対して試験した。

【0536】

効果を 4 つの異なるカテゴリに分類した。相乗性スコアが 0 未満であれば相乗的、相乗性スコアが統計学的に 0 と異なる場合は相加的であると見なした。相乗性スコアが 0 を超えるが、組み合わせの平均 AUC が 2 つの単一剤処置間の低い方の AUC よりも低い場合、組み合わせは垂相加的であった。相乗性スコアが 0 を超え、組み合わせの平均 AUC が単一剤処置のうちの少なくとも 1 つの平均 AUC よりも高い場合、組み合わせはアンタゴニスト性であった。

【0537】

要求があった場合、区間解析には、別の処置群及び時間間隔と比較した指定の処置群及び時間間隔が含まれた。所与の群、時間間隔、及び動物について、1 日当たりの腫瘍成長率を

【数 7】

$$\text{腫瘍成長率} = 100 * (10^{\Delta Y / \Delta t} - 1) \quad (7)$$

によって推定し、式中、 ΔY は、目的の間隔にわたる $\log_{10}$ 腫瘍体積の差であり、 Δt は、時間間隔の長さである。これらの時点のうち的一方または両方が欠けている場合、その動物は無視した。次いで、動物全体の平均率を、不等分散を有する対応のない両側 t 検定を使用して比較した。

【0538】

この研究の予備的性質を考慮して、多重比較及び試験したエンドポイントについて、事前に指定された調整は存在しなかった。0.05 未満のすべての P 値は、この分析におい

て統計学的に有意と称された。

【0539】

表39は、群の記号についての注釈表である。表40は、対での比較の結果を挙げる。dAUCは、参照群のものと比較した、処置AUCで観察された減少パーセントである。負のdAUCは、参照と比較したAUCの増加として解釈される。P値だけでなく、dAUCの評価も行うことが重要である。有意なP値を有するがdAUC値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

【0540】

表41は、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ（「相乗」）を示す。統計学的に優位な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも良好に機能する（すなわち、より低いAUCを有する）、垂相加的組み合わせ（「垂相加」）を示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも悪く働く、アンタゴニスト性組み合わせ（「アンタゴニスト」）を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的（「相加」）と見なされるべきである。

【0541】

【表39】

表39：注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0.9パーセント生理食塩水	V
2 ML0264 3.75mg/kg/264	A
3 CPT-11 10mg/kg/CPT-11	B
4 CPT-11 15mg/kg/CPT-11	C
5 CPT-11 30mg/kg/CPT-11	D
6 ML0264 3.75mg/kg CPT11 10mg/kg/CPT-11+264	E
7 ML0264 3.75mg/kg CPT-1 1 15mg/kg/CPT-11+264	F
8 ML0264 3.75 CPT-11 30m g/kg/CPT-11+264	G

【0542】

【表40】

表40：対での比較の結果

参照	処置	dAU C	P値
1 V	A	25.1	<0.001
2 V	B	90.9	<0.001
3 V	C	103.1	<0.001
4 V	D	56.2	<0.001
5 V	E	169.7	<0.001
6 V	F	173.7	<0.001
7 V	G	106.1	<0.001

【0543】

【表 4 1】

表 4 1：組み合わせ分析の結果

処置群		スコア	平均誤差	P 値	評価
E	ML 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 0 m g / k g (1 日 目、2 日 目 / 週)	- 6 2. 7	1 7. 3	0. 0 0 3	相乗
F	ML 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 5 m g / k g (1 日 目、2 日 目 / 週)	- 7 0. 0	1 7. 3	0. 0 0 1	相乗
G	ML 0 2 6 4 3. 7 5 (週 1 回) C P T - 1 1 3 0 m g / k g 1 日 目 / 週 1 回	- 1 2. 7	9. 1	0. 1 7 8	相加

10

【0 5 4 4】

表 4 1 に示されるように、相乗的活性が、ML N 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 0 m g / k g (1 日 目、2 日 目 / 週) (群 E) 及び ML 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 5 m g / k g (1 日 目、2 日 目 / 週) (群 F) の処置群全体で達成された。相加効果は、C P T - 1 1 に代替的なスケジュール (1 週間につき 1 日 目及び 2 日 目とは対照的に、週 1 回) を用いた第 3 の処置群 G で見られた。いかなる理論にも束縛されることを意図するものではないが、この代替的な投薬スケジュールは、組み合わせの相加的対相乗的效果に影響を有した可能性がある。また、C P T - 1 1 の用量もこの処置群ではより高かった。

20

【0 5 4 5】

要約すると、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体及び C P T - 1 1 の組み合わせは、1 週間の 1 日 目及び 2 日 目に投薬するスケジュールにおいて、異なる投薬レベルで、抗原発現の低い P H T X - 2 1 c モデルにおいて意外にも良好に機能した。薬剤の組み合わせは、投薬中に腫瘍成長を防止しただけでなく、意外にも投薬後に腫瘍寸法を低減させた。この組み合わせはまた、投薬を終えた後予想外に長期間の間、腫瘍再成長を防止した。本明細書に示されるように、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体は、腫瘍を DNA 損傷活性に対して感受性にするように機能し、結果として、2 つの薬剤が準最適用量で相乗的に機能するようになった。

30

【0 5 4 6】

P H T X - 1 7 C 皮下異種移植片を保持する雌性 C B - 1 7 S C I D マウスに静脈内投与した ML N 0 2 6 4、C P T - 1 1 の抗腫瘍活性 (研究番号 C P G C - 1 1 - E F 0 6)

上述のように、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体及び C P T - 1 1 の組み合わせ投与は、免疫複合体の単一剤活性に対する中等度から高度な感受性を有するが、大幅に異なる G C C 抗原レベルを有する、2 つの原発性ヒト腫瘍異種移植片モデル (I H C スコア 2 ~ 3 + を有する P H T X - 0 9 c、I H C スコア 1 + を有する P H T X - 2 1 c) において、相乗的活性を有することが上で示された。この研究の目的は、中等度のレベルの G C C 抗原密度及び免疫複合体単独に対する中等度の感受性を有するモデルにおける組み合わせ活性を評価することであった。実施例 5 に示されるように、P H T X - 1 7 c モデルは、中等度の抗原発現 (I H C スコア 2 +) 及び 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体の単一剤活性に対する中等度の感受性を示す。したがって、P H T X - 1 7 c モデルを使用して、週 1 回の投薬スケジュールにおいて 3. 7 5 m g / k g の 5 F 9 v c M M A E (静脈内) を、2 日投薬 / 5 日休薬のスケジュールで静脈内投与される 1 0 m g / k g または 1 5 m g / k g の C P T - 1 1 と組み合わせで評価した。用量製剤を表 4 2 に従って調製した。研究設計を表 4 3 に示す。

40

【0 5 4 7】

【表 4 2】

表 4 2 : 用量製剤の調製

薬剤	用量	量 (液体m l)	投薬溶液濃度 (mg/mL)	ビヒクル	薬物：抗体
5F9 vcMM AE (MLN02 64)	7.5mg/kg	1.13	1.538	0.9%生理 食塩水	3.9
CPT-11	10.0 mg/kg		2.05	0.9%生理 食塩水	
CPT-11	15.0 mg/kg		3.075	0.9%生理 食塩水	
CPT-11	30.0 mg/kg	1.35	6.15	0.9%生理 食塩水	

10

【0548】

15mg/kgの投薬溶液を、30mg/kgの投薬溶液の1:1希釈によって調製した。10mg/kgの投薬溶液を、15mg/kgの投薬溶液の2:1希釈によって調製した。

20

【0549】

【表 4 3 - 1】

表 4 3 : CPGC-11-EF06研究設計

群	マウス数/群	まずADC	スケジ ュール	CPT -11 静脈内	スケジ ュール	CPT -11 週合計	期間
1	10	ビヒクル 静脈内	週1回 1日目		1日目、 2日目	0	1週目、2週目 、3週目
2	10	MLN02 64 7. 5mg/kg 静脈内	週1回 1日目			0	1週目、2週目 、3週目
3	10			10mg/kg	週2回1 日目、2 日目	20	1週目、2週目 、3週目
4	10			15mg/kg	週2回1 日目、2 日目	30	1週目、2週目 、3週目
5	10			30mg/kg	週1回1 日目	30	1週目、2週目 、3週目
6	10	MLN02 64 7. 5mg/kg	週1回 1日目	10mg/kg	週2回1 日目、2 日目	20	1週目、2週目 、3週目

30

40

【表 4 3 - 2】

群	マウス数/群	まずADC g 静脈内	スケジ ュール	CPT - 1 1 静脈内	スケジ ュール	CPT - 1 1 週合計	期間
		MLN02 647. 5mg/k g 静脈内	週1回 1日目	15m g/k g	週2回1 日目、2 日目	30	1週目、2週目 、3週目
7	10						
8	10	MLN02 647. 5mg/k g 静脈内	週1回 1日目	30m g/k g	週1回1 日目	30	1週目、2週目 、3週目

10

【0550】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の10%に達する、またはb) 体重減少が20%を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、200mm³であった。

【0551】

投薬前1日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、20.5グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

20

【0552】

ノギス(0.01mm)を使用して腫瘍体積の測定値(0.01mm)を週2回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$V = W^2 \times L / 2$ (V = 腫瘍体積、W = 腫瘍の単軸に沿って測定した幅、L = 腫瘍の短軸に沿って測定した長さ)。体重測定値もまた、Mettler計量器(0.1gm)を使用して1週間に2回取得した。

【0553】

有効性を、腫瘍成長阻害(TGI)%及び腫瘍成長遅延(TGD)に関して評価した。TGIは、次の式を使用して任意の日(対照の最大腫瘍体積(MTVが最大許容可能腫瘍体積に達したとき)に評価した： $TGI = 100 - [処置MTV / 対照MTV] \times 100$ 。

30

【0554】

TGDは、T-Cを計算することによって評価し、式中、T = 処置群の腫瘍が所定の寸法(例えば、1,000mm³)に達する平均時間(日数)であり、C = 対照群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間(日数)である。

【0555】

図10Aに示されるように、用量は、すべての処置群で十分に耐容された。種々の治療群の平均腫瘍体積曲線を、図10Bに示す。投薬を終えた後の腫瘍再成長動態を、図10Cに示す。図10Cに示されるように、CPT-11 10mg/kg及び15mg/kgの組み合わせ処置群間に差はなく、いずれも投薬後さらに3週間、腫瘍再成長を防止した。研究の結果を表44に要約する。

40

【0556】

【表 4 4】

表 4 4 : C P G C - 1 1 - E F 0 6 研究の結果

群	平均腫瘍体積±標準誤差 (mm ³)	T G I	1 0 0 0 mm ³ までの日 数	T G D	T/ C
ビヒクル	1 8 1 0. 1 ± 2 1 4. 8		1 2	0	
ML 0 2 6 4 7. 5 m g / k g (週 1 回)	8 8 6. 1 ± 1 8 7. 9	5 1	> 1 7		0. 4 9
C P T - 1 1 1 0 m g / k g (1 日 1 回 2 日 投薬 5 日 休薬)	5 1 3. 1 ± 5 2. 2	7 1. 7	> 1 7		0. 2 8
C P T - 1 1 1 5 m g / k g (2 日 投薬 5 日 休 薬)	4 0 2. 8 ± 3 6. 6	7 7. 7	> 1 7		0. 2 2
C P T - 1 1 3 0 m g / k g (週 1 回)	7 1 5. 1 ± 1 1 6. 4	6 0. 5	> 1 7		0. 4
ML 0 2 6 4 7. 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 0 m g / k g (2 日 投薬 5 日 休薬)	3 4 2. 1 ± 4 5. 6	8 1. 1	> 1 7		0. 1 9
ML 0 2 6 4 7. 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 5 m g / k g (2 日 投薬 5 日 休薬)	3 2 7. 2 ± 3 5. 4	8 1. 9	> 1 7		0. 1 8
ML 0 2 6 4 7. 5 m g / k g C P T - 1 1 3 0 m g / k g (週 1 回)	4 2 6. 1 ± 4 0. 6	7 6. 5	> 1 7		0. 2 4

【 0 5 5 7 】

混合効果線形回帰モデルを使用して C P G C - 1 1 - E F 0 6 研究の縦断的分析を C P G C - 1 1 - E F 0 7 研究に関して上述のように行って、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体及び C P T - 1 1 の組み合わせ抗腫瘍有効性が、相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。

【 0 5 5 8 】

表 4 5 は、群の記号についての注釈表である。表 4 6 は、対での比較の結果を挙げる。d A U C は、参照群のものと比較した、処置 A U C で観察された減少パーセントである。負の d A U C は、参照と比較した A U C の増加として解釈される。P 値だけでなく、d A U C の評価も行うことが重要である。有意な P 値を有するが d A U C 値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

【 0 5 5 9 】

表 4 7 は、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ（「相乗」）を示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、亜相加的またはアンタゴニスト的組み合わせ（「アンタゴニスト」）を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的（「相加」）となるはずである。

【 0 5 6 0 】

【表 4 5】

表 4 5 : 注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0.9パーセント生理食塩水	V
2 ML0264 7.5mg/kg (週1回)／264	A
3 CPT-11 10mg/kg CD (2日投薬5日休薬)／CPT-11	B
4 CPT-11 15mg/kg (2日投薬5日休薬)／CPT-11	C
5 CPT-11 30mg/kg (週1回)／CPT-11	D
6 ML0264 7.5mg/kg (週1回) CPT-11 10mg/kg (2日投薬5日休薬)／CPT-11+264	E
7 ML0264 7.5mg/kg (週1回) CPT-11 15mg/kg (2日投薬5日休薬)／CPT-11+264	F
8 ML0264 7.5mg/kg CPT-11 30mg/kg (週1回)／CPT-11+264	G

10

【0561】

【表 4 6】

表 4 6 : 対での比較の結果

参照	処置	dAU	P値
		C	
1 V	A	28.9	<0.001
2 V	B	48.0	<0.001
3 V	C	54.6	<0.001
4 V	D	33.7	<0.001
5 V	E	68.8	<0.001
6 V	F	70.7	<0.001
7 V	G	50.9	<0.001

20

30

【0562】

【表 4 7】

表 4 7 : 組み合わせ分析の結果

スコア	平均誤差	P値	評価
E 7.3	12.7	0.573	相加
F 12.3	1.6	0.305	相加
G 11.2	3.5	0.415	相加

40

50

【0563】

表47に示されるように、相加的活性が、3つすべての組み合わせ処置群にわたって達成された。

【0564】

要約すると、中等度のGCC抗原密度レベル（IHCスコア2+）及び単一剤として投与した場合の5F9-vcMMAE免疫複合体に対する中等度の感受性を有するPHTX-17cモデルは、組み合わせ治療が、いずれも免疫複合体に対して中等度から高度の感受性を有するが、それぞれ、高度及び程度のGCC抗原発現レベルを有するPHTX-09c及びPHTX-21cモデルで見られるように相乗的ではなく相加的であったという点で、免疫複合体とCPT-11との組み合わせ投与に対する中等度の感受性を示した。

【0565】

PHTX-11c皮下異種移植片を保持する雌性CB-17-SCIDマウスに静脈内投与したMLN0264、CPT-11の抗腫瘍活性（研究番号CPGC-12-EF01）

上述のように、5F9-vcMMAE免疫複合体及びCPT-11の組み合わせ投与は、免疫複合体の単一剤活性に対する中等度から高度な感受性を有するが大幅に異なるGCC抗原レベルを有する、2つの原発性ヒト腫瘍異種移植片モデル（IHCスコア2～3+を有するPHTX-09c、IHCスコア1+を有するPHTX-21c）において、相乗的活性を有するが、免疫複合体に対する中等度の感受性及び中等度のGCC抗原密度レベルを有するモデル（IHCスコア2+を有するPHTX-17c）においては相加的活性を有することが上で示された。この研究の目的は、中等度のGCC抗原密度レベルを有するが、免疫複合体単独に対しては耐性であるモデルにおける組み合わせ活性について探求することであった。実施例5に示されるように、PHTX-11cモデルは、中等度の抗原発現（IHCスコア2+）を示すが、5F9-vcMMAE免疫複合体の単一剤活性には耐性である（図6C及び6D）。したがって、PHTX-11cモデルを使用して、2日投薬／5日休薬の投薬スケジュールで15mg/kg、及び週1回で30mg/kgのCPT-11と組み合わせて、7.5mg/kgの用量で開始する5F9-vcMMAE（週1回の静脈内投与）の組み合わせ治療を評価した。用量製剤を表48に従って調製した。研究設計を表49に示す。

【0566】

【表48】

表48：用量製剤の調製

薬剤	用量	量（液体 ul）	投薬溶液濃度（m g/mL）	ビヒクル	抗体／薬物
5F9-vcMMAE (MLN0264)	7.5mg/kg	714.1ul	1.5075	0.9%生理食塩水	4:1
CPT-11	10.0mg/kg		2.01	0.9%生理食塩水	
CPT-11	15.0mg/kg		3.02	0.9%生理食塩水	
CPT-11	30.0mg/kg	1206	6.03	0.9%生理食塩水	

【0567】

15mg/kgの投薬溶液を、30mg/kgの投薬溶液の1:1希釈によって調製した。10mg/kgの投薬溶液を、15mg/kgの投薬溶液の2:1希釈によって調製した。

【0568】

【表 4 9 - 1】

表 4 9 : C P G C - 1 2 - E F 0 1 研究設計

群	マウス数 ／群	まずADC	スケジュール	CPT- 1 1 静脈 内	スケジュー ール	CPT- 1 1 週合 計	期間
1	1 0	ビヒクル 静脈内	週 1 回 1 日目		1 日目、 2 日目	0	1 週目、 2 週目、 3 週目
2	1 0	MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g 静脈内	週 1 回 1 日目			0	1 週目、 2 週目、 3 週目
3	1 0			1 0 m g ／ k g	1 日目、 2 日目、 1 日 1 回	2 0	1 週目、 2 週目、 3 週目
4	1 0			1 5 m g ／ k g	1 日目、 2 日目、 1 日 1 回	3 0	1 週目、 2 週目、 3 週目
5	1 0			3 0 m g ／ k g	週 1 回 1 日目	3 0	1 週目、 2 週目、 3 週目

10

【表 4 9 - 2】

20

群	マウス数 ／群	まずADC	スケジュール	CPT- 1 1 静脈 内	スケジュー ール	CPT- 1 1 週合 計	期間
6	1 0	MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g 静脈内	週 1 回 1 日目	1 0 m g ／ k g	1 日目、 2 日目、 1 日 1 回	2 0	1 週目、 2 週目、 3 週目
7	1 0	MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g 静脈内	週 1 回 1 日目	1 5 m g ／ k g	1 日目、 2 日目、 1 日 1 回	3 0	1 週目、 2 週目、 3 週目
8	1 0	MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g 静脈内	週 1 回 1 日目	3 0 m g ／ k g	週 1 回 1 日目	3 0	1 週目、 2 週目、 3 週目

30

【0 5 6 9】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の 1 0 % に達する、または b) 体重減少が 2 0 % を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、2 0 0 m m³ であった。

【0 5 7 0】

投薬前 1 日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、2 5 ~ 3 0 ゲージ、長さ 1 / 2 ~ 3 / 4 インチの 1 c c のシリンジを使用しておよそ 0 . 1 m l の用量を静脈内投与で受容させた。動物に、2 0 . 1 グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

40

【0 5 7 1】

ノギス (0 . 0 1 m m) を使用して腫瘍体積の測定値 (0 . 0 1 m m) を 1 週間に 2 回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$V = W^2 \times L / 2$ (V = 腫瘍体積、W = 腫瘍の単軸に沿って測定した幅、L = 腫瘍の短軸に沿って測定した長さ)。体重測定値もまた、M e t t l e r 計量器 (0 . 1 g m) を使用して 1 週間に 2 回取得した。

【0 5 7 2】

有効性を、腫瘍成長阻害 (T G I) % 及び腫瘍成長遅延 (T G D) に関して評価した。

50

TGIは、次の式を使用して任意の日（対照の最大腫瘍体積（MTVが最大許容可能腫瘍体積に達したとき）に評価した： $TGI = 100 - [処置MTV / 対照MTV] \times 100$ 。

【0573】

TGDは、T-Cを計算することによって評価し、式中、T＝処置群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間（日数）であり、C＝対照群の腫瘍が所定の寸法（例えば、 $1,000\text{mm}^3$ ）に達する平均時間（日数）である。

【0574】

図11Aに示されるように、用量は、すべての処置群で十分に耐容された。種々の治療群の平均腫瘍体積曲線を、図11Bに示す。腫瘍再成長動態を11Cに示す。

【0575】

図11Bに示されるように、免疫複合体単独では 7.5mg/kg の高用量で非常に低い活性を有し、投与した3つの異なる用量のCPT-11単独で見られる活性にほとんど差はなかった。しかしながら、 10mg/kg 及び 15mg/kg のいずれのCPT-11との組み合わせ処置も、投薬中に腫瘍成長を完全に阻害し、さらに、投薬を停止した後さらに6～7週間の間腫瘍再成長を防止した。腫瘍は、およそ60日目まで再成長を開始しなかった。研究の結果を表50に要約する。

【0576】

【表50】

表50：CPGC-12-EF01研究の結果

群	平均腫瘍体積±標準誤差（ mm^3 ）	TGI	1000mm^3 までの日数	TGD	T/C
ビヒクル	2028.9 ± 144.2		8.8	0	
ML0264 7.5mg/kg （週1回）	1263.4 ± 115.8	37.7	13.5	4.7	0.62
CPT-11 10mg/kg （2日投薬5日休薬）	691.4 ± 53.1	65.9	>18		0.34
CPT-11 15mg/kg （2日投薬5日休薬）	625.5 ± 73.8	69.2	>18		0.31
CPT-11 30mg/kg	789.6 ± 94.2	61.1	>18		0.39
MLN0264 7.5mg/kg CPT-11 10mg/kg	346 ± 33.1	82.9	>18		0.17
MLN0264 7.5mg/kg CPT-11 10mg/kg	311.5 ± 36.9	84.6	>18		0.15
MLN0264 7.5mg/kg CPT-11 10mg/kg	629.3 ± 43.8	69	>18		0.31

【0577】

混合効果線形回帰モデルを使用してCPGC-12-EF01研究の縦断的分析を行って、5F9 vcMMAE免疫複合体及びCPT-11の組み合わせ抗腫瘍有効性が、相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。すべての腫瘍値（腫瘍体積または光子束）は、 $\log_{10}$ 変換前にそれらに1の値が加算された。これらの値を、処置群全体で比較して、経時的な傾向における差が統計学的に有意であるかどうかを評価した。処置群の対を比較するために、最大尤度法を使用して、以下の混合効果線形回帰モデルをデータに当てはめた：

【数 8】

$$Y_{ijk} - Y_{i0k} = Y_{i0k} + \text{処置}_i + \text{日}_j + \text{日}^2_j + (\text{処置} * \text{日})_i + (\text{処置} * \text{日}^2)_i + e_{ijk} \quad (1)$$

式中、 Y_{ijk} は、 i 番目の処置における k 番目の動物の j 番目の時点での $\log_{10}$ 腫瘍体積であり、 Y_{i0k} は、 i 番目の処置での k 番目の動物における 0 日目（ベースライン）の $\log_{10}$ 腫瘍体積であり、 j 日目は、平均が中央な時点であり（ ^2_j とともに）は連続する変数として扱われ、 e_{ijk} は残余誤差である。空間べき乗則共分散行列を使用して、長時間の同じ動物に対する反復測定を説明した。相互作用項ならびに 日^2_j の項は、それらが統計学的に有意でなかった場合、除外した。

【0578】

10

尤度比試験を用いて、所与の処置群対が、統計学的に有意な差を示したかどうかを評価した。完全モデルの $-2 \log$ 尤度を、いずれの処置項も有さない（縮小モデル）と比較し、カイ二乗検定を使用して値の差を試験した。試験の自由度を、完全モデルの自由度と縮小モデルの自由度との間の差として計算した。

【0579】

$\log$ 腫瘍値の予測差（ $Y_{ijk} - Y_{i0k}$ 、 $\log_{10}$ （0 日目からの倍変化）として解釈され得る）を、上述のモデルから取得して、各処置群について平均 AUC 値を計算した。次いで、 $dAUC$ 値を次のように計算した。

【数 9】

20

$$dAUC = \frac{\text{平均}(AUC_{ctl}) - \text{平均}(AUC_{trt})}{\text{平均}(AUC_{ctl})} * 100 \quad (2)$$

これは、 AUC_{ctl} が正の値であると想定した。 AUC_{ctl} が負であった場合、上述の式に -1 を乗ずる。

【0580】

相乗性分析のために、 $\log$ 腫瘍値の観測された差を使用して、各動物の AUC 値を計算した。処置群の動物が研究から除外された場合、最後に観測された腫瘍値を、すべての後続の辞典にわたって繰り越した。対照またはビヒクル群の AUC は、上述の対モデルから予測された値を使用して計算した。組み合わせ治療の効果が、個別の治療と比較して相乗的、相加的、または垂相加的であったかどうかという問題に取り組むために、以下の統計値を計算した。

30

【数 10】

$$Frac_{Ak} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{Ak}}{AUC_{ctl}} \quad (3)$$

$$Frac_{Bk} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{Bk}}{AUC_{ctl}} \quad (4)$$

$$Frac_{ABk} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{ABk}}{AUC_{ctl}} \quad (5)$$

40

$$\text{相乗性スコア} = (\text{平均}(Frac_A) + \text{平均}(Frac_B) - \text{平均}(Frac_{AB})) * 100 \quad (6)$$

式中、 A_k 及び B_k は、個別処置群における k 番目の動物であり、 AB_k は、組み合わせ処置群における k 番目の動物である。 AUC_{ctl} は、対照群のモデル予測 AUC であり、変動性がなく一定であるとして処理した。相乗性スコアの標準誤差は、群 A、B、及び AB にわたる標準誤差二乗の和の平方根として計算した。自由度は、Welch-Satterthwaite 方程式を使用して推定した。P 値を、相乗性スコアをその標準誤差で除すことによって計算し、上で計算した自由度を用いて t ー分布（両側）に対して試験した。

【0581】

50

効果を4つの異なるカテゴリに分類した。相乗性スコアが0未満であれば相乗的、相乗性スコアが統計学的に0と異なる場合は相加的であると見なした。相乗性スコアが0を超えるが、組み合わせの平均AUCが2つの単一剤処置間の低い方のAUCよりも低い場合、組み合わせは垂相加的であった。相乗性スコアが0を超え、組み合わせの平均AUCが単一剤処置のうちの少なくとも1つの平均AUCよりも高い場合、組み合わせはアンタゴニスト性であった。要求があった場合、区間解析には、別の処置群及び時間間隔と比較した指定の処置群及び時間間隔が含まれた。所与の群、時間間隔、及び動物について、1日当たりの腫瘍成長率を

【数11】

$$\text{腫瘍成長率} = 100 * (10^{\Delta Y / \Delta t} - 1) \quad (7)$$

によって推定し、式中、 ΔY は、目的の間隔にわたる $\log_{10}$ 腫瘍体積の差であり、 Δt は、時間間隔の長さである。これらの時点のうち的一方または両方が欠けている場合、その動物は無視した。次いで、動物全体の平均率を、不等分散を有する対応のない両側t検定を使用して比較した。

【0582】

この研究の予備的性質を考慮して、多重比較及び試験したエンドポイントについて、事前に指定された調整は存在しなかった。0.05未満のすべてのP値は、この分析において統計学的に有意と称された。

【0583】

表51は、群の記号についての注釈表である。表52は、対での比較の結果を挙げる。dAUCは、参照群のものと比較した、処置AUCで観察された減少パーセントである。負のdAUCは、参照と比較したAUCの増加として解釈される。P値だけでなく、dAUCの評価も行うことが重要である。有意なP値を有するがdAUC値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

【0584】

表53は、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ（「相乗」）を示す。統計学的に優位な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも良好に機能する（すなわち、より低いAUCを有する）、垂相加的（「垂相加」）組み合わせを示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも悪く働く、アンタゴニスト性組み合わせ（「アンタゴニスト」）を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的（「相加」）となるはずである。

【0585】

【表51】

表51：注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0.9パーセント生理食塩水	V
2 ML0264 7.5mg/kg（週1回）／264	A
3 CPT-11 10mg/kg（2日投薬5日休薬）／CPT-11	B
4 CPT-11 15mg/kg（2日投薬5日休薬）／CPT-11	C
5 CPT-11 30mg/kg／CPT-11	D
6 ML0264 7.5mg/kg CPT-11 10mg/kg／CPT-11+264	E
7 ML0264 7.5mg/kg CPT-11 15mg/kg／CPT-11+264	F
8 ML0264 7.5mg/kg CPT-11 30mg/kg／CPT-11+264	G

【0586】

【表 5 2】

表 5 2：対での比較の結果

	参照	処置	d A U C	P 値
1	V	A	2 2. 6	< 0. 0 0 1
2	V	B	4 2. 6	< 0. 0 0 1
3	V	C	5 1. 3	< 0. 0 0 1
4	V	D	4 1. 6	< 0. 0 0 1
5	V	E	8 0. 2	< 0. 0 0 1
6	V	F	8 6. 8	< 0. 0 0 1
7	V	G	4 9. 1	< 0. 0 0 1

10

【0 5 8 7】

【表 5 3】

20

表 5 3：組み合わせ分析の結果

処置群		スコア	平均誤 差	P 値	評価
E	MLN 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 0 m g / k g (1 日 目、2 日 目 / 週)	- 2 6 . 8	7. 8	0. 0 0 3	相乗
F	MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 5 m g / k g (1 日 目、2 日 目 / 週)	- 2 0 . 8	1 0	0. 0 5 6	相加
G	MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 3 0 m g / k g (1 日 目、2 日 目 / 週)	- 1 0 . 6	9. 2	0. 2 6 2	相加

30

【0 5 8 8】

表 5 3 に示されるように、組み合わせ活性は、MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 1 0 m g / k g (1 日 目 2 日 目 / 週) (処置群 E) において相乗的であり、他の 2 つの組み合わせ処置群 (群 F 及び G) においては相加的であった。相乗性分析は、腫瘍体積 / 腫瘍成長阻害のみを考慮することに留意されたい。それは、腫瘍成長遅延は考慮しない。図 1 1 C に示されるように、著しい腫瘍再成長遅延 (約 8 0 日) が、7. 5 m g / . k g の 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体活性と組み合わせた 1 0 及び 1 5 m g / k g の C P T - 1 1 で見られた。したがって、図 1 1 C に示される腫瘍再成長動態は、処置群 E 及び F の両方の相乗的活性を示唆する。両方の処置群 E 及び F で観察された驚くべき長さの腫瘍成長遅延、ならびに図 1 1 C に示されるそれぞれの曲線の類似性を考え、処置群 F の相乗性分析を、上述のものではなく異なる統計学的方法を使用して再評価する。処置群 G (MLN 0 2 6 4 7. 5 m g / k g (週 1 回) C P T - 1 1 3 0 m g / k g (1 日 目 / 週)) は、1 回 / 週の投薬スケジュールを使用したのに対し、処置群 E 及び F は週の 1 日 目 及び 2 日 目のスケジュールを使用した。いかなる理論にも束縛されることを意図するものではないが、この代替的な投薬スケジュールは、この処置群の相乗的に対して相加的である効果に影響を有した可能性がある。

40

【0 5 8 9】

要約すると、中等度の G C C 抗原密度 (I H C スコア 2 +) を有するが、単一剤として

50

投与した場合 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体に対して耐性を有する P H T X - 1 1 c モデルは、驚くべきことに、複数回の投薬レジメンで、組み合わせ治療に対して、特に腫瘍再成長の遅延に関して、感受性であった。免疫複合体の単一剤活性に対するその耐性にも関わらず、免疫複合体は、腫瘍を D N A 損傷剤活性に対して効果的に感受性にした。上述のように、腫瘍再成長における長期の遅延に関して見られた相乗的活性を確認するために、相乗性分析は反復されている。

【0590】

まとめると、本明細書に記載されるインビボ組み合わせ研究は、抗 G C C 免疫複合体と C P T - 1 1 との組み合わせが、免疫複合体単独に対する腫瘍の感受性に関わらず、かつ G C C 抗原密度に関わらず、相乗的に作用して腫瘍成長を阻害することを示す。抗腫瘍活性は、投薬を停止した後ですら驚くほど長期間にわたり維持される。評価した前臨床モデルのそれぞれにおいて、相乗的または強化された活性は、各剤の準最適濃度で達成され、抗 G C C 免疫複合体と C P T - 1 1 との組み合わせが、いずれかの薬剤単独の投与よりも優れた治療的利益をもたらすことを示す。これらの前臨床モデルで見られた相乗的または強化された効果は、臨床に変換されることが期待される。組み合わせは、癌が免疫複合体単独に対して耐性である患者の代替となる有望な治療を提供する。

【0591】

実施例 7：抗 G C C 免疫複合体及びシスプラチンの組み合わせ投与のインビボ評価

【0592】

この研究の目的は、実施例 5 に記載される m C R C に由来する P H T X - 0 9 c 原発性ヒト腫瘍異種移植片（「P H T X」）において、5 F 9 v c M M A E 免疫複合体（本明細書でしばしば「M L N 0 2 6 4」と称される）及びシスプラチンの組み合わせ投与によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を評価することであった。研究を以下に行った。

【0593】

P H T X - 0 9 c 皮下異種移植片を有する雌性 C B - 1 7 S C I D マウスに静脈内投与した 5 F 9 v c M M A E 及びシスプラチンの抗腫瘍活性（研究番号 C P G C - 1 1 - E F 0 5）

実施例 5 に示されるように、P H T X - 0 9 c モデルは、種々の濃度で 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体の単一剤活性に高度に感受性であった。この研究の目的は、シスプラチンと組み合わせた 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体を評価することであった。より具体的には、この研究の目標は、P H T X - 0 9 c 皮下異種移植片 C B 1 7 S C I D マウスにおいて、週 1 回または 2 週間に 1 回の投薬スケジュールで静脈内（I V）または腹腔内（I P）に投与される 4 m g / k g 及び 6 m g / k g のシスプラチンと組み合わせた、週 1 回の投薬スケジュールにおける 1 . 8 7 5 及び 3 . 7 5 m g / k g の 5 F 9 v c M M A E 抗腫瘍活性を評価することであった。用量製剤を表 5 4 に従って調製した。研究設計を表 5 5 に示す。

【0594】

【表 5 4 - 1】

表 5 4：用量製剤の調製

薬剤	用量 量（液体 u l ）	投薬溶液濃度 （m g / m L ）	ビヒクル	薬物：抗体
M L N 0 2 6 4 -	1 . 8 7 5 m g / k g	0 . 3 9 2	0 . 9 % 生理 食塩水	3 . 9
M L N 0 2 6 4 -	3 . 7 5 m g / k g 6 5 3 . 1	0 . 7 8 4	0 . 9 % 生理 食塩水	3 . 9

10

20

30

40

【表 5 4 - 2】

シスプラチン	4. 0 m g / k g	2 1 7 0	0. 8 3 6	0. 9 %生理 食塩水
シスプラチン	6. 0 m g / k g	1 3 0 / マウ ス	1. 2 5 4	0. 9 %生理 食塩水

【 0 5 9 5 】

【表 5 5 - 1】

表 5 5 : C P G C - 1 1 - E F 0 5 研究設計

処置群	試験項目	ビヒクル	動物数 ／群	用量 レベル (m g ／k g)	投薬経 路／投 薬レジ メン／ 投薬期 間	用量 溶液 濃度 (m g ／m l)	*投薬 体積 (m l)	エンドポイ ント
1	0. 9 %生理 食塩水	該当な し	9	該当な し	静脈内 ／週 1 回× 3 週間	0	0. 1	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える
2	MLN 0 2 6 4	0. 9 %生理 食塩水	9	1. 8 7 5	静脈内 ／週 1 回× 3 週間	0. 3 9 2	0. 1	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える
3	MLN 0 2 6 4	0. 9 %生理 食塩水	9	3. 7 5	静脈内 ／週 1 回× 3 週間	0. 7 8 4	0. 1	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える
4	シスプ ラチン	0. 9 %生理 食塩水	9	4. 0	静脈内 ／週 1 回× 2 週間	0. 8 3 6	0. 1	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える

10

20

30

40

【表 5 5 - 2】

5	シスプ ラチン	0. 9 %生理 食塩水	9	6. 0	静脈内 ／週 1 回× 1 週間	1. 2 5 4	0. 1 3	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える
6	シスプ ラチン、M L N O 2 6 4	0. 9 %生理 食塩水、0. 9 %生 理食塩 水	9	6. 0 、 1. 8 7 5	静脈内 ／週 1 回× 3 週間及 び週 1 回× 1 週間	1. 2 5 4 0. 3 9 2	0. 1 3	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える
7	シスプ ラチン、M L N O 2 6 4	0. 9 %生理 食塩水、0. 9 %生 理食塩 水	9	6. 0、 3 、 7 5	静脈内 ／週 1 回× 3 週間及 び週 1 回× 1 週間	1. 2 5 4 0. 7 8 4	0. 1 3	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える
8	シスプ ラチン、M L N O 2 6 4	0. 9 %生 理食塩 水、 0. 9 %生 理食塩 水	9	4. 0、 3 、 7 5	静脈内 ／週 1 回× 3 週間及 び週 1 回× 2 週間	0. 8 3 6 0. 7 8 4	0. 1	腫瘍体積が 体重の 1 0 %に達す るか、また は体重減少 が 2 0 %を 超える

【 0 5 9 6】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の 1 0 %に達する、または b) 体重減少が 2 0 %を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、2 0 0 mm³であった。

【 0 5 9 7】

投薬前 1 日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、2 7 ～ 3 0 ゲージ、長さ 1 / 2 ～ 3 / 4 インチの 1 c c のシリンジを使用しておよそ 0. 1 m l の用量を静脈内投与で受容させた。動物に、2 0. 5 グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

【 0 5 9 8】

ノギス (0. 0 1 mm) を使用して腫瘍体積の測定値を 1 週間に 2 回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$V = W^2 \times L / 2$ (V = 腫瘍体積、W = 腫瘍の単軸に沿って測定した幅、L = 腫瘍の短軸に沿って測定した長さ)。体重測定値もまた、M e t t l e r 計量器 (0. 1 g m) を使用して 1 週間に 2 回取得した。

【 0 5 9 9】

有効性を、腫瘍成長阻害 (T G I) % 及び腫瘍成長遅延 (T G D) 対照と対比して処置の腫瘍が最終研究体積に達するまでの日数) に関して評価した。

【 0 6 0 0】

T G I を、次の式を使用して任意の日 (対照の最大腫瘍体積 (「M T V」が最大許容可能腫瘍体積に達したとき) に評価した： $T G I = 1 0 0 - [処置 M T V / 対照 M T V] \times$

10

20

30

40

50

1 0 0。

【0601】

TGDは、T-Cを計算することによって評価し、式中、T=処置群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間（日数）であり、C=対照群の腫瘍が所定の寸法（例えば、1, 000 mm³）に達する平均時間（日数）である。

【0602】

一般に、静脈内の投薬経路が、腹腔内投薬よりも良好に耐容されると判断された。図12Aに示されるように、用量は、すべての組み合わせ処置群で十分に耐容され、組み合わせ処置は、15%を超える体重減少が見られたシスプラチン単独よりも良好に耐容された。4 mg/kgで週1回投与したシスプラチンは、2回の投薬が耐容され、6 mg/kgで週1回の投与は、1回の投薬のみが耐容された。種々の治療群の平均腫瘍体積曲線を、図12Bに示す。

【0603】

混合効果線形回帰モデルを使用してCPGC-11-EF05研究の縦断的分析を行って、5F9 vcMMAE免疫複合体及びシスプラチンの組み合わせ抗腫瘍有効性が、相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。すべての腫瘍値（腫瘍体積または光子束）は、log₁₀変換前にそれらに1の値が加算された。これらの値を、処置群全体で比較して、経時的な傾向における差が統計学的に有意であるかどうかを評価した。処置群の対を比較するために、最大尤度法を使用して、以下の混合効果線形回帰モデルをデータに当てはめた：

【数12】

$$Y_{ijk} - Y_{i0k} = Y_{i0k} + \text{処置}_i + \text{日}_j + \text{日}^2_j + (\text{処置} * \text{日})_i + (\text{処置} * \text{日}^2)_i + e_{ijk} \quad (1)$$

式中、Y_{ijk}は、i番目の処置におけるk番目の動物のj番目の時点でのlog₁₀腫瘍体積であり、Y_{i0k}は、i番目の処置でのk番目の動物における0日目（ベースライン）のlog₁₀腫瘍体積であり、j日目は、平均が中央な時点であり（²_jとともに）は連続する変数として扱われ、e_{ijk}は残余誤差である。空間べき乗則共分散行列（を使用して、長時間の同じ動物に対する反復測定を説明した。相互作用項ならびに日²_jの項は、それらが統計学的に有意でなかった場合、除外した。

【0604】

尤度比試験を用いて、所与の処置群対が、統計学的に有意な差を示したかどうかを評価した。完全モデルの-2 log尤度を、いずれの処置項も有さない（縮小モデル）と比較し、カイ二乗検定を使用して値の差を試験した。試験の自由度を、完全モデルの自由度と縮小モデルの自由度との間の差として計算した。

log腫瘍値の予測差（Y_{ijk} - Y_{i0k}、log₁₀（0日目からの倍変化）として解釈され得る）を、上述のモデルから取得して、各処置群について平均AUC値を計算した。次いで、dAUC値を次のように計算した。

【数13】

$$dAUC = \frac{\text{平均}(AUC_{ctl}) - \text{平均}(AUC_{trt})}{\text{平均}(AUC_{ctl})} * 100 \quad (2)$$

これは、AUC_{ctl}が正の値であると想定した。AUC_{ctl}が負であった場合、上述の式に-1を乗ずる。

【0605】

相乗性分析のために、log腫瘍値の観測された差を使用して、各動物のAUC値を計算した。処置群の動物が研究から除外された場合、最後に観測された腫瘍値を、すべての後続の辞典にわたって繰り越した。対照またはビヒクル群のAUCは、上述の対モデルから予測された値を使用して計算した。相乗性の尺度を、次のように定義した：

【数 1 4】

$$Frac_{A_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{A_k}}{AUC_{ctl}} \quad (3)$$

$$Frac_{B_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{B_k}}{AUC_{ctl}} \quad (4)$$

$$Frac_{AB_k} = \frac{AUC_{ctl} - AUC_{AB_k}}{AUC_{ctl}} \quad (5)$$

$$\text{相乗性スコア} = (\text{平均}(Frac_A) + \text{平均}(Frac_B) - \text{平均}(Frac_{AB})) * 100 \quad (6)$$

10

式中、 A_k 及び B_k は、個別処置群における k 番目の動物であり、 AB_k は、組み合わせ処置群における k 番目の動物である。 AUC_{ctl} は、対照群のモデル予測 AUC であり、変動性がなく一定であるとして処理した。相乗性スコアの標準誤差は、群 A 、 B 、及び AB にわたる標準誤差二乗の和の平方根として計算した。自由度は、Welch-Satterthwaite 方程式を使用して推定した。仮説検定を行って、相乗性スコアが 0 とは異なったかどうかを判定した。P 値を、相乗性スコアをその標準誤差で除すことによって計算し、上で計算した自由度を用いて t -分布（両側）に対して試験した。

【0606】

効果を 4 つの異なるカテゴリに分類した。相乗性スコアが 0 未満であれば相乗的、相乗性スコアが統計学的に 0 と異なる場合は相加的であると見なした。相乗性スコアが 0 を超えるが、組み合わせの平均 AUC が 2 つの単一剤処置間の低い方の AUC よりも低い場合、組み合わせは垂相加的であった。相乗性スコアが 0 を超え、組み合わせの平均 AUC が単一剤処置のうちの少なくとも 1 つの平均 AUC よりも高い場合、組み合わせはアンタゴニスト性であった。

20

【0607】

要求があった場合、区間解析には、別の処置群及び時間間隔と比較した指定の処置群及び時間間隔が含まれた。所与の群、時間間隔、及び動物について、1 日当たりの腫瘍成長率を

【数 1 5】

$$\text{腫瘍成長率} = 100 * (10^{\Delta Y / \Delta t} - 1) \quad (7)$$

30

【0608】

によって推定し、式中、 ΔY は、目的の間隔にわたる $\log_{10}$ 腫瘍体積の差であり、 Δt は、時間間隔の長さである。これらの時点のうち的一方または両方が欠けている場合、その動物は無視した。次いで、動物全体の平均率を、不等分散を有する対応のない両側 t 検定を使用して比較した。

【0609】

この研究の予備的性質を考慮して、多重比較及び試験したエンドポイントについて、事前に指定された調整は存在しなかった。0.05 未満のすべての P 値は、この分析において統計学的に有意と称された。

40

【0610】

表 56 は、群の記号についての注釈表である。表 57 は、対での比較の結果を挙げる。 $dAUC$ は、参照群のものと比較した、処置 AUC で観察された減少パーセントである。負の $dAUC$ は、参照と比較した AUC の増加として解釈される。P 値だけでなく、 $dAUC$ の評価も行うことが重要である。有意な P 値を有するが $dAUC$ 値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

【0611】

表 58 は、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ（「相乗」）を示す。統計学的に優位な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも良好に機能する（すなわち、より低い AUC を有する）、垂相

50

加的組み合わせ（「垂相加」）を示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも悪く働く、アンタゴニスト性組み合わせ（「アンタゴニスト」）を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的（「相加」）となるはずである。

【0612】

【表56-1】

表56：注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0.9パーセント生理食塩水	V
2 ML0264 1.875mg/kg/264	A
3 ML0264 3.75mg/kg/264	B

10

【表56-2】

4 シスプラチン4mg/kg/シスプラチン	C
5 シスプラチン6mg/kg/シスプラチン	D
6 ML0264 1.875mg/kgシスプラチン 6mg/kg/シスプラチン+264	E
7 ML0264 3.75mg/kgシスプラチン6 mg/kg/シスプラチン+264	F
8 ML0264 3.75mg/kgシスプラチン4 mg/kg/シスプラチン+264	G

20

【0613】

【表57】

表57 対での比較の結果

参照	処置	dAU C	P値
1 V	A	17.8	0.051
2 V	B	28.4	0.04
3 V	C	50.6	0.01
4 V	D	44.8	<0.001
5 V	E	67.5	<0.001
6 V	F	98.8	<0.001
7 V	G	74.0	<0.001

30

【0614】

【表 58】

表 58：組み合わせ分析の結果

処置群		スコア	平均誤差	P 値	評価
E	ML0264 1.875mg/kg シスプラチン 6mg/kg (1週目1日目)	-11 .3	19. 1	0.5 6	相加
F	ML0264 3.75mg/kg シスプラチン 6mg/kg (1週目1日目)	-55	18. 5	0.0 07	相乗
G	ML0264 3.75mg/kg シスプラチン 4mg/kg (1週目及び2週目の1日目)	-31 .7	13. 4	0.0 29	相乗

10

【0615】

表 58 に示されるように、相乗的活性は、ML0264 3.75mg/kg シスプラチン 6mg/kg (1週目1日目) (処置群 F)、ならびに ML0264 3.75mg/kg シスプラチン 4mg/kg (1週目及び2週目の1日目) (処置群 G) の投薬レジメンを使用して達成された。低用量の免疫複合体 (1.875mg/kg) を、シスプラチン 6mg/kg 1日目1週目と組み合わせで (処置群 E) 使用することで、相加的活性が見られた。

【0616】

20

図 12B に示されるように、改善された抗腫瘍活性が、すべての組み合わせ処置群で見られ、相乗的活性が、処置群 F 及び G で見られた。図 12C に示されるように、有意な腫瘍再成長遅延 (約 50 日) が、3.75mg/kg の 5F9 vcMMAE 免疫複合体活性と組み合わせた 4 及び 6/mg/kg のシスプラチンで見られた。

【0617】

要約すると、上述の IHC アッセイ (スコア 2~3+) で示されるように比較的高い G C C 抗原密度及び単一剤として投与した場合の種々の濃度の 5F9 vcMMAE 免疫複合体に対する高い感受性を有する PHTX-09c モデルは、異なる用量及び投薬スケジュールのシスプラチンと組み合わせで試験したより高用量の免疫複合体 (3.75mg/kg) で、免疫複合体及びシスプラチンの組み合わせ投与に対して相乗的な感受性を呈した。

30

【0618】

実施例 8：抗 G C C 免疫複合体及び 5-フルオロウラシルの組み合わせ投与のインビボ評価

【0619】

この研究の目的は、実施例 5 に記載される mC R C に由来する PHTX-21c 原発性ヒト腫瘍異種移植片 (「PHTX」) において、5F9 vcMMAE 免疫複合体 (本明細書でしばしば「MLN0264」と称される) 及び 5-フルオロウラシル (5-FU) の組み合わせ投与によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を評価することであった。研究を以下のように行った。

40

【0620】

PHTX-21C 皮下異種移植片を保持する雌性 CB-17 S C I D マウスに静脈内投与した MLN02064 及び 5-フルオロウラシルの抗腫瘍活性 (研究番号 C P G C-11-E F 01)

実施例 5 に示されるように、PHTX-21c モデルは、低い G C C 抗原密度レベル (IHC スコア 1+) を有するにも関わらず、種々の濃度で 5F9 vcMMAE 免疫複合体の単一剤活性に対して中等度に感受性であった。この研究の目的は、PHTX-21c モデルにおける 5F9 vcMMAE 及び 5-フルオロウラシル (5-FU) の抗腫瘍活性を評価することであった。週 1 回の投薬スケジュールにおける 3.75mg/kg 及び 7.5mg/kg の 5F9 vcMMAE の投与を、3 日投薬/4 日休薬の投薬スケジュー

50

ールで4週間静脈投与される15mg/kg及び25mg/kgの5-FUとの組み合わせで評価した。GCCに非特異的な抗体を有するvc-MMAE免疫複合体(209-vcMMAEと称される)を対照として使用した。容量性剤を表59に従って調製した。研究設計を表60に示す。

【0621】

【表59】

表59：用量製剤の調製

処置群	用量 (液体 u l)	投薬溶液濃度 (m g/mL)	ビヒクル	薬物/抗体
209-vcMMAE (非GCC対照免疫複 合体)	3.75 mg/kg g	0.7313	0.9%生 理食塩水	4.1
209-vcMMAE (非GCC対照免疫複 合体)	7.5m 274. g/kg 8	1.4625	0.9%生 理食塩水	4.1
5F9-vcMMAE	3.75 mg/kg g	0.7313	0.9%生 理食塩水	3.9
5F9-vcMMAE	7.5m 731. g/kg 3	1.4625	0.9%生 理食塩水	3.9
5-Fu	15.0 mg/kg g	2.4375	0.9%生 理食塩水	pH8.6
5-Fu	25.0 mg/kg g 390	4.875	0.9%生 理食塩水	pH8.6

7.5mg/kgの投薬溶液を1:1希釈することによって、3.75mg/kgの投薬溶液を調製した。

25mg/kgの投薬溶液を3:2希釈することによって、15mg/kgの投薬溶液を調製した。

【表60-1】

表60：CPGC-11-EF01研究設計

処置群	試験項目	シーク エンシ ング	ビヒク ル	動物 数/ 群	用量 レベル (mg /kg g)	投薬経 路/投 薬レジ メン/ 投薬期 間	用量 溶液 濃度 (mg /ml)	*投 薬 体積 (ml)	エンドポイン ト
1	0.9% 生理食塩 水		該当なし	10	該当なし	静脈内 /1日 1回、 3日投 薬4日 休薬× 4週間	0	0.1	腫瘍重量が体 重の10%に 達するか、ま たは体重減少 が20%を超 える
2	ML00 7320 42		0.9 %生理 食塩水	10	3.7 5	静脈内 /週1 回×4 週間	0.7 313	0.1	腫瘍重量が体 重の10%に 達するか、ま たは体重減少

【表 6 0 - 2】

									が 2 0 % を超える
3	ML 0 0 7 3 2 0 4 2		0 . 9 % 生理 食 塩 水	1 0	7 . 5	静脈内 ／ 週 1 回 × 4 週間	1 . 4 6 2 5	0 . 1	腫瘍重量が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
4	ML N 0 2 6 4		0 . 9 % 生理 食 塩 水	1 0	3 . 7 5	静脈内 ／ 週 1 回 × 4 週間	0 . 7 3 1 3	0 . 1	腫瘍重量が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
5	ML N 0 2 6 4		0 . 9 % 生理 食 塩 水	1 0	7 . 5	静脈内 ／ 週 1 回 × 4 週間	1 . 4 6 2 5	0 . 1	腫瘍重量が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
6	5 - F u		0 . 9 % 生理 食 塩 水	1 0	1 5 . 0	静脈内 ／ 1 日 1 回、 3 日投 薬 4 日 休薬 × 4 週間	2 . 4 3 7 5	0 . 1	腫瘍重量が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
7	5 - F u		0 . 9 % 生理 食 塩 水	1 0	2 5 . 0	静脈内 ／ 1 日 1 回、 3 日投 薬 4 日 休薬 × 4 週間	4 . 8 7 5	0 . 1	腫瘍重量が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
8	5 - F u 、 ML N 0 2 6 4	5 - F u ／ ML N 0 2 6 4	0 . 9 % 生理 食 塩 水 、 0 . 9 % 生 理 食 塩 水	1 0	1 5 . 0、 3 . 7 5	静脈内 ／ 1 日 1 回、 3 日投 薬 4 日 休薬及 び 週 1 回 × 4 週間	2 . 4 3 7 5 0 . 7 3 1 3	0 . 1 0 . 1	腫瘍重量が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える

10

20

30

40

【表 6 0 - 3】

9	5-Fu 、MLN 0 2 6 4	5-F u/M LN0 2 6 4	0. 9 %生理 食塩水 、0. 9%生 理食塩 水	1 0	2 5. 0、3 . 7 5	静脈内 ／1日 1回、 3日投 薬4日 休薬及 び週1 回×4 週間	4. 8 7 5 0. 7 3 1 3	0. 1 0. 1	腫瘍重量が体 重の10%に 達するか、ま たは体重減少 が20%を超 える
---	-------------------------	----------------------------	--	-----	----------------------	--	------------------------------	--------------------	--

10

【0 6 2 2】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の10%に達する、またはb) 体重減少が20%を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、200 mm³であった。

【0 6 2 3】

投薬前1日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、27～30ゲージ、長さ1/2～3/4インチの1ccのシリンジを使用しておよそ0.1 mlの用量を静脈内投与で受容させた。動物に、20.5グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

20

【0 6 2 4】

ノギス(0.01 mm)を使用して腫瘍体積の測定値を1週間に2回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$V = W^2 \times L / 2$ (V = 腫瘍体積、W = 腫瘍の単軸に沿って測定した幅、L = 腫瘍の短軸に沿って測定した長さ)。体重測定値もまた、Mettler計量器(0.1 g)を使用して1週間に2回取得した。

【0 6 2 5】

有効性を、腫瘍成長阻害(TGI)%及び腫瘍成長遅延(TGD)に関して評価した。TGIは、次の式を使用して任意の日(対照の最大腫瘍体積(MTVが最大許容可能腫瘍体積に達したとき)に評価した： $TGI = 100 - [処置MTV / 対照MTV] \times 100$ 。

30

【0 6 2 6】

TGDは、T-Cを計算することによって評価し、式中、T = 処置群の腫瘍が所定の寸法(例えば、1,000 mm³)に達する平均時間(日数)であり、C = 対照群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間(日数)である。

【0 6 2 7】

図13Aに示されるように、用量は、すべての処置群で十分に耐容された。種々の治療群の平均腫瘍体積曲線を、図13Bに示す。図8Bに示されるように、5F9-vcMMAE免疫複合体は、3.75 mg/kgの用量で単一剤として比較的低い抗腫瘍活性を有し、15 mg/kg及び25 mg/kgの両方における5-FUの抗腫瘍活性は類似であり、それぞれ、比較的低い抗腫瘍活性を同様に有した。驚くべきことに、25 mg/kgの5-FUとともに3.75 mg/kgの免疫複合体は、処置過程に腫瘍体積を完全に壊滅させた。

40

【0 6 2 8】

腫瘍再成長動態曲線を図13Cに示す。図13Cに示されるように、本明細書に記載される3.75 mg/kgの免疫複合体及び25 mg/kgの5-FUを用いた組み合わせ処置レジメンは、投薬中に腫瘍成長を効果的に防止しただけでなく、投薬後さらに45週間、腫瘍再成長を防止した。腫瘍は、およそ50日目まで再成長を開始しなかった。

【0 6 2 9】

混合効果線形回帰モデルを使用してCPGC-11-EF01研究の縦断的分析を行っ

50

て、上述の実施例 7 に記載される方法を用いて 5 F 9 v c MMA E 免疫複合体及び 5 - F U の組み合わせ抗腫瘍有効性が相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。

【0630】

表 6 1 は、群の記号についての注釈表である。表 6 2 は、対での比較の結果を挙げる。d A U C は、参照群のものと比較した、処置 A U C で観察された減少パーセントである。負の d A U C は、参照と比較した A U C の増加として解釈される。P 値だけでなく、d A U C の評価も行うことが重要である。有意な P 値を有するが d A U C 値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

【0631】

表 6 3 は、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ（「相乗」）を示す。統計学的に優位な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも良好に機能する（すなわち、より低い A U C を有する）、亜相加的組み合わせ（「亜相加」）を示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも悪く働く、アンタゴニスト性組み合わせ（「アンタゴニスト」）を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的（「相加」）と見なされるべきである。

【0632】

【表 6 1 - 1】

表 6 1 : 注釈表

図 1 : 群毎の結果

群	注記
1 ビヒクル / 0.9 パーセント生理食塩水	V
2 209-v c MMAE 3.75 mg / kg (週 1 回) / 042	A
3 209-v c MMAE 7.5 mg / kg (週 1 回) / 042	B
4 MLN0264 3.75 mg / kg (週 1 回) / 264	C
5 MLN0264 7.5 mg / kg (週 1 回) / 264	D

【表 6 1 - 2】

6 5-Fu 15 mg / kg (3 日投薬) / 5-Fu	E
7 5-Fu 25 mg / kg (3 日投薬) / 5-Fu	F
8 MLN0264 3.75 mg / kg 5-Fu 1 5 mg / kg / 264 + 5-Fu	G
9 MLN0264 3.75 mg / kg 5-Fu 2 5 mg / kg / 5-Fu + 264	H

10

20

30

【表 6 2】

表 6 2：対での比較の結果

参照	処置	d A U C	P 値
1 V	A	− 0. 3	0. 8 3 1
2 V	B	2 3. 5	0. 1 0 7
3 V	C	3 8. 5	0. 0 2 2
4 V	D	7 4. 0	< 0. 0 0 1
5 V	E	4 4. 1	0. 0 1 0
6 V	F	5 2. 6	< 0. 0 0 1
7 V	G	7 7. 6	< 0. 0 0 1
8 V	H	1 4 3. 6	< 0. 0 0 1

10

【0 6 3 3】

20

【表 6 3】

表 6 3：組み合わせ分析の結果

	スコア	平均 誤差	P 値	評価
G	7. 0	2 0. 0	0. 7 2 8	相加
H	− 5 6. 2	1 9. 7	0. 0 0 9	相乗

30

【0 6 3 4】

表 6 3 に示されるように、相乗的活性が、M L N 0 2 6 4 3. 7 5 m g / k g 及び 5 − F U 2 5 m g / k g の処置群で達成された。

【0 6 3 5】

実施例 9：ヒト膵臓腫瘍マイクロアレイ及び臨床試料における G C C 発現

【0 6 3 6】

上述の実施例 5 I H C アッセイに基づく自動化プロトコルを使用して、雌性 S C I D マウスにおいて膵臓癌患者試料に由来する原発性ヒト腫瘍異種移植片 (P H T X)、及び商業的供給源 (例えば、U S B i o M a x a n d P a n t o m i c s) から購入した膵臓腫瘍マイクロアレイ (T M A) での G C C 発現を評価した。これらの腫瘍は、広範な腫瘍悪性度を網羅する。G C C 発現はまた、特殊な C R O (Q u a l T e k) の組織データベースから入手したヒト膵臓腫瘍資料における I C H によっても評価した。

40

【0 6 3 7】

4 ミクロンの切片を種々の組織試料から調製した。4、5 分間キシレン交換した後、蒸留水との段階的アルコール系によって、等級分けした組織切片を脱脂した。上記熱に誘発されたエпитープ回収 (S H I E R) を、B l a c k a n d D e c k e r S t e a m e r の上段のキャピラリーギャップで 2 0 分間、S H I E R 2 溶液とともに使用した。

【0 6 3 8】

【表 6 9 A】

表 6 9 A : IHC 手順

TechMate ステップ	UltraVision 検出 (UV)
1.	UltraVision Block - 15 分間
2.	一次抗体インキュベーション - 一晩
3.	一次抗体エンハンサー - 25 分間
4.	過酸化水素ブロッキング - それぞれ 2.5 分間を 3 回
5.	ポリマー検出 - 25 分間
6.	DAB 色素原 - それぞれ 5.0 分間を 3 回
7.	ヘマトキシリン対比染色 - 1 分間

10

【0639】

20

【表 6 9 B - 1】

表 6 9 B : 抗体反応性スペック表

抗体	GCC
供給源	MLNM Take da 社内抗体
カタログ番号	該当なし

30

【表 6 9 B - 2】

源／アイソタイプ	R b I g G
供給源ロット番号	判定なし
Q u a l T e k ロット番号	R 3 5 1 2
クローン	1 4 8 - 2
濃度	0. 4 7 5 μ g / m l
推奨される希釈	1. 0 μ g / m l
インキュベーション時間	一晩
予備処置	S H I E R 2、酵素なし
T e c h M a t e プロトコル	M I P
検出システム	U l t r a V i s i o n 検出システム
細胞内局在化	細胞質及び／または頂端

10

20

【 0 6 4 0 】

当業者であれば、一次抗体エンハンサーが、M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 もしくは M I L - 4 4 - 6 7 ウサギ m A b (ウサギ I g G) と同じアイソタイプを有する、ウサギ以外の種 (例えば、ヒト、ラット、ヤギ、マウス等) において発生させた抗ウサギ二次抗体、または M I L - 4 4 シグナルを増幅させるのに好適な類似の試薬であり得ることを理解するであろう。

【 0 6 4 1 】

上述のプロトコルは、非ビオチン系ペルオキシダーゼ検出 (T h e r m o / L a b V i s i o n からの U l t r a v i s i o n キット) 及び色素原としての D A B とともに、1. 0 μ g / m l の M I L - 4 4 - 1 4 8 - 2 の一晩の抗体インキュベーションを用いた。この手順を、T e c h M a t e 5 0 0 または T e c h M a t e 1 0 0 0 (R o c h e D i a g n o s t i c s) を使用して完全に自動化した。染色した後、スライドを、無水エタノールまでのアルコール系を通した後、キシレンですすいで脱水した。スライドを、カバーガラス及び C y t o S e a l で恒久的に封入した。スライドを顕微鏡下で調べて染色を評価した。陽性染色は、茶色 (D A B - H R P) の反応生成物の存在によって示される。ヘマトキシリンでの対比染色は、細胞及び組織の形態学を評価するための青色の核染色をもたらす。

30

40

【 0 6 4 2 】

H スコアのアプローチを G C C 発現の定量化に使用した。H スコアのアプローチは、強度における変動性ならびに腫瘍種の内部及びその間の腫瘍染色パーセンテージを判定するための最適なデータ分解能を提供する。それは、陽性染色の閾値を決定するための優れた手段もまた提供する。この方法において、染色強度が 0 ~ 3 + の範囲の腫瘍内細胞のパーセンテージ (0 ~ 1 0 0) が提供される。本方法により、0、0. 5、1、2、及び 3 の強度でスコアが提供される。マーカーに応じて、0. 5 の染色は、陽性または陰性としてスコア付けされ得、軽度だが認知できる、マーカーの染色を反映する。H スコアを得るためには、腫瘍細胞のパーセンテージに各強度を乗じ、一緒に加算する。

【 0 6 4 3 】

50

Hスコア = (腫瘍% × 1) + (腫瘍% × 2) + (腫瘍% × 3)。例えば、腫瘍が、20%陰性(0)、30% + 1、10% + 2、40% + 3である場合、170のHスコアが得られるであろう。

【0644】

腫瘍細胞のうちの100%が3+強度を有する場合、細胞内局所化(すなわち、頂端または細胞質)当たりの最大Hスコアは300(100% × 3)である。最初は、対照として、総Hスコアは単独では試料の比較には使用されないが、各強度における細胞のパーセンテージの内訳の確認に加えて、評価される。例えば、90のスコアは、腫瘍細胞の90%が1+強度で染色されているか、細胞の30%が3+強度で染色されていることを表し得る。これらの試料は、同じHスコアを有するが、GCC発現は大きく異なる。各強度にスコア付けされる細胞のパーセンテージは多様であり得るが通常は10%の増分でスコア付けされるが、しかしながら、単一の成分のわずかな比率のスコア付けは、何らかのレベルの染色が存在することを示すためには、同様に1%~5%と推定され得る。GCCについては、頂端染色は、1及び5%等の低いレベルの増分で評価することが考慮され得る。

10

【0645】

2つの異なる細胞内局在化は、Hスコアを用いてGCCに関してスコア付けすることができる。これらには、細胞質染色及び頂端関連染色が含まれる。細胞質染色パターンを、一般に、腫瘍細胞の細胞質全体に広がる拡散として観察した。しかしながら、いくつかの事例においては細胞質染色の変化形が存在し、これには、強力な球状染色または点状染色、粗い粒状の染色が含まれた。強力な粒状染色を、3+の細胞質染色としてスコア付けした。点状染色は頂端染色と関連し、この種類の細胞質染色には別個のスコアは与えられなかった(点状染色はn = 4個の試料)。GCC頂端染色は、内腔が存在していた場合に観察された。観察される他のGCC染色パターンには、膜様、非内腔染色(1例)及び腫瘍内腔に存在する細胞外染色が含まれる。正常な結腸組織では、染色は、一般に、拡散した細胞質染色を伴って頂端側であった。

20

【0646】

Hスコアは細胞質及び頂端の両方のGCC発現に関して得られたため、また局在化の一種がGCC標的化療法の有効性に関してもう一方のものよりも重要であるかどうか不明であるため、すべてのデータを捕捉し、いくつかの事例では、頂端及び細胞質の両方のGCC発現の合計を使用して、集合的なHスコアを生成した。そのような事例では、最大Hスコアは、集合的スコアの600となった(頂端300 + 細胞質300)。

30

【0647】

218個の原発性及び転移性膵臓腫瘍をスクリーニングした。137個がGCCを発現し、58個の試料が、組み合わせた100以上の細胞質及び頂端のHスコアを有した。137個のGCC陽性試料のHスコアの図式概要を図14に示す。

【0648】

実施例10：抗GCC免疫複合体及びゲムシタビンの組み合わせ投与のインビボ評価

【0649】

この研究の目的は、マウス異種移植片原発性ヒト腫瘍外植片(膵臓癌のPHTXモデル)における5F9 v c MMA E免疫複合体(本明細書でしばしば「MLN0264」と称される)及びゲムシタビンの組み合わせ投与によって誘発されるインビボ抗腫瘍活性を評価することであった。これらのモデルは、野生型及び突然変異KRASを有する患者由来の腫瘍組織を含んだ。Champions Oncology (Hackensack, NJ)をそれらのCTGプラットフォームを使用して、5つの膵臓PHTXを生成した。2つのPHTXモデルを社内で開発した。上述の自動化されたIHCアッセイを使用して、7つのPHTXモデルのそれぞれにおいて、GCC発現を評価した。5つのChampionモデル(CTGモデル)及び2つの社内モデル(PHTXモデル)のGCC IHC Hスコアを、表70に示す。

40

【0650】

50

【表 70-1】

表 70: Champions からの脾臓 PHTX モデルにおける G C C 発現

PHT Xモデル	G G G I H C Hスコア A/C	K R A S 突然 変異体
CTG -03 00	150/250	G12V
CTG -03 00	210/250	野生型
CTG -03 00	300/220	G12R
CTG -03 00	300/250	野生型
CTG -04 92 PHT	130/250 230/260	G12V 野生型

10

20

【表 70-2】

X-2 15P a PHT X-2 49P a	0/220	G12D
---	-------	------

【0651】

30

単一剤 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体のインビボ抗腫瘍研究を、7つすべての脾臓皮下異種移植片マウスモデルにおいて行った。動物に、ビヒクル、0.135mg/kg の遊離 M M A E、週 1 回 7.5mg/kg の非 G C C 標的 A D C、または週 1 回 3.75もしくは 7.5mg/kg の 5 F 9 v c M M A E を投与した。P H T X-215Pa 及び P H T X-249Pa モデルにおける免疫複合体の単一剤活性の結果は、それぞれ、図 15A 及び 15B に示す。

【0652】

図 15A に示されるように、7.5mg/kg の 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体は、P H T X-215Pa モデル (K R A S 野生型) において、22日目までに、3.75mg/kg の 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体中の遊離 M M A E と対比して、有意に優れた腫瘍成長阻害 (T G I) をもたらした。これには、8匹中3匹の動物における腫瘍退縮が含まれた。7.5mg/kg の用量の 5 F 9 v c M M A E はまた、腫瘍再成長の遅延ももたらした。同様に、図 15B に示されるように、P H T X-249Pa モデルにおいて、単一剤の 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体は、21日目までに、ビヒクルまたは遊離 M M A E と対比して、有意な T G I を示した。7.5mg/kg の 5 F 9 v c M M A E は、P H T X-249Pa モデル (K R A S G12D) において、20~22日目まで、3.75mg/kg の用量よりも有意に良好であった。表 71 は、7つすべての脾臓腫瘍異種移植片モデル全体の単一剤 5 F 9 v c M M A E 活性を用いた T G I データを要約する。

40

【0653】

50

【表 7 1 - 1】

表 7 1 : 膀胱 PHTX モデルにおける単一剤抗腫瘍活性

モデル	GCC I HC 総H スコア	KRAS 状態	TGI、 %*	dAUC P 値 [†]
PHTX -215	490	野生型	79	<0.001
CTG- 0300	400	Mut G12 V	64	<0.001

10

【表 7 1 - 2】

CTG- 0492	380	Mut G12 V	62	0.001
PHTX -249	220	Mut G12 D	47	<0.001
CTG- 0300	550	野生型	45	0.028
CTG- 0300	520	Mut G12 R	36	0.006
CTG- 0300	460	野生型	24	0.17
*週1回×5の投薬スケジュールを使用し、それぞれ28日目及び38日目にTGIを判定したCTG-0300及びCTG-0303を除き、すべてのモデルのTGIを21日目に判定した。 [†] P値はdAUCに基づく				

20

30

【0654】

PHTX-249 Pa 皮下異種移植片を有する雌性CB-17 SCIDマウスに静脈内投与した5F9 vcMMAE免疫複合体及びゲムシタビンの抗腫瘍活性（研究番号CPGC-13-EF05及びCPGC-13-EF08）

【0655】

この研究の目的は、CB17 SCID FマウスのPHTX-249 Pa 皮下異種移植片において、静脈内投与される週2回（BIW）の15mg/kg及び20mg/kgのゲムシタビンまたは各週1日目及び3日目の15mg/kgのゲムシタビンと組み合わせた、週1回（QW）の7.5mg/kgの5F9 vcMMAE免疫複合体の相乗的または相加的抗腫瘍活性を判定することであった。GCCに非特異的な抗体を有するvcMMAE免疫複合体（209-vcMMAEと称される）を対照として使用した。用量製剤を表71A及び表71Bに従って調製した。研究設計を表72A及び72Bに示す。

40

【0656】

【表 7 1 A - 1】

表 7 1 A : 用量製剤の調製－研究 C P G C - 1 3 - E F 0 5

薬剤	用量 量 (mg 粉末)	投薬溶液濃度 (mg/mL)	ビヒクル	抗体：薬物
5 F 9 v c M M A E 免疫複合体	7. 5 m g / k g 3 7 7 . 8 u l	1. 4 6 2 5	0. 9 % 生 理食塩水	1 : 4. 3
ゲムシタビン	1 5. 0 m g / k g 1 1 5. 4 u l	2. 9 2 5	0. 9 % 生 理食塩水	

10

【表 7 1 A - 2】

ゲムシタビン	2 0. 0 m g / k g 3 0 7. 9 u l	3. 9	0. 9 % 生 理食塩水
--------	---	------	------------------

【0 6 5 7】

ゲムシタビンのストック溶液濃度は 3 8 m g / m l である

【0 6 5 8】

【表 7 1 B】

表 7 1 B : 用量製剤の調製－研究 C P G C - 1 3 - E F 0 8

薬剤	用量 量 (mg 粉末)	投薬溶液濃度 (mg/mL)	ビヒクル
5 F 9 v c M M A E 免疫複合体	7. 5 m g / k g 7 2 6. 9 u l	1. 4 7 8	0. 9 % 生 理食塩水
ゲムシタビン	1 5. 0 m g / k g 2 6 4. 4 u l	2. 9 5 5	0. 9 % 生 理食塩水

30

M L N 0 2 6 4 のストック溶液濃度は、4 0 匹のマウスについて 8. 1 3 m g / m l であり、体重 1 9. 7 g に基づいて M L N 0 2 6 4 が合計 5. 1 9 m g 必要であり、7 2 6. 9 u l のストック溶液を 3 2 7 3. 1 u l の N S に入れる。

ゲムシタビン：ストック濃度は 3 8 m g / m l であり、体重 1 9. 7 g に基づいて合計 1 0. 0 4 7 m g が必要とされる。2 6 4. 4 u l のストックゲムシタビンを 3 1 3 5. 6 u l N S に入れる。

【0 6 5 9】

【表 7 2 A - 1】

表 7 2 A : C P G C - 1 3 - E F 0 5 の研究設計

処置群	試験項目	シーク エンシ ング	ビビク ル	動物 数/ 群	用量 レベル (m g / k g)	投薬経 路/投 薬レジ メン/ 投薬期 間	用量 溶液 濃度 (m g / m l)	*投 薬 体積 (m l)	エンドポイン ト
1	0. 9 % 生理食塩 水		該当な し	6	該当な し	静脈内 / 週 1 回 × 2 1 日間	0	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
2	5 F 9 v c M M A E 免疫 複合体		0. 9 % 生理 食塩水	6	7. 5	静脈内 / 週 1 回 × 2 1 日間	1. 4 6 2 5	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超

10

【表 7 2 A - 2】

									える
3	ゲムシタ ビン		0. 9 % 生理 食塩水	6	1 5. 0	静脈内 / 週 2 回 × 2 1 日間	2. 9 2 5	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
4	ゲムシタ ビン		0. 9 % 生理 食塩水	6	2 0. 0	静脈内 / 週 2 回 × 2 1 日間	3. 9	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
5	5 F 9 v c M M A E 免疫 複合体, ゲムシタ ビン	同時	0. 9 % 生理 食塩水、0. 9 % 生 理食塩 水	6	7. 5 、1 5 . 0	静脈内 / 週 1 回、静 脈内/ 週 2 回 × 2 1 日間	1. 4 6 2 5 、2. 9 2 5	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える
6	5 F 9 v c M M A E 免疫 複合体, ゲムシタ ビン	同時	0. 9 % 生理 食塩水、0. 9 % 生 理食塩 水	6	7. 5 、2 0 . 0	静脈内 / 週 1 回、静 脈内/ 週 2 回 × 2 1 日間	1. 4 6 2 5 、3. 9	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 % に 達するか、ま たは体重減少 が 2 0 % を超 える

20

30

40

【0 6 6 0】

【表 7 2 B - 1】

表 7 2 B : C P G C - 1 3 - E F 0 8 の研究設計

処置群	試験項目	シーケ エンシ ング	ビビク ル	動物 数/ 群	用量 レベル (m g / k g)	投薬経 路/投 薬レジ メン/ 投薬期 間	用量 溶液 濃度 (m g / m l)	*投 薬 体積 (m l)	エンドポイン ト
1	0.9% 生理食塩 水、0.5%HP MC+0.2%T	同時	該当な し	7	該当な し	静脈内 /週1 回×2 1日間	0	0.1	腫瘍体積が体 重の10%に 達し、体重減 少が20%で ある

10

【表 7 2 B - 2】

	WEEN 80								
2	MLN0 264		0.9 %生理 食塩水	7	7.5	静脈内 /週1 回×2 1日間	1.4 78	0.1	腫瘍体積が体 重の10%に 達し、体重減 少が20%で ある
3	ゲムシタ ビン		0.9 %生理 食塩水	7	15.0	静脈内 /週2 回×2 1日間	2.9 55	0.1	腫瘍体積が体 重の10%に 達し、体重減 少が20%で ある
4	ゲムシタ ビン		0.9 %生理 食塩水	7	15.0	静脈内 /2日 に1回 ×2/ 週×2 1日間	2.9 55	0.1	腫瘍体積が体 重の10%に 達し、体重減 少が20%で ある
5	MLN0 264、 ゲムシタ ビン	同時	0.9 %生理 食塩水 、0.9 %生理 食塩水	7	7.5 、15 .0	静脈内 /週1 回、静 脈内/ 週2回 ×21 日間	2.9 55、 1.4 78	0.2	腫瘍体積が体 重の10%に 達し、体重減 少が20%で ある
6	MLN0 264、 ゲムシタ ビン	同時	0.9 %生理 食塩水 、0.9 %生理 食塩水	7	7.5 、15 .0	静脈内 /週1 回、静 脈内/ 2日に 1回× 週2回 ×21 日間	2.9 55、 1.4 78	0.2	腫瘍体積が体 重の10%に 達し、体重減 少が20%で ある

20

30

40

【0 6 6 1】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の10%に達する、またはb) 体重減少が20%を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、200mm

50

³であった。

【0662】

0日目、処置の最初の日であった。投薬前1日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、27～30ゲージ、長さ1/2～3/4インチの1ccのシリンジを使用しておよそ0.1mlの用量を静脈内投与で受容させた。動物に、19.7グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

【0663】

ノギス(0.01mm)を使用して腫瘍体積の測定値を1週間に2回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$V = W^2 \times L / 2$ (V = 腫瘍体積、W = 腫瘍の単軸に沿って測定した幅、L = 腫瘍の短軸に沿って測定した長さ)。体重測定値もまた、Mettler計量器(0.1gm)を使用して1週間に2回取得した。

【0664】

有効性を、腫瘍成長阻害(TGI)%及び腫瘍成長遅延(TGD)に関して評価した。TGIは、次の式を使用して任意の日(対照の最大腫瘍体積(MTVが最大許容可能腫瘍体積に達したとき)に評価した： $TGI = 100 - [処置MTV / 対照MTV] \times 100$ 。腫瘍体積が約230mm³に達したときに、動物を処置した。

【0665】

TGDは、T-Cを計算することによって評価し、式中、T = 処置群の腫瘍が所定の寸法(例えば、1,000mm³)に達する平均時間(日数)であり、C = 対照群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間(日数)である。

【0666】

PHTX-249Paモデルにおいて試験した種々の投薬スケジュール及び濃度からの結果の比較を、図16Aに示す。PHTX-249Paモデルにおける種々の処置群の平均腫瘍体積曲線を図16Bに示す。顕著なことに、7匹中3匹の動物が、5F9 v c M M A E免疫複合体とゲムシタビン15mg/kg(1日目及び3日目)との組み合わせにより腫瘍退縮を有したが、一方で単一剤のゲムシタビンまたは単一剤の免疫複合体(7.5mg/kg)では腫瘍退縮は見られなかった。それぞれの腫瘍成長遅延は、70.5及び17日であった。すべての用量が、十分に耐容された。

【0667】

実施例7に記載される方法を用いて、混合効果線形回帰モデルを使用してC P G C - 1 3 - E F 0 5及びC P G C - 1 3 - E F 0 8研究の縦断的分析を行って、5F9 v c M M A E免疫複合体及びゲムシタビンの抗腫瘍有効性が、相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。表72A及び72Bは、群の記号についての注釈表である。表73A及び73Bは、対での比較の結果を挙げる。d A U Cは、参照群のものと比較した、処置AUCで観察された減少パーセントである。負のd A U Cは、参照と比較したAUCの増加として解釈される。P値だけでなく、d A U Cの評価も行うことが重要である。有意なP値を有するがd A U C値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

【0668】

表74A及び74Bは、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ(「相乗」)を示す。統計学的に優位な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも良好に機能する(すなわち、より低いAUCを有する)、亜相加的組み合わせ(「亜相加」)を示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも悪く働く、アンタゴニスト性組み合わせ(「アンタゴニスト」)を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的(「相加」)と見なされるべきである。

【0669】

【表 7 2 A - a】

表 7 2 A : C P G C - 1 3 - E F 0 5 研究の注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0. 9パーセント生理食塩水	V
2 MLN0264 7. 5mg/kg (週1回) / 264	A
3 ゲムシタビン15mg/kg (週2回)、腹腔内／ゲムシタビン	B
4 ゲムシタビン20mg/kg (週2回)、腹腔内／ゲムシタビン	C
5 MLN0264 7. 5mg/kg (週1回) ゲムシタビン15mg/kg (週2回) / ゲムシタビン+264	D
6 MLN0264 7. 5mg/kg ゲムシタビン20mg/kg (週2回) / ゲムシタビン+264	E

10

【0 6 7 0】

【表 7 2 B - a】

表 7 2 B : C P G C - 1 3 - E F 0 8 研究の注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0. 5パーセントHPMC+0. 2パーセントTWEEN8 0+0. 9パーセント生理食塩水	V
2 MLN0264 7. 5mg/kg (週1回) / 264	A
5 ゲムシタビン15mg/kg (週2回) / ゲムシタビン	D
6 ゲムシタビン15mg/kg (1日目、3日目/週) / ゲムシタビン	E
7 ML0264 7. 5mg/kg (週1回) ゲムシタビン15mg/kg (週2回) / ゲムシタビン+264	F
8 ML0264 7. 5mg/kg (週1回) ゲムシタビン15mg/kg (1日目、3日目/週) / ゲムシタビン+264	G

20

【0 6 7 1】

【表 7 3 A】

表 7 3 A : C P G C - 1 3 - E F 0 5 研究の対での比較の結果

参照	処置	dAU C	P値
1 V	A	26. 4	0. 013
2 V	B	46. 0	0. 01
3 V	C	46. 7	<0. 001
4 V	D	70. 1	<0. 001
5 V	E	66. 9	<0. 001

30

40

【0 6 7 2】

【表 7 3 B】

表 7 3 B : C P G C - 1 3 - E F 0 8 研究の対での比較の結果

参照	処置	d A U C	P 値
1 V	A	2 8. 9	< 0. 0 0 1
4 V	D	5 2. 4	< 0. 0 0 1
5 V	E	7 6. 9	< 0. 0 0 1
6 V	F	8 2. 1	< 0. 0 0 1
7 V	G	9 7. 0	< 0. 0 0 1

10

【 0 6 7 3】

【表 7 4 A】

表 7 4 A : C P G C - 1 3 - E F 0 5 研究の組み合わせ分析の結果

	スコア	平均 誤差	P 値	評価
D	2. 9	1 5. 9	0. 8 5 8	相加
E	4. 0	1 3. 0	0. 7 6 4	相加

20

【 0 6 7 4】

【表 7 4 B】

表 7 4 B : C P G C - 1 3 - E F 0 8 研究の組み合わせ分析の結果

	スコア	平均 誤差	P 値	評価
F	- 0. 4	9. 2	0. 9 6 8	相加
G	8. 1	1 0. 7	0. 4 5 7	相加

30

【 0 6 7 5】

表 7 4 A 及び 7 4 B に示されるように、相加的活性が、すべての組み合わせ処置群にわたって見られた。

【 0 6 7 6】

P H T X - 2 1 5 P a 皮下異種移植片を有する雌性 C B - 1 7 S C I D マウスにお静脈内投与した 5 F 9 v c M M A E 免疫複合体及びゲムシタビンの抗腫瘍活性（研究番号 C P G C - 1 3 - E F 1 0）

40

【 0 6 7 7】

この研究の目的は、C B 1 7 S C I D F マウスの P H T X - 2 1 5 P a 皮下異種移植片において、1 日目、3 日目のスケジュールの 1 5 m g / k g のゲムシタビンと組み合わせた、週 1 回のスケジュールにおける 3. 7 5 及び 7. 5 m g / k g の M L N 0 2 6 4 の相乗的及び相加的抗腫瘍活性を判定することであった。用量製剤を表 7 5 に従って調製した。研究設計を表 7 6 に示す。

【 0 6 7 8】

50

【表 7 5】

表 7 5 : 用量製剤の調製

薬剤	用量	量 (粉末 mg) 液 体 u l	投薬溶液濃度 (m g / mL)	ビヒクル	抗体 : 薬物
5 F 9 v c MMAE 免疫複合体	3. 7 5 mg / k g		0. 7 2 7 5	0. 9 % 生 理食塩水	1 : 4
5 F 9 v c MMAE 免疫複合体	7. 5 m g / k g	5 0 1. 1 u l	1. 4 5 5	0. 9 % 生 理食塩水	1 : 4
ゲムシタビン	1 5. 0 mg / k g	1 8 3. 8 u l	2. 9 1	0. 9 % 生 理食塩水	
ゲムシタビン	2 0. 0 mg / k g		3. 8 8	0. 9 % 生 理食塩水	
ML 0 0 6 8 7 2 1 7 - 7 3 0 - C (ゲムシ タビン)	4 0. 0 mg / k g	4 0 8. 4 u l	7. 7 6	0. 9 % 生 理食塩水	

10

【 0 6 7 9】

20

【表 7 6 - 1】

表 7 6 : C P G C - 1 3 - E F 1 0 研究設計

処置群	試験 項目	シーク エンシ ング	ビヒク ル	動物 数 / 群	用量 レベル (m g / k g)	投薬経 路 / 投 薬レジ メン / 投薬期 間	用量 溶液 濃度 (m g / m l)	* 投 薬 体積 (m l)	エンドポイン ト
1	2 0 % HP b C D、0. 9 % 生理	同時	該当な し	8	該当な し	皮下 / 週 2 回 、 静脈 内 / 週	0	0. 1、 0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 % に 達するか、体 重減少が 2

30

【表 7 6 - 2】

	食塩水					1 回× 2 1 日 間			0 %を超える
2	MLN0 2 6 4		0. 9 %生理 食塩水	8	3. 7 5	静脈内 ／週 1 回× 2 1 日間	0. 7 2 7 5	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 %に 達するか、体 重減少が 2 0 %を超える
3	MLN0 2 6 4		0. 9 %生理 食塩水	8	7. 5	静脈内 ／週 1 回× 2 1 日間	1. 4 5 5	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 %に 達するか、体 重減少が 2 0 %を超える
4	ゲムシタ ビン		0. 9 %生理 食塩水	8	1 5. 0	静脈内 ／ 1 日 1 回／ 週× 2 1 日間	2. 9 1	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 %に 達するか、体 重減少が 2 0 %を超える
5	MLN0 2 6 4、 ゲムシタ ビン	同時	0. 9 %生理 食塩水 、0. 9 %生 理食塩 水	8	3. 7 5、1 5. 0	静脈内 ／週 1 回、静 脈内／ 1 日 1 回× 2 ／週× 2 1 日 間	0. 7 2 7 5 、2. 9 1	0. 1、 0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 %に 達するか、体 重減少が 2 0 %を超える
6	MLN0 2 6 4、 ゲムシタ ビン	同時	0. 9 %生理 食塩水 、0. 9 %生 理食塩 水	8	7. 5 、1 5 . 0	静脈内 ／週 1 回、静 脈内／ 1 日 1 回× 2 ／週× 2 1 日 間	1. 4 5 5、 2. 9 1	0. 1、 0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 %に 達するか、体 重減少が 2 0 %を超える
7	ゲムシタ ビン		0. 9 %生理 食塩水	8	2 0. 0	静脈内 ／週 2 回× 2 1 日間	3. 8 8	0. 1	腫瘍体積が体 重の 1 0 %に 達するか、体 重減少が 2 0 %を超える

【0 6 8 0】

各処置群のエンドポイントは、a) 腫瘍体積が体重の 1 0 %に達する、または b) 体重減少が 2 0 %を超える、のいずれかであった。研究開始日の投影腫瘍体積は、2 0 0 m m³であった。

【0 6 8 1】

0 日目が、処置の最初の日であった。投薬前 1 日以内に、すべての動物の体重をグラム単位で計量し、群に分けた。投薬溶液は、化合物の正確な送達を確実にするために各投与前にボルテックスした。動物に、2 7 ~ 3 0 ゲージ、長さ 1 / 2 ~ 3 / 4 インチの 1 c c のシリンジを使用しておよそ 0. 1 m l の用量を静脈内投与で受容させた。動物に、1 9. 4 グラムの平均体重に基づいて投薬を行った。

【0 6 8 2】

10

20

30

40

50

ノギス（0.01mm）を使用して腫瘍体積の測定値を1週間に2回取得した。次の式を使用して腫瘍体積を計算した：

$= W^2 \times L / 2$ （V＝腫瘍体積、W＝腫瘍の単軸に沿って測定した幅、L＝腫瘍の短軸に沿って測定した長さ）。体重測定値もまた、Met t l e r 計量器（0.1gm）を使用して1週間に2回取得した。

【0683】

有効性を、腫瘍成長阻害（TGI）%及び腫瘍成長遅延（TGD）に関して評価した。TGIは、次の式を使用して任意の日（対照の最大腫瘍体積（MTVが最大許容可能腫瘍体積に達したとき）に評価した： $TGI = 100 - [処置MTV / 対照MTV] \times 100$ 。腫瘍体積が約230mm³に達したときに、動物を処置した。

10

【0684】

TGDは、T－Cを計算することによって評価し、式中、T＝処置群の腫瘍が所定の寸法（例えば、1,000mm³）に達する平均時間（日数）であり、C＝対照群の腫瘍が所定の寸法に達する平均時間（日数）である。

【0685】

PHTX-215Paモデルにおける種々の処置群の平均腫瘍体積曲線を図16Cに示す。図16Cに示されるように、ゲムシタビンと組み合わせた5F9 v c MMA E 免疫複合体はまた、PHTX-215モデルにおいて、強化されたTGI及び腫瘍退縮をもたらした。顕著なことに、8匹すべての動物が、免疫複合体とゲムシタビン15mg/kg（1日目及び3日目）との組み合わせにより腫瘍退縮を有した（TGI93%）が、一歩づえ単一剤のゲムシタビンでは腫瘍退縮は見られなかった（TGI69%）。それぞれの腫瘍成長遅延は、60.4及び22.7日であった。すべての用量が、十分に耐容された。

20

【0686】

実施例7に記載される方法を用いて、混合効果線形回帰モデルを使用してCPGC-13-EF10研究の縦断的分析を行って、5F9 v c MMA E 免疫複合体及びゲムシタビンの抗腫瘍有効性が、相加的であるかまたは相乗的であるかを部分的に判定した。表77A、群の記号についての注釈表。表77Bは、対での比較の結果を挙げる。dAUCは、参照群のものと比較した、処置AUCで観察された減少パーセントである。負のdAUCは、参照と比較したAUCの増加として解釈される。P値だけでなく、dAUCの評価も行うことが重要である。有意なP値を有するがdAUC値が小さいものの比較は、対象とはならない場合がある。

30

【0687】

表77Cは、相乗性分析について記載する。統計学的に有意な負の相乗性スコアは、相乗的な組み合わせ（「相乗」）を示す。統計学的に優位な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも良好に機能する（すなわち、より低いAUCを有する）、亜相加的組み合わせ（「亜相加」）を示す。統計学的に有意な正の相乗性スコアは、組み合わせが最も優良な単一剤よりも悪く働く、アンタゴニスト性組み合わせ（「アンタゴニスト」）を示す。統計学的に有意でないスコアは、相加的（「相加」）と見なされるべきである。

40

【0688】

【表 7 7 A】

表 7 7 A : 注釈表

群	注記
1 ビヒクル／0. 9パーセント生理食塩水＋20パーセントHP b CD	V
2 MLN0264 3. 75mg／kg (週1回)／264	A
3 MLN0264 7. 5mg／kg (週1回)／264	B
4 ゲムシタビン15mg／kg (1日目、3日目／週)×3／ゲム シタビン	C
5 ML0264 3. 75mg／kg (週1回) Gem15mg／ kg (1日目、3日目／週×3)／ゲムシタビン＋264	D
6 ML0264 7. 5mg／kg (週1回) Gem15mg／k g (1日目、3日目／週×3)／ゲムシタビン＋264	E
7 ゲムシタビン20mg／kg (週2回)／ゲムシタビン	F

10

【0689】

【表 7 7 B】

表 7 7 B : 対での比較

参照	処置	dAU C	P値
1 V	A	36. 3	<0. 001
2 V	B	75. 1	<0. 001
3 V	C	61. 0	<0. 001
4 V	D	11 2. 1	<0. 001
5 V	E	14 4. 0	<0. 001
6 V	F	65. 2	<0. 001
7 V	G	30. 5	<0. 001

20

30

【0690】

【表 7 7 C】

表 7 7 C : 相乗性分析

スコア	平均 誤差	P値	評価
D -1 4. 0	1 1. 4	0. 2 33	相加
E -7. 9	1 2. 4	0. 5 33	相加

40

【0691】

表 7 7 に示されるように、相加的活性が、組み合わせ処置群にわたって確認された。

【0692】

要約すると、これらのデータは、5F9 vcMMAE免疫複合体が、GCCを発現する膵臓癌異種移植片モデルにおいて活性を呈することを示す。免疫複合体は、GCCを発現する膵臓癌異種移植片モデルにおいて、ゲムシタビンとの組み合わせで、いずれかの薬剤単独と比較して強化された抗腫瘍活性を呈する。これらのデータは、免疫複合体が、単

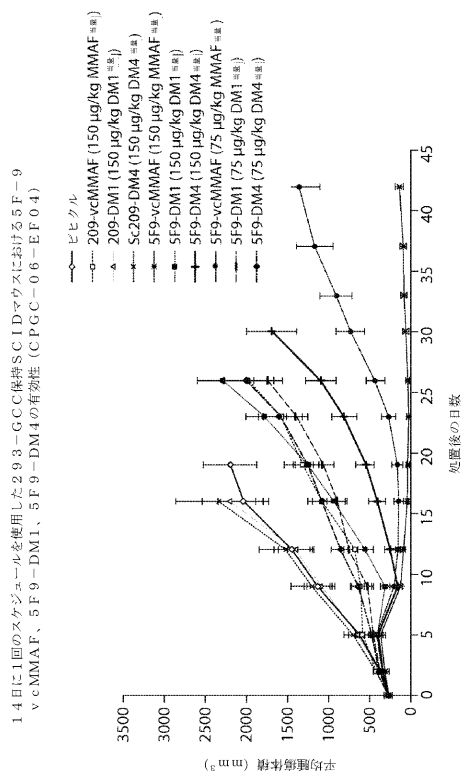
50

一剤として、またゲムシタビンと組み合わせて、膵臓癌を有する患者の可能性のある治療法として臨床検査に好適であり得ることを示唆する。

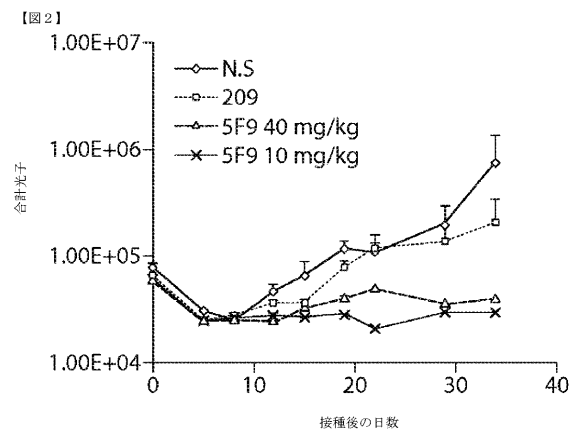
【0693】

本発明は、その提供される実施形態を参照して示され、記載されているが、添付の特許請求の範囲によって包含される形態及び詳細において種々の変更がなされ得ることが当業者には理解されるであろう。

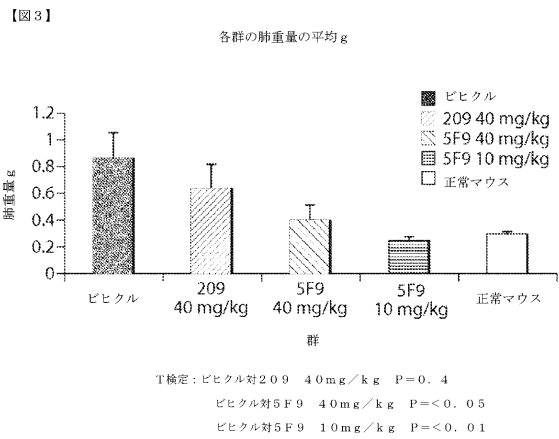
【図1】



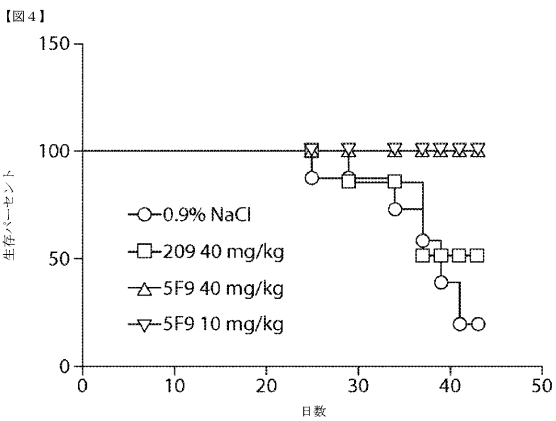
【図2】



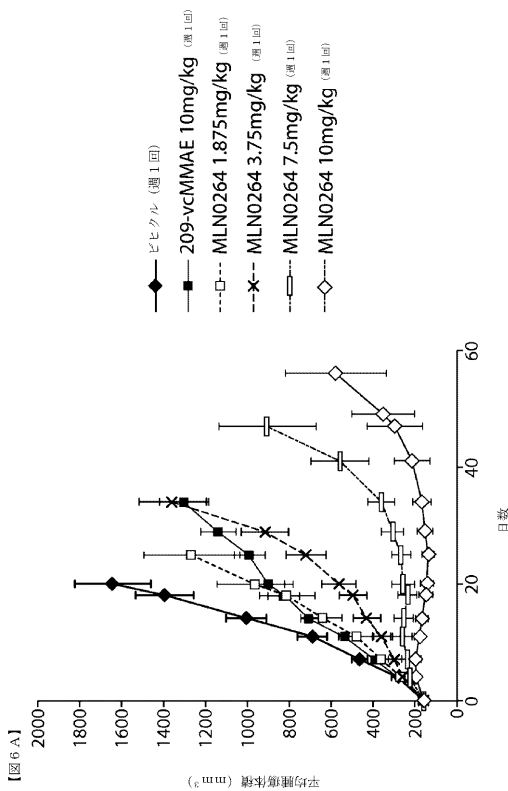
【図 3】



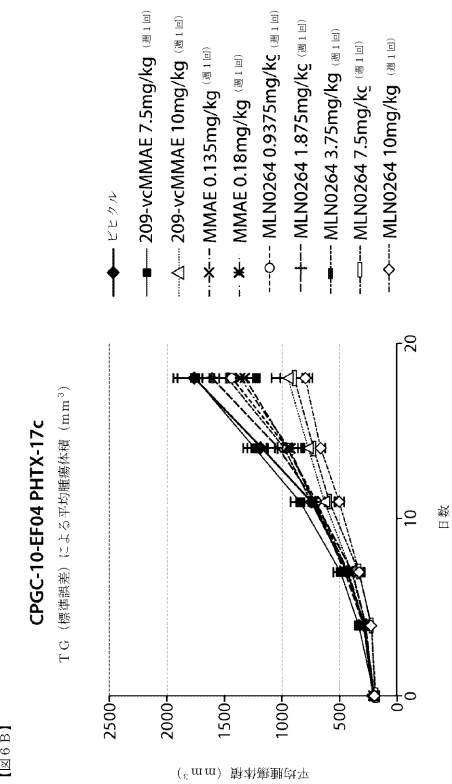
【図 4】



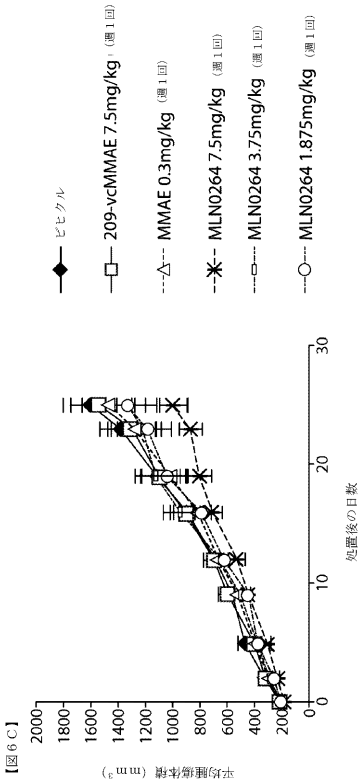
【図 6 A】



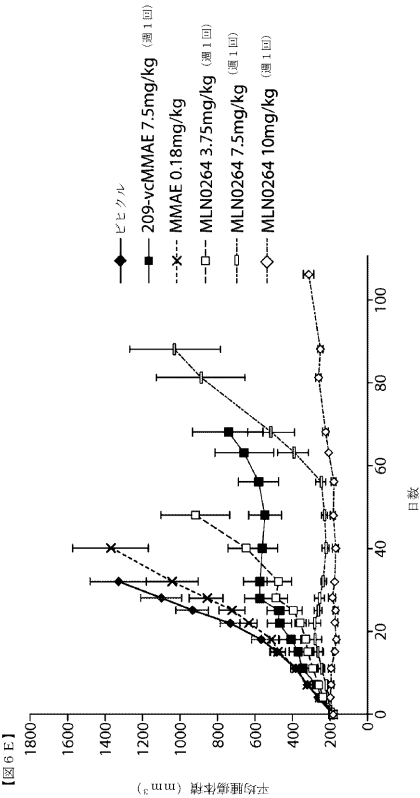
【図 6 B】



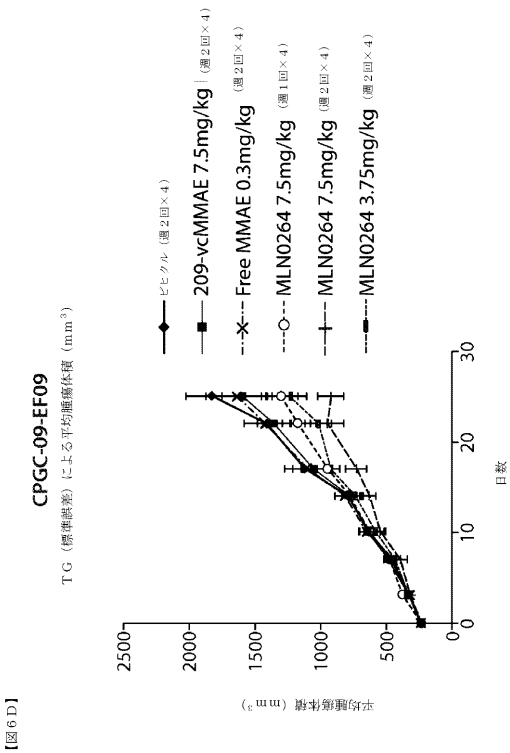
【図 6 C】



【図 6 E】



【図 6 D】



【図 7 A】

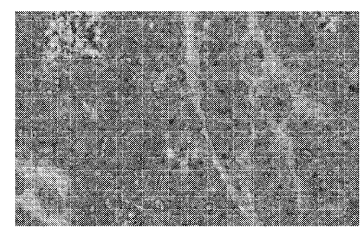


Fig. 7A

【図 7 B】

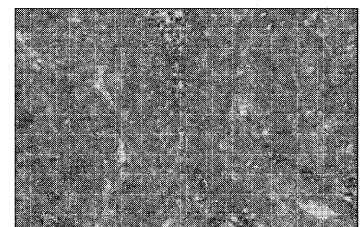
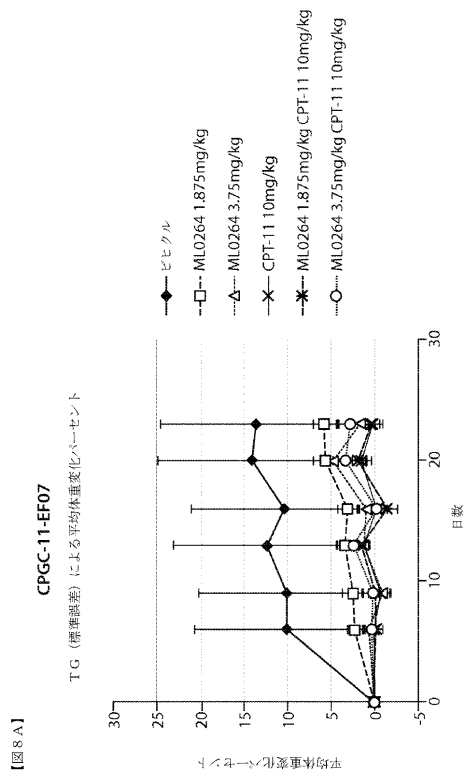
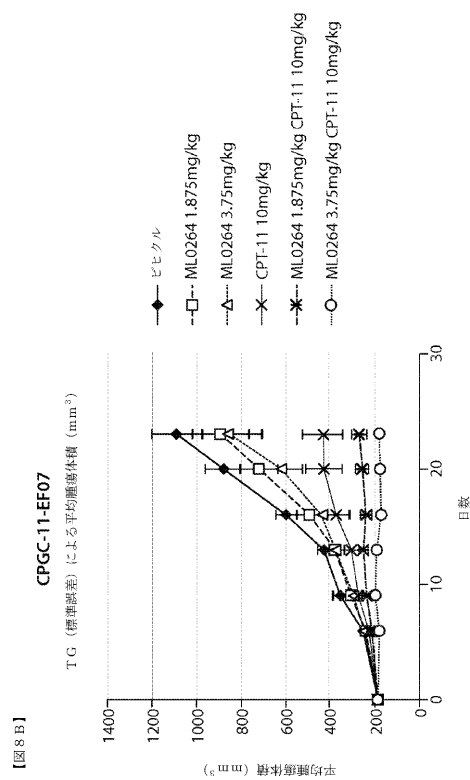


Fig. 7B

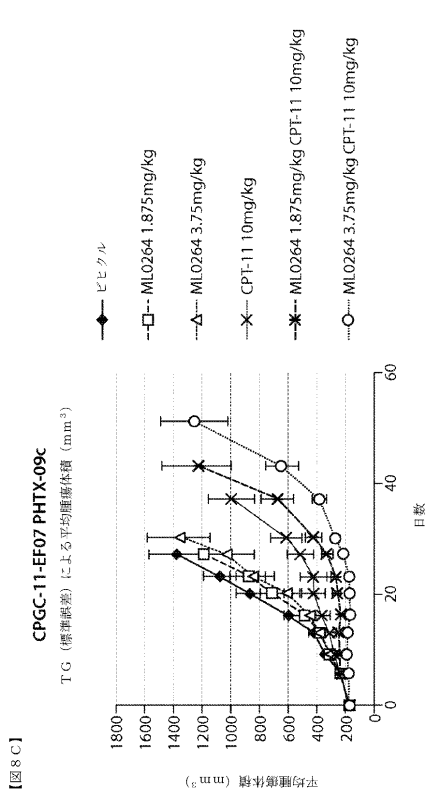
【図 8 A】



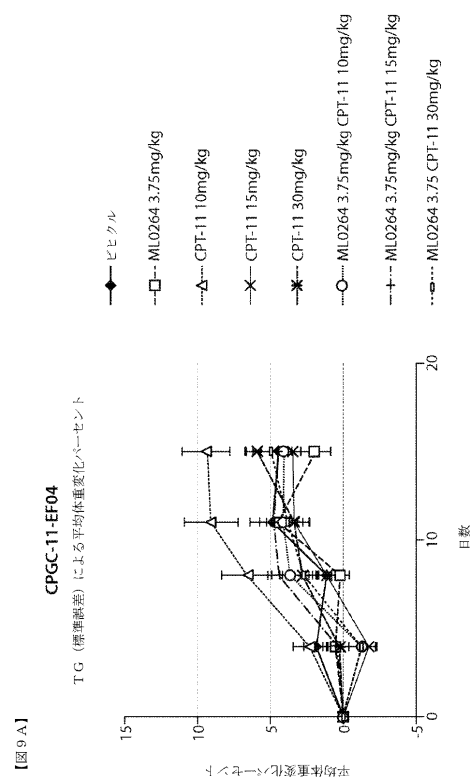
【図 8 B】



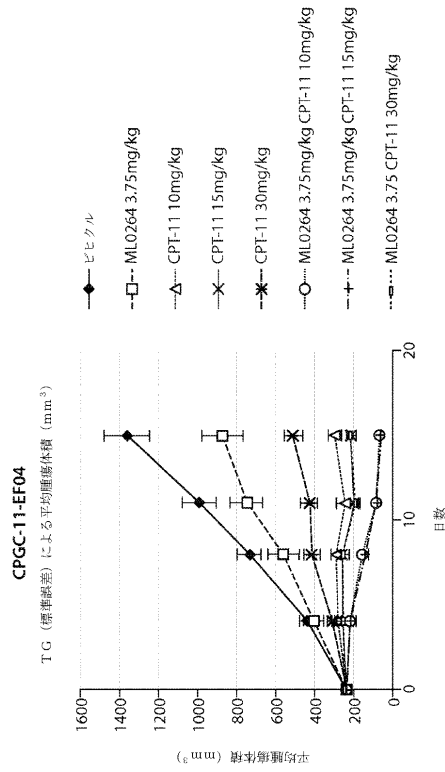
【図 8 C】



【図 9 A】

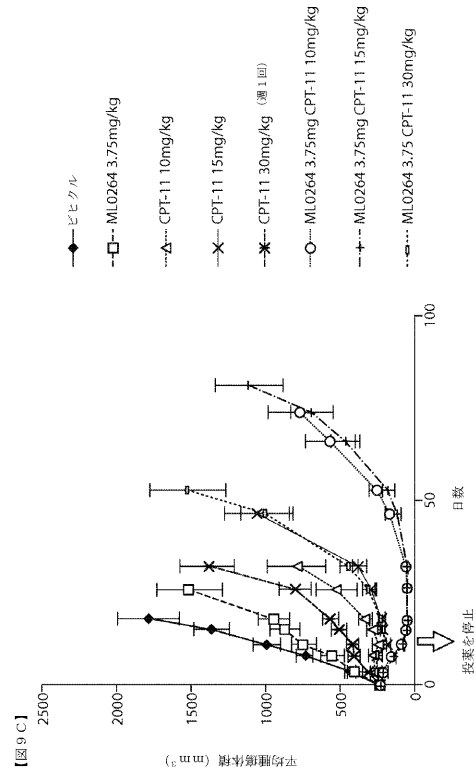


【図 9 B】



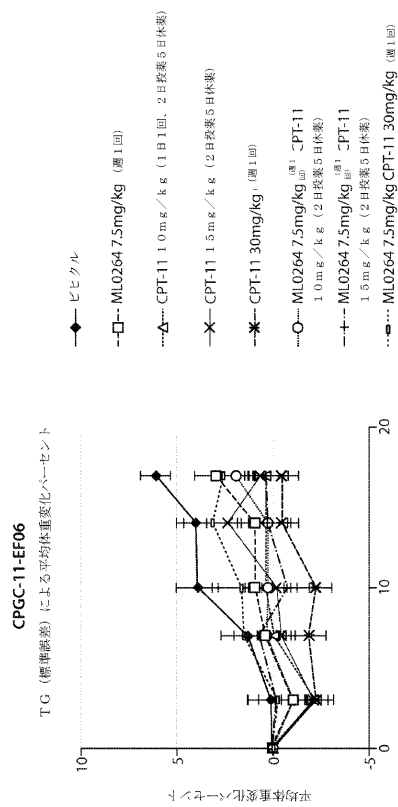
【図 9 B】

【図 9 C】



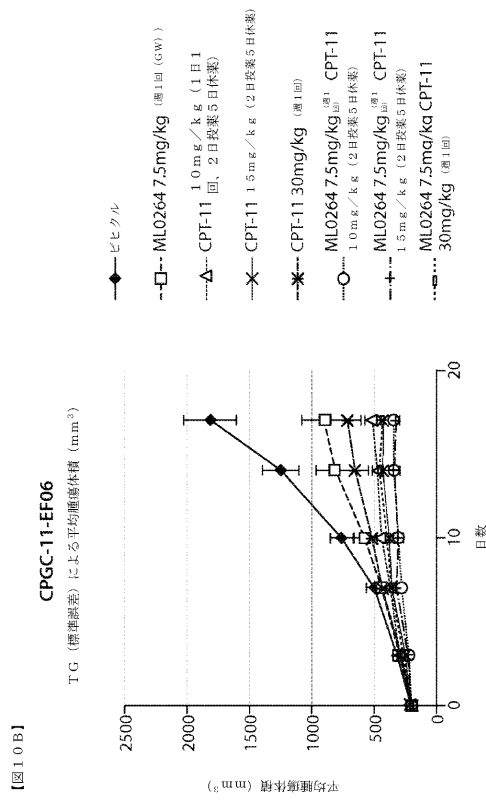
【図 9 C】

【図 10 A】



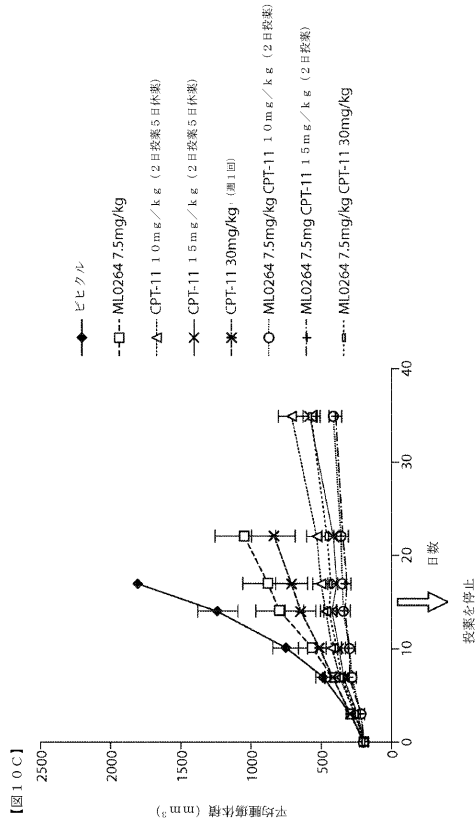
【図 10 A】

【図 10 B】

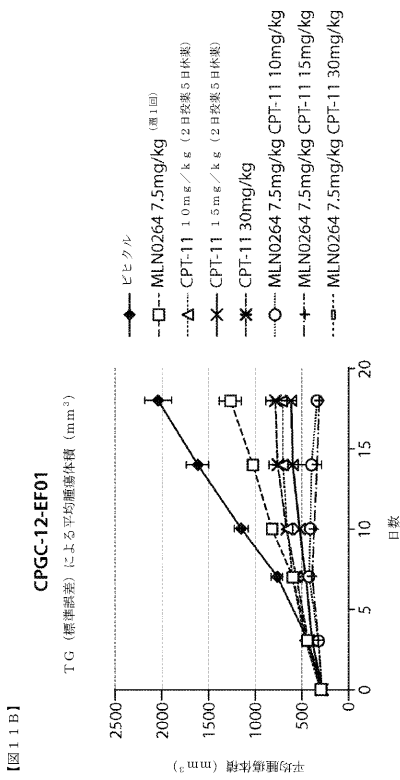


【図 10 B】

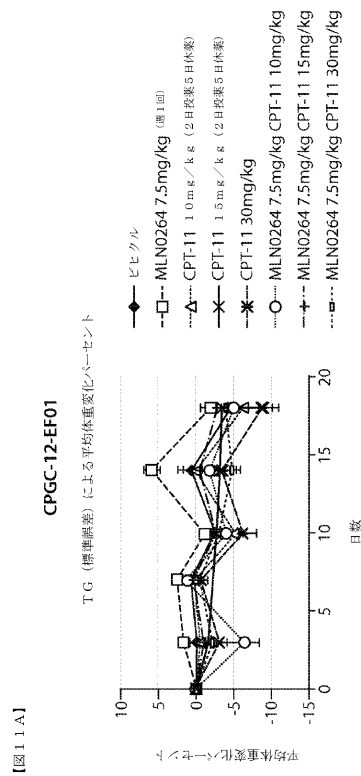
【図 10C】



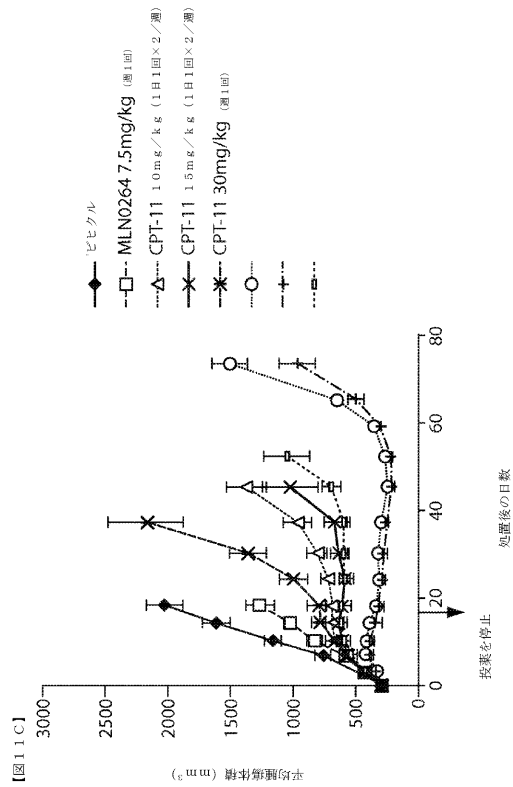
【図 11B】



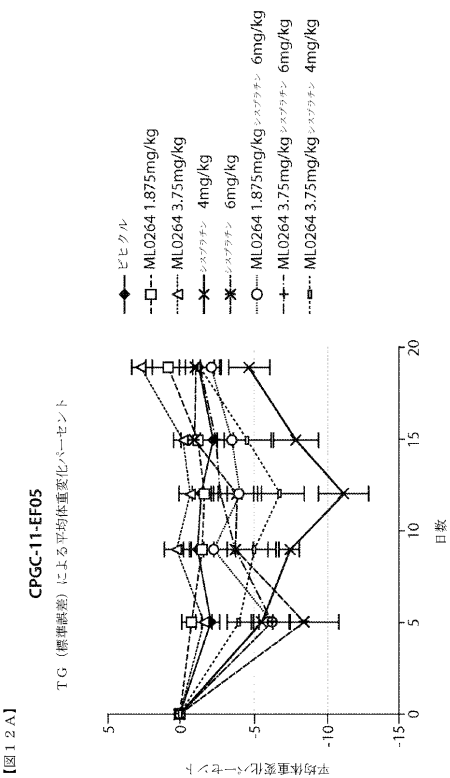
【図 11A】



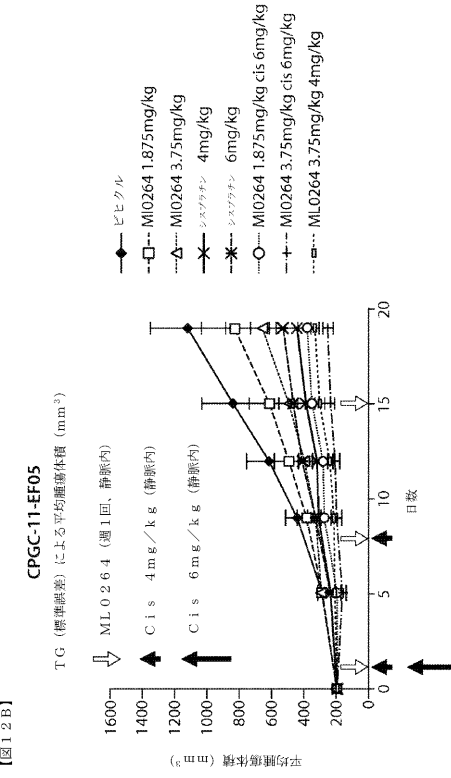
【図 11C】



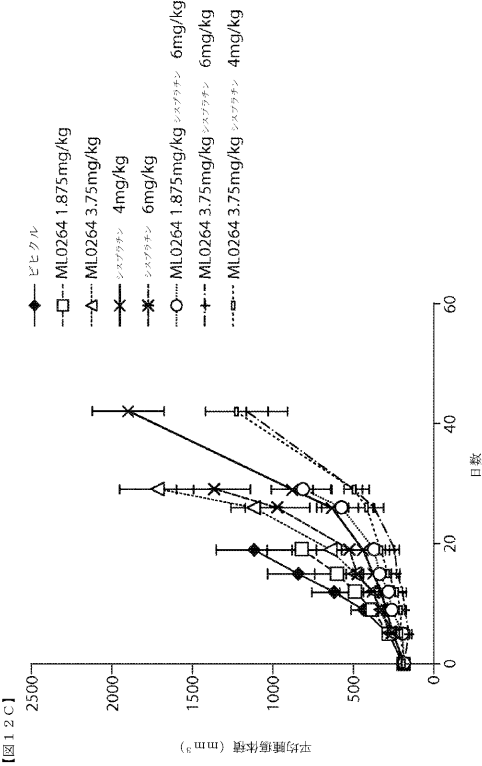
【図 1 2 A】



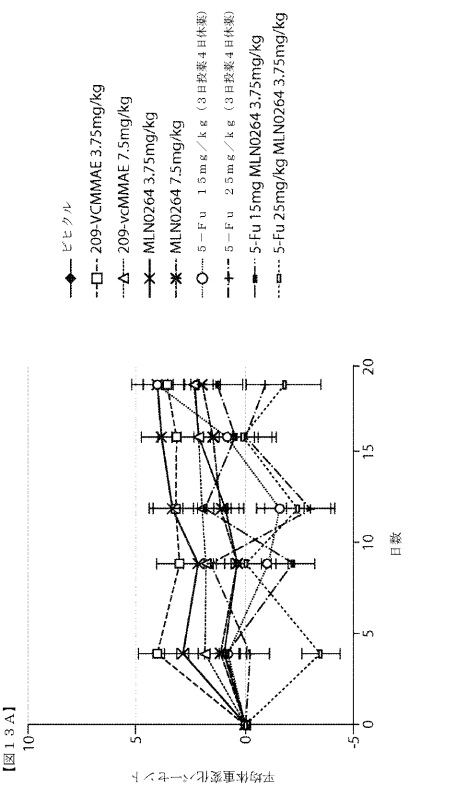
【図 1 2 B】



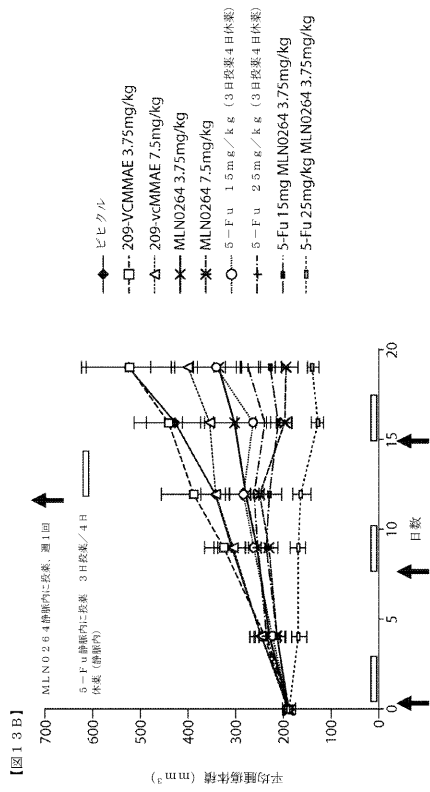
【図 1 2 C】



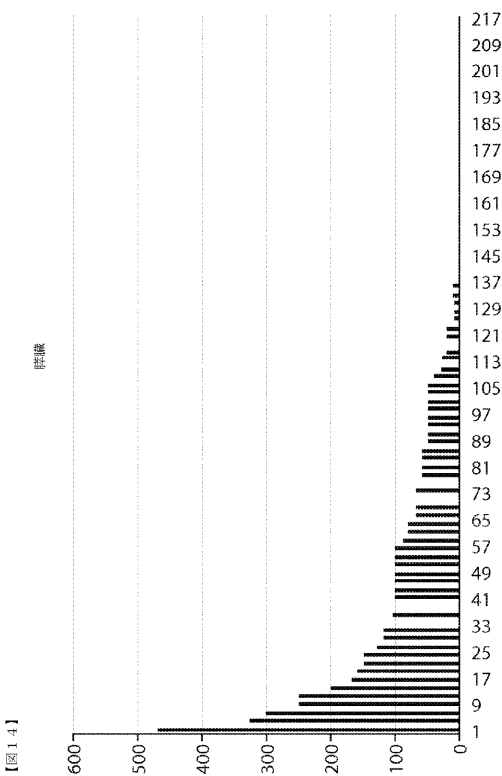
【図 1 3 A】



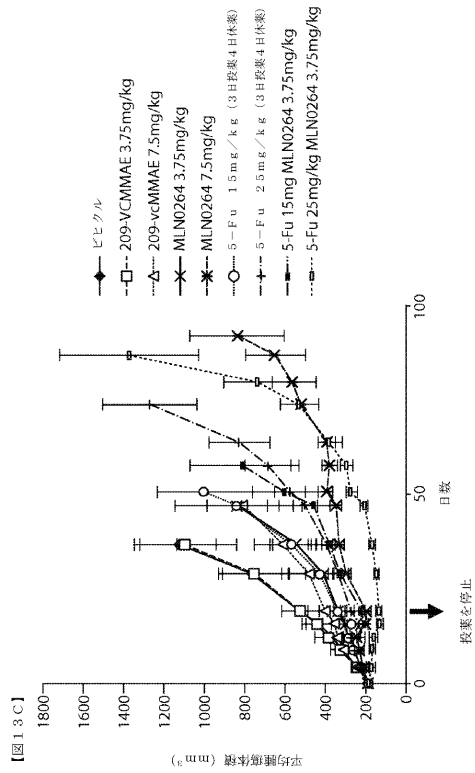
【図 1 3 B】



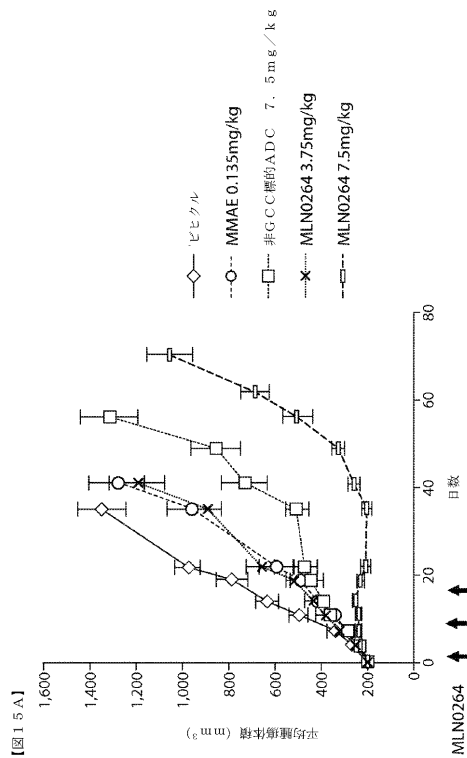
【図 1 4】



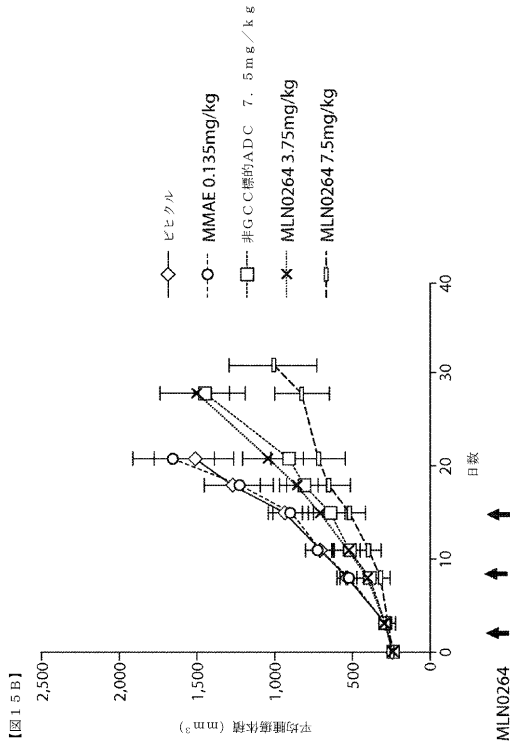
【図 1 3 C】



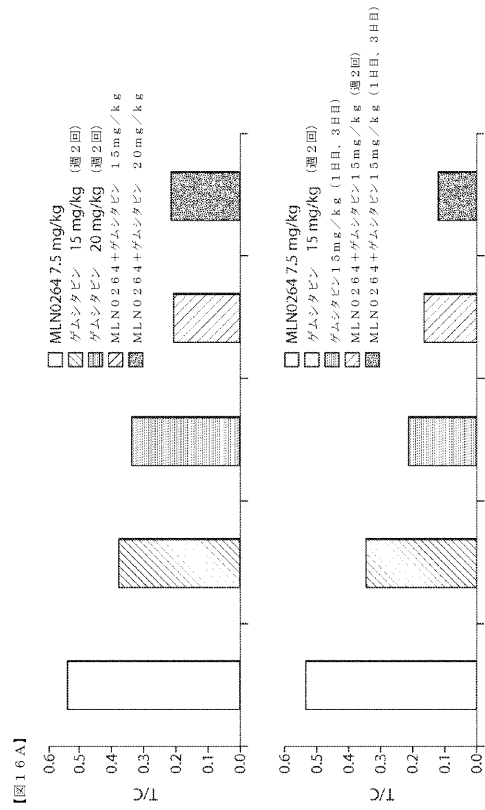
【図 1 5 A】



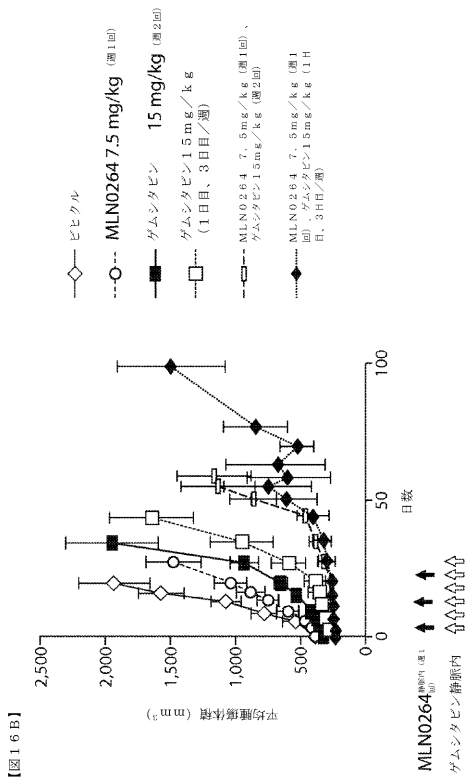
【図 15 B】



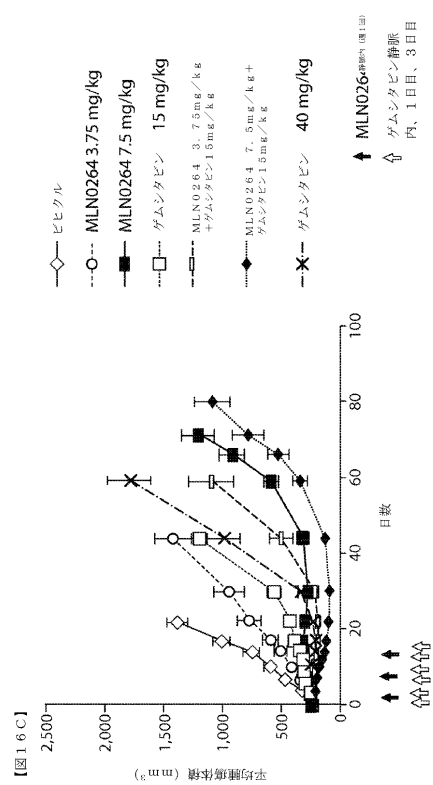
【図 16 A】



【図 16 B】

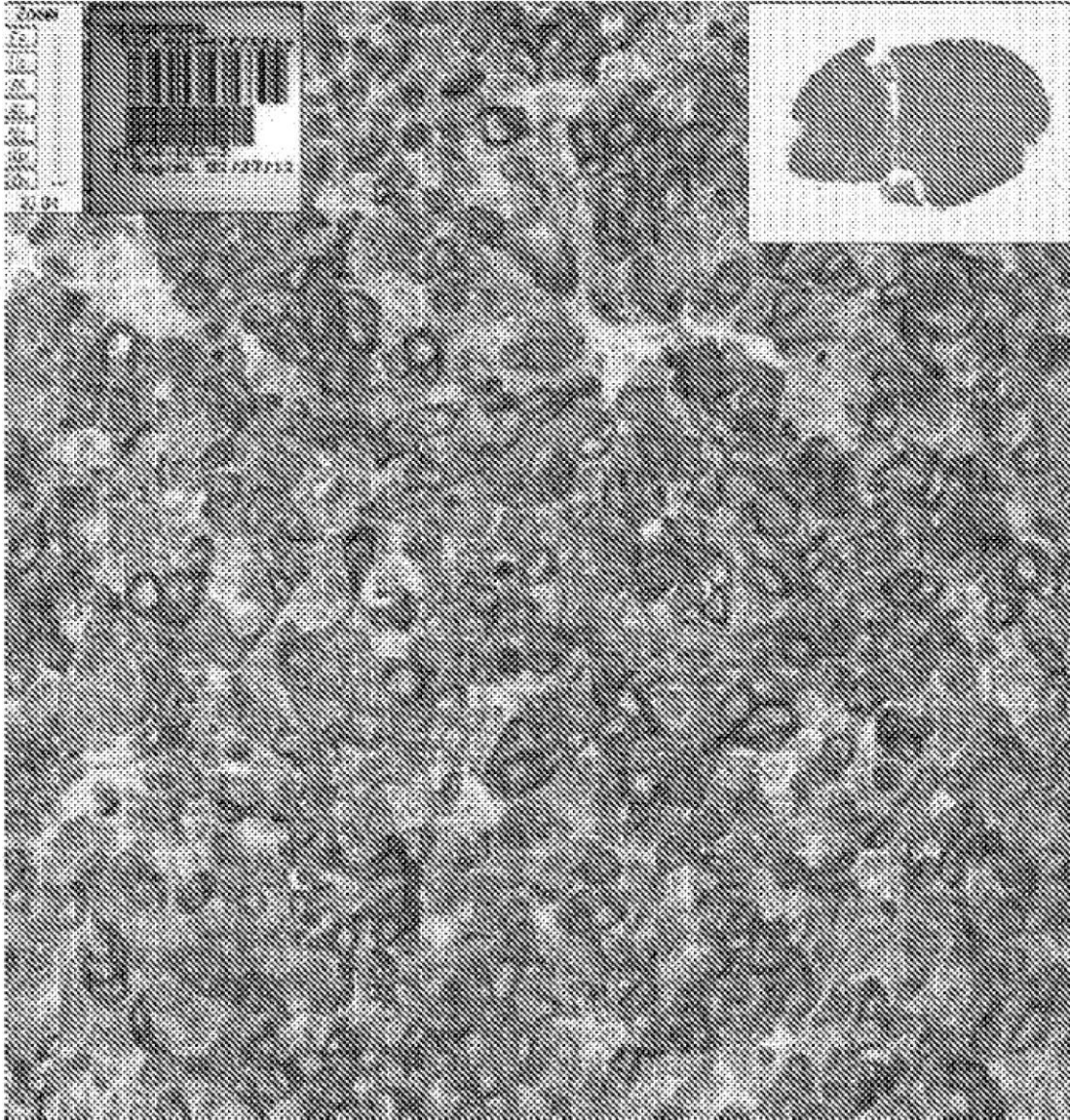


【図 16 C】



【図 5 A】

【図 5 A】

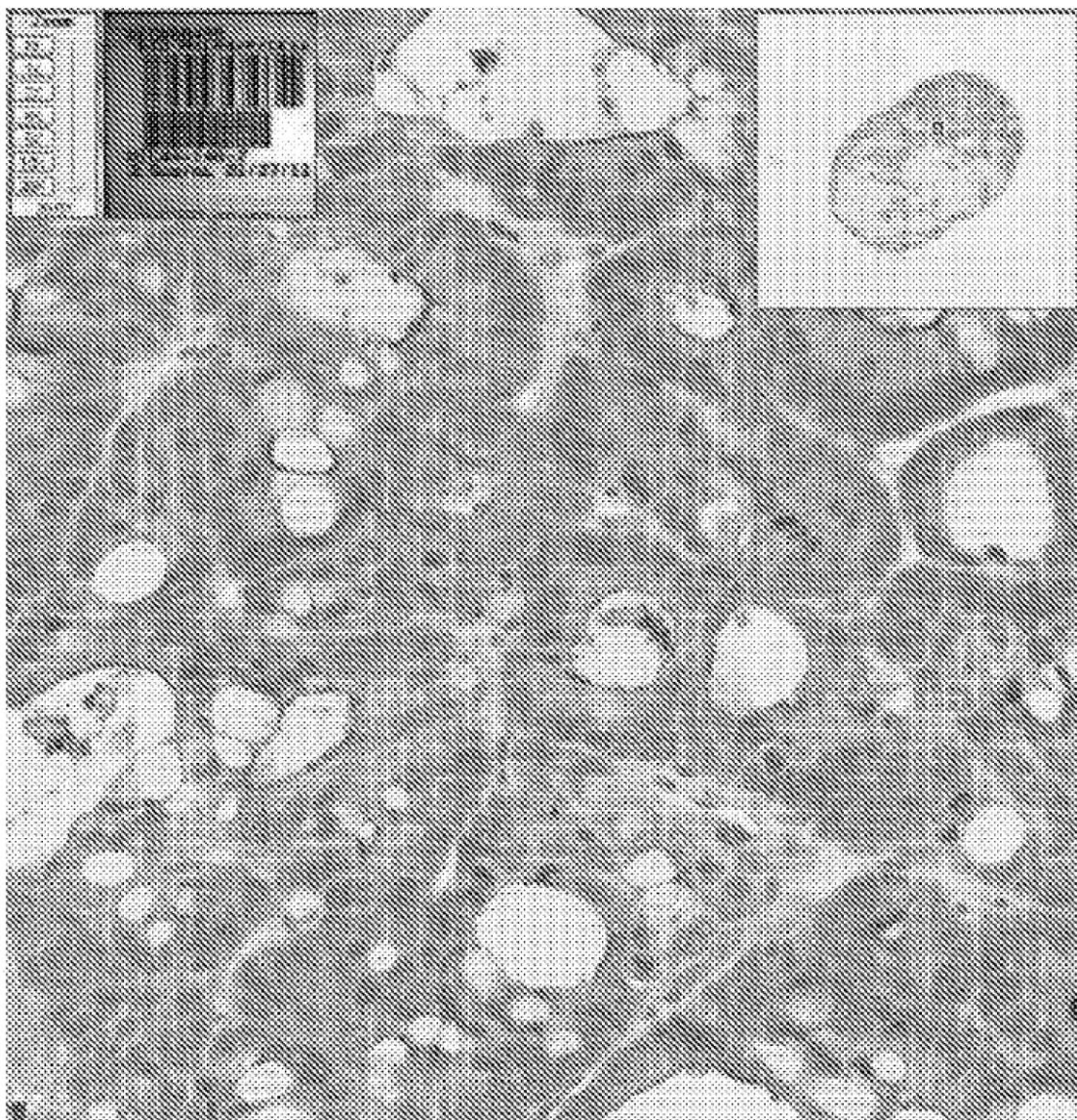


HEK293-GCC#2

スコア 4 +

【図 5 B】

【図 5 B】

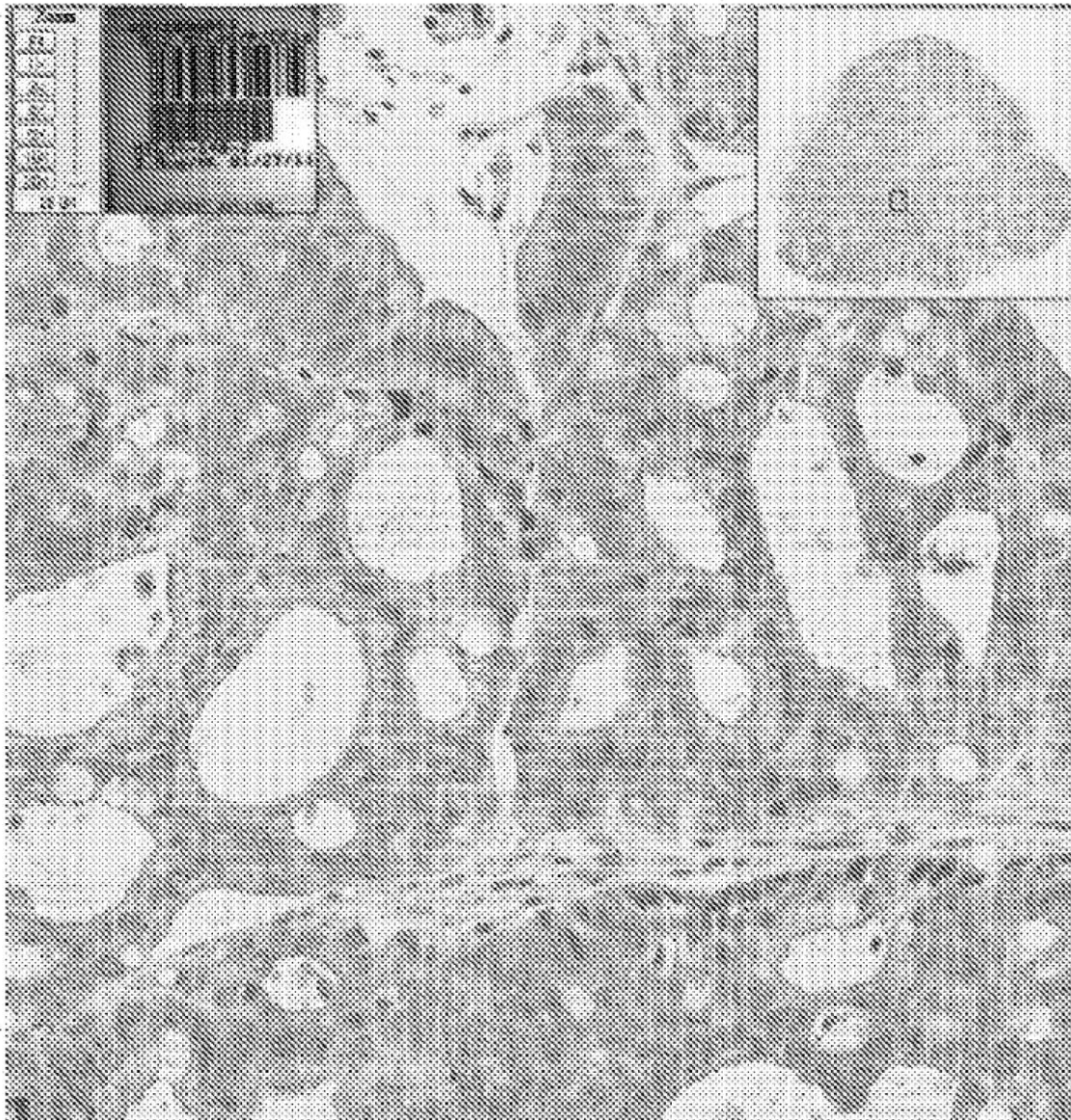


PHTX-09c

スコア 2 ~ 3 +

【図 5 C】

【図 5 C】

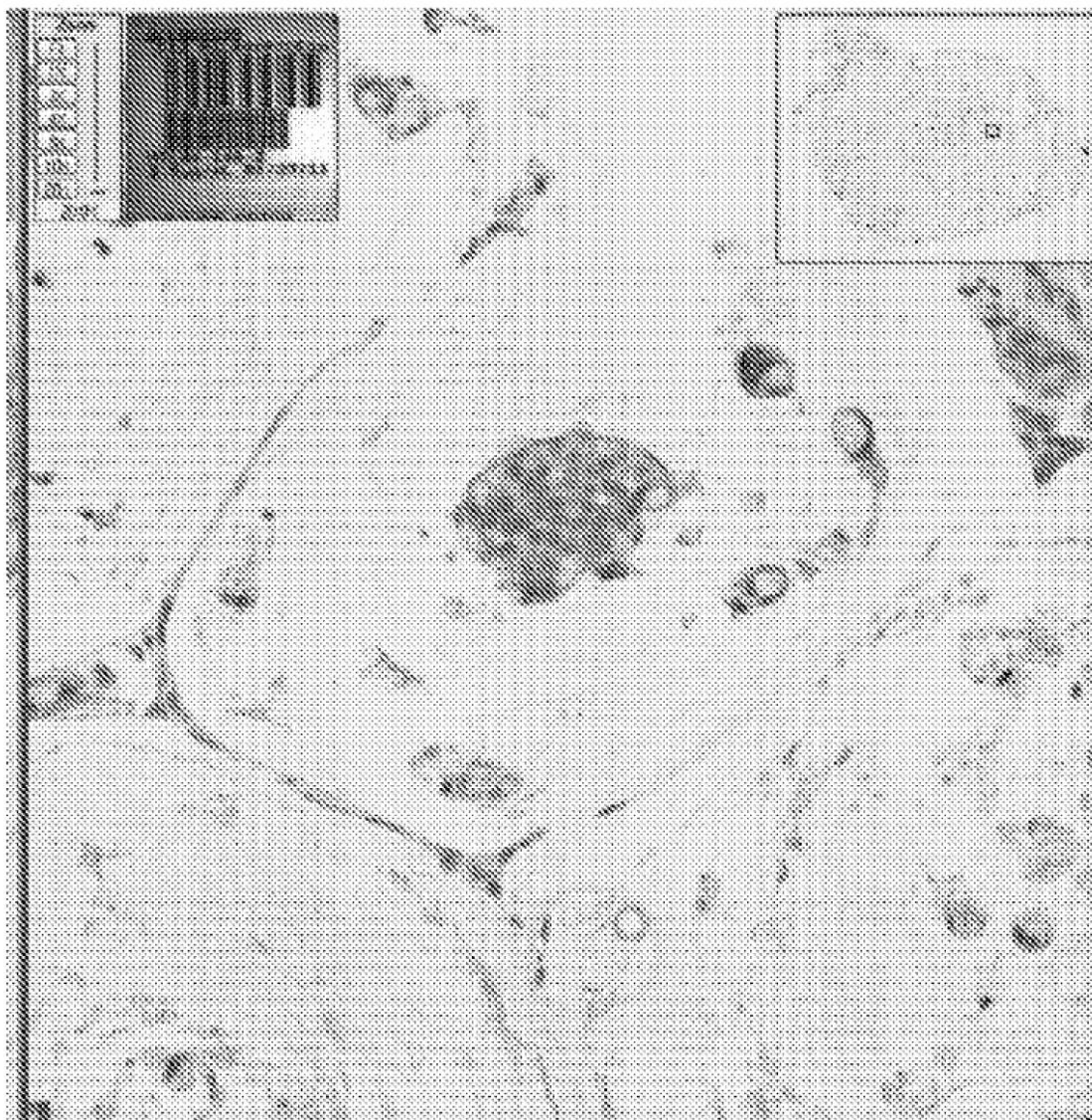


PHTX-17c

スコア 2 +

【図 5 D】

【図 5 D】

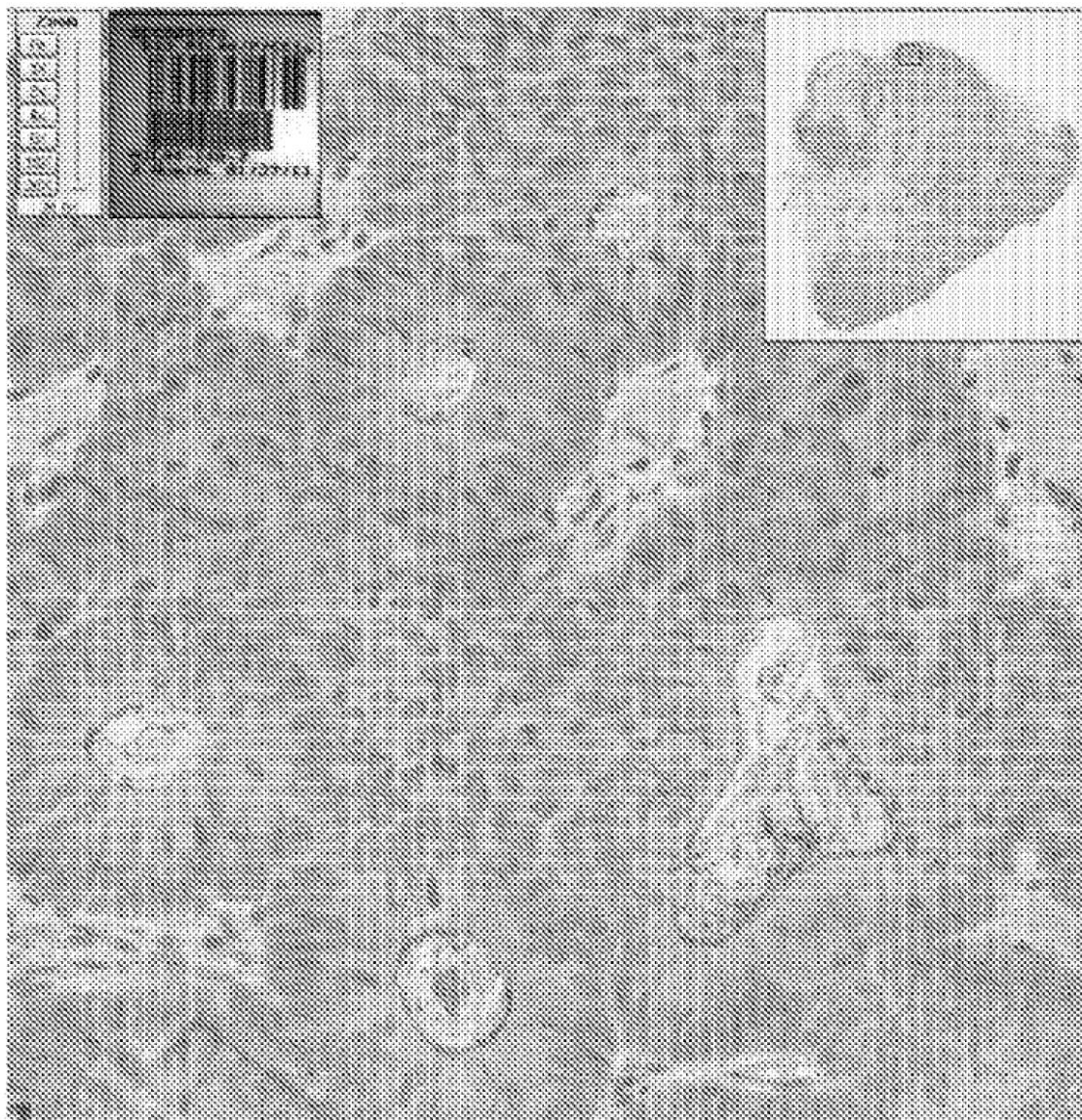


PHTX-21c

スコア 1 +

【図 5 E】

【図 5 E】



PHTX-11c

スコア 2 +

【配列表】

2016511257000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年11月16日(2015.11.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2016511257000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/19034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/00, 39/395; G01N 33/53 (2014.01)

USPC - 424/181.1; 435/7.23; 530/391.1

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8): A61K 39/00, 39/395; G01N 33/53 (2014.01)

USPC: 424/181.1, 179.1, 178.1, 183.1, 139.1; 435/7.23, 69.6, 252.33, 254.2, 320.1, 331; 530/387.9, 391.3, 391.1; 536/23.53

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

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

MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; ProQuest; PubMed; gastrointestinal, cancer, 'anti-GCC,' 'DNA damaging agent,' chemotherapy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/050242 A1 (NAM, SS et al.) April 28, 2011; abstract; paragraphs [035], [088], [0360]-[0362]; Claims 16, 22, 23	1-123
A	WO 01/71312 A1 (WALDMAN, SA et al.) October 04, 2001; entire document	1-123
A	US 2012/0114659 A1 (WATERMAN, A et al.) May 10, 2012; entire document	1-123
A	WO 2010/065293 A1 (KABCENELL, A et al.) June 10, 2010; entire document	1-123

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 May 2014 (02.05.2014)

Date of mailing of the international search report

14 MAY 2014

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	31/513	(2006.01)	A 6 1 K	31/282	4 H 0 4 5
A 6 1 K	31/7068	(2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/7068	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	16/32	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K	16/32	Z N A
			C 1 2 N	15/00	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 バイビー, オレ ピーター
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 8 1, ウェストボロー, ニップマック ドライブ
1 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11
4C084 AA19 NA05 ZA661 ZB261 ZB262 ZC202
4C085 AA13 AA14 AA21 AA34 BB36 CC22 CC23 EE03
4C086 AA01 AA02 BC43 CB22 EA17 HA12 HA28 MA02 MA04 NA05
ZA66 ZB26
4C206 AA01 AA02 JB16 MA02 MA04 NA05 ZB26
4H045 BA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 CA40 DA76
EA20 FA74 GA22 GA26