

(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2016-526009

(P2016-526009A)

(43) 公表日 平成28年9月1日 (2016. 9. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 2 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46 Z N A	4 C O 8 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	4 C O 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-506739 (P2016-506739)	(71) 出願人	514241526
(86) (22) 出願日	平成26年4月14日 (2014. 4. 14)		ヴィヴェンティア バイオ インコーポレ
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月20日 (2015. 11. 20)		イテッド
(86) 国際出願番号	PCT/CA2014/050373		カナダ国 マニトバ州 ウィニペグ ハメ
(87) 国際公開番号	W02014/166002		リン ストリート 1 4 7
(87) 国際公開日	平成26年10月16日 (2014. 10. 16)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/811, 360		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成25年4月12日 (2013. 4. 12)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肝細胞癌の検出および治療のための組成物および方法

(57) 【要約】

肝細胞癌を治療するための組成物および方法を本明細書に開示する。一実施形態において、肝細胞癌を有する対象を治療する方法は、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む治療有効量の免疫複合体 (V B 4 - 8 4 5) を投与することを含み、ここで前記抗体は上皮細胞接着分子 (E p - C A M) を認識する。エフェクター分子はシュードモナス外毒素 A であり得る。いくつかの実施形態において、この免疫複合体は、1 つまたは複数の抗癌剤と同時に投与されるか、並行して投与されるか、または連続して投与され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌部位での肝細胞癌の治療または予防に使用するための有効量の免疫複合体であって、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体断片を含み、前記抗体が上皮細胞接着分子（E p - C A M）に結合する、免疫複合体。

【請求項 2】

前記抗体断片が、マウス抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である、請求項 1 に記載の免疫複合体。

【請求項 3】

抗体断片が、F a b、F a b'、F（a b'）₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、ダイマー、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、多量体、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 に記載の免疫複合体。

10

【請求項 4】

前記抗体断片が、配列番号 4、5 および 6 によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号 7、8、および 9 によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む、請求項 1 に記載の免疫複合体。

【請求項 5】

配列番号 2（V B 4 - 8 4 5）のアミノ酸 2 3 ~ アミノ酸 6 6 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の免疫複合体。

【請求項 6】

抗体-抗原複合体を形成するために、対象から採取した試験試料を抗体と接触させるステップ（その際、前記抗体は、配列番号 4、5 および 6 によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号 7、8、および 9 によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む）と、

20

前記試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定するステップと、
対照に対して結果を正規化するステップと
を含む、前記対象において肝細胞癌を検出または監視する方法。

【請求項 7】

配列番号 4、5 および 6 によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号 7、8、および 9 によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む抗原と、その使用説明書とを含む、肝細胞癌を診断するためのキット。

30

【請求項 8】

インビトロまたはインビボで肝癌細胞を死滅させる方法であって、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む有効量の免疫複合体に前記肝癌細胞を接触させることを含み、前記抗体が上皮細胞接着分子（E p - C A M）を認識する、方法。

【請求項 9】

前記抗体が、配列番号 4、5 および 6 によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号 7、8、および 9 によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記抗体が、配列番号 1 に示す重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むポリペプチドを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記免疫複合体が、配列番号 2（V B 4 - 8 4 5）のアミノ酸 2 3 ~ アミノ酸 6 6 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

抗癌剤と共に前記免疫複合体と肝癌細胞を接触させることをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記抗癌剤が、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン、酢酸メゲストロール、アナストロゾール、レトラゾール (letrazole)、ボラゾール、エキセメスタン、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、酢酸シプロテロン、酢酸ゴセレリン、ルプロリド (luprolide)、フィナステリド、ハーセプチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、ドキソルビシン、ダウノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシンC、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、シクロホスファミド、イホスファミド、ニトロソウレア、チオテファン、ビンクリスチン、タキソール、タキソテール、エトポシド、テニポシド、アムサクリン、イリノテカン、トポテカン、エボシロン、ゲフィチニブ、エルロチニブ、血管新生阻害剤、EGF阻害剤、VEGF阻害剤、CDK阻害剤、サイトカイン、Her1およびHer2阻害剤、ならびにモノクローナル抗体から選択される、請求項12に記載の方法。

10

【請求項14】

肝細胞癌を有する対象を治療する方法であって、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む治療有効量の免疫複合体を前記対象に投与することを含み、前記抗体が上皮細胞接着分子 (EPCAM) に結合する、方法。

【請求項15】

前記抗体が、配列番号4、5および6によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号7、8、および9によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む、請求項14に記載の方法。

20

【請求項16】

前記抗体が、配列番号1に示す重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むポリペプチドを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、ダイマー、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、多量体、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される抗体断片である、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前記エフェクター分子が、放射性同位体、抗腫瘍薬、免疫調節剤、生物学的応答修飾因子、レクチン、毒素、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

30

【請求項19】

前記エフェクター分子が、アブリン、モデシン、ビスクミン、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシンA鎖、ブリオジン、ルフィン、モモルディン、リストリクトシン (restrictocin)、シュードモナス外毒素A、百日咳毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素、赤痢菌毒素、コレラ毒素、ジフテリア毒素およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される毒素である、請求項14に記載の方法。

【請求項20】

前記免疫複合体が前記癌細胞によって内部移行される、請求項14に記載の方法。

40

【請求項21】

前記免疫複合体が、配列番号2 (VB4-845) のアミノ酸23~アミノ酸669のアミノ酸配列を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項22】

前記免疫複合体の投与が癌部位に直接的である、請求項14に記載の方法。

【請求項23】

前記免疫複合体が、1つまたは複数の抗癌剤と組み合わされて投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項24】

50

前記免疫複合体が、5-フルオロウラシルと組み合わされて投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項25】

前記免疫複合体がVB4-845であり、約100マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日の投与量で投与され、5-フルオロウラシルが約2mg/kg/日～約20mg/kg/日の投与量で投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記免疫複合体が、1つまたは複数の抗癌剤と同時に投与されるか、並行して投与されるか、または連続して投与される、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記抗癌剤が、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン、酢酸メゲストロール、アナストロゾール、レトラゾール (letrazole)、ボラゾール、エキセメスタン、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、酢酸シプロテロン、酢酸ゴセレリン、ルプロリド (luprolide)、フィナステリド、ハーセプチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、ドキソルピシン、ダウノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシンC、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、シクロホスファミド、イホスファミド、ニトロソウレア、チオテファン、ビンクリスチン、タキソール、タキソテール、エトポシド、テニポシド、アムサクリン、イリノテカン、トポテカン、エポシロン、ゲフィチニブ、エルロチニブ、血管新生阻害剤、EGF阻害剤、VEGF阻害剤、CDK阻害剤、サイトカイン、Her1およびHer2阻害剤、ならびにモノクローナル抗体から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

前記免疫複合体が、癌治療の前に、癌治療と並行して、癌治療後に、または癌の寛解中に前記対象に投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項29】

前記免疫複合体がVB-845であり、7～21日間、約100マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日の投与量で投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項30】

前記免疫複合体がVB-845であり、7～21日間、約500マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日の投与量で投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項31】

前記免疫複合体がVB-845であり、7～21日間、約300マイクログラム/日の投与量で投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項32】

前記免疫複合体がVB-845であり、4週間、約500マイクログラム/週～約5000マイクログラム/週の投与量で投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項33】

前記免疫複合体がVB-845であり、4週間、約700マイクログラム/週の投与量で投与される、請求項14に記載の方法。

【請求項34】

前記免疫複合体がVB-845であり、4週間、約1000マイクログラム/週の投与量で投与される、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2013年4月12日出願の米国仮出願第61/811,360号の優先権を主張する。

10

20

30

40

50

【0002】

政府の持分

該当なし

【発明の概要】

【0003】

本開示は、肝細胞癌を治療するための組成物および方法に関する。一実施形態において、肝細胞癌を有する対象を治療する方法は、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む治療有効量の免疫複合体を前記対象に投与することを含み、ここで前記抗体は上皮細胞接着分子（E p - C A M）を認識する。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号4、5および6によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、なら

10

びに配列番号7、8、および9によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む。いくつかの実施形態において、エフェクター分子は、アブリン、モデシン、ビスクミン、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシンA鎖、ブリオジン、ルフィン、モモルディン、リストリクトシン（r e s t r i c t o c i n）、シュードモナス外毒素A、百日咳毒素、破傷風、ボツリヌス毒素、赤痢菌毒素、コレラ毒素、およびジフテリア毒素などの毒素であり得る。いくつかの実施形態において、免疫複合体は癌部位に直接投与される。

【0004】

追加の実施形態において、この免疫複合体は、配列番号2に示すV B 4 - 8 4 5またはその変異体である。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1つまたは複数の他の

20

抗癌剤と同時に投与されるか、並行して投与されるか、または連続して投与され得る。

【0005】

別の実施形態において、対象において癌を検出または監視する方法を開示する。例えば、肝細胞癌の検出は、抗体-抗原複合体を形成するために、前記対象から採取した試験試料を抗体と接触させることと（その際、抗体は、配列番号4、5および6によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号7、8、および9によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む）、試験試料中の抗体-抗原複合体を測定することと、対照に対して結果を正規化することと、を含み得る。

【0006】

さらなる実施形態において、癌を診断するためのキットを開示する。例えば、肝細胞癌を診断するためのキットは、配列番号4、5および6によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号7、8、および9によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む抗原と、その使用説明書と、を含む。

30

【0007】

さらなる実施形態において、インビトロまたはインビボで肝癌細胞を死滅させる方法は、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む有効量の免疫複合体に肝癌細胞を接触させることを含み、ここで前記抗体は上皮細胞接着分子（E p - C A M）を認識する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】V B 4 - 8 4 5のマップ。このマップは、4 D 5 M O C B s c F vおよびE T A₂₅₂₋₆₀₈部分、ならびにヒスチジntag、P e l Bシグナル、リンカー領域、V_L領域、V_H領域、E T A領域I I、E T A領域I b、E T A領域I I I、およびE R保持シグナルを含む様々なドメインが連結された免疫複合体の構成を示す。

【図2】p e l Bリーダー配列と共に、V B 4 - 8 4 5のアミノ酸および核酸の配列に対応する配列番号2および3を示す。ヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、ペリプラズム発現のためのシグナル配列、ヒスチジntag、C D R 1、2および3ドメイン、V_Lドメイン、V_Hドメイン、リンカー、E T AドメインI I、E T AドメインI b、E T AドメインI I I、およびE R保持シグナルK D E Lを含むドメインに分けることができる。

【図3】患者の予後の免疫組織化学染色およびヒストグラムを示す。（A）C M型H C C

40

50

症例における E p - C A M 発現の免疫組織化学的分析、(a) E p - C A M 発現を示す典型的な C M 型 H C C、(b) E p - C A M 発現を示さない典型的な C M 型 H C C。隣接する非癌細胞には見られない癌細胞および胆管における E p - C A M の膜染色 (倍率、100 倍)。B D、胆管。E p - C A M タンパク質の発現がある場合 (+) またはない場合 (-) の C M 型 H C C 患者の術後の予後。(B) 全生存曲線、(C) 治療手術後の無再発生存曲線。C M 型 H C C 患者において、E p - C A M 発現は、治療手術後の予後不良と有意に関連していた。ログランク検定は、全生存率および無再発生存率 (それぞれ $p = 0.0447$ 、および $p = 0.0171$) において統計的に有意な差異を示した。

【図 4】ヒト H C C 細胞株における V B 4 - 8 4 5 および 5 - F U のインビトロ効果と E p - C A M 発現の関連を示す。(A) 8 種類の H C C 細胞株における E p - C A M 発現をフローサイトメトリーによって分析した。(B および C) V B 4 - 8 4 5 または 5 - F U で処理すると、腫瘍細胞増殖が阻害されることを示している。8 種類の H C C 細胞株を $0.01 \sim 10 \text{ pM}$ の範囲の濃度で V B 4 - 8 4 5 と共に 72 時間インキュベートするか、または $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の濃度で 5 - F U と 48 時間インキュベートした。細胞増殖を M T S アッセイで測定した。グラフは平均値を示す。エラーバーは 3 回の測定の標準偏差を示す。(D) V B 4 - 8 4 5 (H e p G 2 および H e p 3 B 細胞株については 1 pM 、残りの細胞株については 10 pM) ならびに 5 - F U (H L E、H L F、および P L C / P R F / 5 細胞については $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、残りの細胞については $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 48 時間処理した 8 種類の H C C 細胞株の細胞増殖アッセイ。カラム、生細胞 (%) ; 縦棒、標準偏差。

【図 5】V B 4 - 8 4 5、5 - F U、および V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U の組み合わせで処理し、3 次元培養システムを用いて 7 日間培養した後の E p - C A M^高 細胞株における球形形成を示す (200 倍)。5 - F U 処理後に対照細胞および生存細胞は球を形成したが、V B 4 - 8 4 5 および V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U の組み合わせの処理後の生存細胞は、球を形成しなかった。スケールバー、 $50 \mu\text{m}$ 。

【図 6】V B 4 - 8 4 5、5 - F U、および V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U の組み合わせの処理後の、様々な幹/前駆細胞マーカーに基づく E p - C A M^高 細胞株の F A C S 分析を示す。(A) 3 つの独立した染色実験の代表的な結果を示し、グラフに対応するマーカーの陽性率を示す。矢印は、C D 1 3 3 発現について H e p G 2 細胞のユニークな二峰性パターンを示す。(B および C) V B 4 - 8 4 5 または 5 - F U の処理後の C D 1 3 3 の発現を示す。カラム、生細胞 (%) ; 縦棒、標準偏差。(D および E) V B 4 - 8 4 5 または 5 - F U の処理後の C D 1 3 3 発現を示す。カラム、生細胞 (%) ; 縦棒、標準偏差。

【図 7】皮下異種移植モデルにおけるインビボ試験の結果を示す。H u H - 7 の樹立した皮下異種移植片を、対照の生理食塩水または $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ の V B 4 - 8 4 5 の静脈注射および対照の生理食塩水または $30 \text{ mg}/\text{kg}$ の 5 - F U の腹腔内注射で 2 週間、週 3 回治療した。(A) 投与期間の終わりのマウスの代表的な皮下腫瘍を示す。スケールバー、 10 mm 。(B) 4 群 ($n = 10$) において一日おきにプロットした腫瘍体積を示す。矢印は投与の時を示す。縦棒、標準エラー。両側スチューデント t 検定により統計解析を行った ($p < 0.05$)。

【図 8】肝臓同所異種移植片モデルにおけるインビボ試験を示す。H u H - 7 の樹立した肝臓同所異種移植片を、対照の生理食塩水または V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U の組み合わせで治療した。投与の方法およびスケジュールは皮下腫瘍の場合と同じであった。(A) 投与期間の終了時のマウスの代表的な肝腫瘍を示す。スケールバー、 10 mm 。(B) 対照 ($1964 \pm 367 \text{ mm}^3$) または V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U の組み合わせ ($141 \pm 34 \text{ mm}^3$) の投与後 2 週間の時点で分析した肝臓腫瘍体積 ($n = 5$) を示す。縦棒、標準エラー。両側スチューデント t 検定により統計解析を行った ($p = 0.0011$)。(C) E p - C A M (倍率、40 倍) の H & E 染色および免疫染色を示す。(D) 2 群間の全ての腫瘍細胞で濃く染色された腫瘍細胞の割合を示す。縦棒、標準偏差。

【図 9】異なる濃度で試験した場合の、V B 4 - 8 4 5 によるマンモスフェア形成効率 (M F E) の濃度依存的減少を示す。縦棒、標準偏差。

【図10】予めVB4-845に曝露した細胞を洗浄し、マンモスフェア増殖培地に再播種した場合の再播種アッセイを示す。トリパンブルーによる染色により、色素は生細胞（A）から排除され、死細胞（B）からは排除されないので、VB4-845は細胞毒性であるが、細胞増殖抑制性ではないことが示された。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明は、特定のプロセス、組成物、または方法が変化し得るので、記載された特定のプロセス、組成物、または方法に限定されない。本明細書で使用する用語は、特定のバージョンまたは実施形態を説明する目的のためだけのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明が先行発明によるそのような開示に先行する権利がないという承認として解釈されるべきものは何もない。

10

【0010】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する単数形「1つ（a）」、「1つ（an）」、および「その」は、文脈が特に明確に指示しない限り、複数参照を含む。したがって、例えば、「抗酸化剤」への言及は、1つまたは複数の抗酸化剤および当業者に公知のその等価物などへの言及である。

【0011】

本明細書で使用する用語「約」は、使用されている数±10%の数値を意味する。したがって、約50%は、45%～55%の範囲内を意味する。

20

【0012】

本明細書で使用する用語「動物」、「患者」または「対象」には、ヒトならびに野生動物、家畜および農場の動物などの非ヒト脊椎動物が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、この用語はヒトを指す。

【0013】

本明細書で使われ得る「抗体断片」には、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFvおよびds-scFv、ダイマー、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、多量体、およびそれらの任意の組み合わせ、ならびに組換え源からの断片および／またはトランスジェニック動物において産生される断片が含まれる。抗体または断片は、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターおよびヒトを含む任意の種由来のものであってよい。キメラ抗体誘導体、すなわち非ヒト動物可変領域およびヒト定常領域を組み合わせた抗体分子も、本発明の範囲内であると企図される。キメラ抗体分子には、例えば、ヒト定常領域を有するマウス、ラット、または他の種の抗体由来の抗原結合ドメインを含むヒト化抗体が含まれ得る。従来の方法を用いて、キメラ抗体を作製してもよい。キメラ抗体は、対応する非キメラ抗体よりもヒト対象において免疫原性が低いことが予想される。ヒト化抗体は、例えば、参照によりその全体が組み込まれるWO00/61635に記載されるように安定化できる。

30

【0014】

本明細書で使用する語句「抗癌剤」は、限定されないが、化学物質、他の免疫療法、癌ワクチン、抗血管形成化合物、特定のサイトカイン、特定のホルモン、遺伝子治療、放射線療法、手術、および食事療法を含む癌の治療または予防に有効である化合物または治療剤を指す。

40

【0015】

本明細書で使用する語句「有効量」は、所望の結果を達成するのに必要な投与量および期間で有効な量を意味する。有効量の免疫複合体は、動物の疾患状態、年齢、性別、体重などの要因に応じて変動し得る。投与計画は、最適な治療応答を提供するように調整され得る。例えば、いくつかの分割用量を毎日投与してもよく、または治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例的に減少させてもよい。

【0016】

本明細書で使用する語句「ヒト化抗体または抗体断片」は、抗体または断片がヒトフレ

50

ームワーク領域を含むことを意味する。

【0017】

本明細書で使用する語句「免疫複合体」は、エフェクター分子に結合する抗体を指す。いくつかの実施形態において、抗体は、全長抗体またはF a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、ダイマー、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、多量体、およびそれらの任意の組み合わせ、ならびに組換え源からの断片および／またはトランスジェニック動物において産生される断片などの抗体断片であり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、合成タンパク質、結合タンパク質またはポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、エフェクター分子は、毒素、放射性ヌクレオチド、放射性医薬品、標識剤、薬物、細胞毒性剤、ペプチド、およびタンパク質

10

【0018】

本明細書で使用する語句「癌部位に直接投与されるまたは直接投与」は、限定されないが、腫瘍もしくは腫瘍周囲への直接的な免疫複合体の単回または複数回注射、腫瘍もしくは腫瘍周囲への連続または不連続の灌流、腫瘍または腫瘍周囲への貯留の導入、腫瘍または周囲腫瘍への徐放性装置の導入、腫瘍または腫瘍周囲への徐放製剤の導入、腫瘍上への直接適用、腫瘍の領域に実質的に直接供給している動脈内への直接注射、腫瘍の領域に実質的に排出するリンパ管への直接注入、実質的に囲まれた空洞（例えば、胸腔）もしくはは内腔（例えば、小胞内）への直接導入または実質的な直接導入を含む直接導入または実質的な直接導入を指す。「腫瘍周囲」は、限定されないが、触知可能な腫瘍の境界などの腫瘍の境界とみなされるものの約10cm以内、好ましくは5cm以内、より好ましくは1cm以内の領域を説明する用語である。発生の予防または再発の防止の文脈における「直接投与」は、癌の発生または再発の危険性のある部位への直接投与として定義される。

20

【0019】

本明細書で使用する用語「MOC-31抗体」は、マウス抗Ep-CAM抗体または抗EGP-2抗体を意味し、BioGenex社、カタログ番号MU316-UC、Zymed Laboratories社、カタログ番号18-0270またはUnited States Biological社、カタログ番号M4165などの商業的供給源から入手可能である。

30

【0020】

本明細書で使用する用語「4D5MOC-A」は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO00/61635に記載のs c F v 4D5の人工ヒトコンセンサスフレームワーク上に移植したヒト化s c F v MOC31抗体を意味する。

【0021】

本明細書で使用する用語「4D5MOC-B」は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO00/61635に記載されるように調製された4D5MOC-Aの安定変異体を意味する。

【0022】

本明細書で使用する用語「VB4-845」は、b) シュードモナス外毒素Aの切断型（アミノ酸252～608）に融合されたa) s c F v ヒト化抗体4D5MOC-Bを含む免疫複合体を意味する。VB4-845の詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第20100249039号に開示されている。

40

【0023】

本明細書で使用する語句「薬学的に許容される」は、一般的な臨床使用および／または連邦政府もしくは州政府の規制当局による承認、米国薬局方に掲載されていること、または当業者による一般的な受け入れを指す。

【0024】

本明細書で使用する抗体結合についての「生理学的条件」は、Ep-CAM結合ポリペプチドがインビボでEp-CAM分子に遭遇する条件を示すが、必ずしも正確に再現する

50

必要はない。生理的条件下での結合は、インビボでの結合が発生することを合理的に予測するものでなければならない。

【0025】

本明細書で使用する語句「癌の予防」は、癌発生の予防を指す。特定の場合において、予防的治療は、癌の再発を低減する。他の場合では、予防的治療は、患者の癌の発症リスクを低減するか、または前癌状態（例えば、結腸ポリープ）から実際の悪性腫瘍への進行を阻止する。

【0026】

本明細書で使用する語句「用量の減少」は、通常投与および／または推奨される用量を下回る用量を指す。抗癌剤の通常投与量は、例えば、医師用卓上参考書の最新版などの中

10

【0027】

本明細書で使用する語句「癌の治療」は、癌細胞の複製およびアポトーシスの抑制、腫瘍増殖の阻害、癌細胞数もしくは腫瘍成長の低下、癌の悪性度の減少（例えば、分化の増強）、または癌関連症状の改善を指す。

【0028】

本明細書で使用する用語「治療」は、患者の望ましくない病状、疾患もしくは症状を阻止、対抗、寛解、防止または改善するために利用される薬剤を意味する。

【0029】

本明細書で使用する用語「変異体」は、任意の薬学的に許容される誘導体、類似体、もしくは免疫複合体の断片、抗体もしくは抗体断片、毒素（例えば、シュードモナス毒素）、または本明細書に記載のエフェクター分子を指す。変異体はまた、多量体、個々の構成要素を含む多量体、複数の個々の構成要素を含む多量体（例えば、参照分子の多量体）、化学的な分解産物、および生物学的分解産物のうちの1つまたは複数の構成要素も包含する。特定の、非限定的な実施形態において、免疫複合体は、E p - C A M結合部分および／または参照免疫複合体の毒素部分の変化（複数可）により、参照免疫複合体に対して「変異体」であり得る。例えば、変異体免疫複合体は、抗体部分および／または毒素部分の多量体を含み得る。分子の毒素部分の変異体は、参照毒素の製剤の毒性を測定するために使用される標準的なアッセイにおいて、少なくとも10%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも80%、少なくとも90%の毒性を保持する。いくつかの実施形態

20

30

【0030】

参照免疫複合体のE p - C A M結合部分に変化を有する変異体の免疫複合体は、生理的条件下で、抗E p - C A M参照抗体の結合と少なくとも10パーセント、好ましくは少なくとも30%競合する（下記参照）。10%の競合とは、飽和濃度の抗E p - C A M参照抗体がE p - C A Mに結合するアッセイにおいて、これらの結合した参照抗体の10%が、平衡に達したときに、等しい濃度の試験抗E p - C A M免疫複合体変異体と置き換えられることを意味する。非限定的な例として、抗体間の競合、または抗体と免疫複合体との間の競合は、事実上全てのE p - C A M部位が抗体と結合するように、細胞の表面上のE p - C A MまたはE p - C A M被覆固体基板へ標識された抗E p - C A M参照抗体を結合させること、これらの抗体-抗原複合体を非標識試験抗E p - C A M抗体または非標識試験免疫複合体と接触させること、E p - C A M結合部位から置換された標識抗体の量を測定することによって測定され、その際、遊離標識抗体の量は生じた競合の量を示す。

40

【0031】

免疫療法は、癌と闘うための強力なツールとして現れた。腫瘍関連抗原（「T A A」）

50

に対して作られたマウス抗体およびヒト化／キメラ抗体、ならびにそれらのそれぞれの抗体断片は、特定のヒト癌の診断および治療のために使用されてきた。これらの抗体の非コンジュゲート型、毒素コンジュゲート型、および放射性標識型は、このような療法に使用されてきた。

【0032】

興味のある免疫療法のための1つの腫瘍関連抗原は、17-1A、KSA、EGP-2およびGA733-2としても知られる上皮細胞接着分子（「E p-C A M」）である。E p-C A Mは、肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、および頭頸部扁平上皮癌を含む多くの固形腫瘍で高発現しているが、ほとんどの正常上皮組織ではあまり発現していない膜貫通タンパク質である。その発現は細胞増殖の速度と相関する。E p-C A M特異的抗体は、小細胞肺癌および非小細胞肺癌の患者の主な腫瘍を撮像し、検出するのに使用されてきた。

10

【0033】

肝細胞癌（「H C C」）は、世界中で5番目に最も多い癌であり、癌による死亡の主な原因の1つである。H C Cは予後不良で、米国でのH C Cの5年生存率は12%未満にとどまっている。H C C腫瘍の悪性度は、血管侵襲および全体の形態を含むいくつかの病理組織学的所見に関して報告されている。H C Cの主要な根治的治療は肝移植を含む外科的切除であり、ラジオ波焼灼療法、経動脈化学塞栓療法、および化学療法（5-F U）を含む様々な治療選択が利用されてきた。効果的な対症療法は、H C Cが従来の細胞毒性薬に対してしばしば耐性を示すという事実によって妨げられる。進行したH C C患者における全生存期間の中央値は、未だ1年未満であり、予後は不良のままである。

20

【0034】

多くの癌細胞は、化学療法および放射線の現在の治療法に耐性を示すようになり、細胞の小グループでも大規模な治療後に生き残る。この耐性を説明する1つの仮説は、癌幹細胞の存在である。理論に束縛されるものではないが、各腫瘍内の細胞の異なるサブセットは不正確な自己再生が可能であり、比較的複製能力が限られている成人の腫瘍細胞（複数可）に発展し得る。これらの癌幹細胞（C S C）は、化学療法剤、放射線または他の毒性条件に対してより耐性であり、したがって、臨床治療後にも生き残り、後に二次腫瘍に成長し、転移または再発に関与すると仮定されている。C S Cは、組織幹細胞またはより分化した組織前駆細胞（複数可）のいずれかから生じ得ることが示唆されている。

30

【0035】

一部の研究者は、癌幹細胞がマーカー発現に基づいて同定できることを提案した。例えば、C D 1 3 3は、脳腫瘍における癌幹細胞およびヒト前立腺上皮幹細胞に見られるマーカーであると考えられている。いくつかの乳癌幹細胞は、C D 2 4を発現しないかまたは少し発現すると同時にC D 4 4を発現する。結腸癌幹細胞は、C D 1 3 3、C D 4 4、およびC D 1 6 6を発現する。肝幹細胞マーカーには、E p-C A M、C D 1 3 3、C D 4 4、およびC D 9 0が含まれる。

【0036】

この医学的問題に対して、新しい、腫瘍特異的な治療法の開発がとても必要とされている。1つの新しいアプローチは、毒素とコンジュゲートさせた抗体などの免疫複合体を用いた標的療法である。抗体は、効率的な腫瘍細胞死滅のための毒素を送達するために、腫瘍細胞に特異的に結合する。

40

【0037】

シュードモナス外毒素Aに連結させたヒトE p-C A Mの細胞外ドメインに結合するヒト化抗体断片を含む免疫複合体が、肝細胞癌の治療に有効であることを本明細書で開示する。特に、本発明者らは、細胞結合ドメインを欠くシュードモナス外毒素A（E T A）の切断型に融合されたE p-C A Mに対する安定化された単鎖F v組換えヒト化抗体断片を含む免疫複合体が肝癌細胞に対して細胞傷害性であることを示した。この免疫複合体は、肝癌細胞上で発現するE p-C A Mに結合する。結合すると、免疫複合体は内部移行し、シュードモナス外毒素Aが細胞を死滅させるか、またはタンパク質合成を阻止し、それに

50

よって細胞死に至る。重要なのは、ほとんどの正常粘膜細胞および線維芽細胞はE p - C A Mを広範囲に発現しておらず、したがって、免疫複合体を内部移行させることができず、外毒素の潜在的な副作用から保護される。

【0038】

本開示は、肝細胞癌を治療するための組成物および方法に関する。一実施形態において、肝細胞癌を有する対象を治療する方法は、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む治療有効量の免疫複合体を前記対象に投与することを含み、ここで前記抗体は上皮細胞接着分子（E p - C A M）を認識する。抗体は、配列番号4、5および6によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（C D R）、ならびに配列番号7、8、および9によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む。エフェクター分子は、放射性同位体、抗腫瘍薬、免疫調節剤、生物学的応答修飾因子、レクチン、毒素、およびそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、エフェクター分子は、アブリン、モデシン、ビスクミン、ゲロニン、ボウガニン、サボリン、リシン、リシンA鎖、プリオジン、ルフイン、モモルディン、リストリクトシン（r e s t r i c t o c i n）、シュードモナス外毒素A、百日咳毒素、破傷風、ボツリヌス毒素、赤痢菌毒素、コレラ毒素、ジフテリア毒素などの毒素およびそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、癌部位に直接投与される。

10

【0039】

追加の実施形態において、免疫複合体は、配列番号2に示すV B 4 - 8 4 5またはその変異体である。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1つまたは複数の他の抗癌剤と同時に投与されるか、並行して投与されるか、または連続して投与され得る。いくつかの実施形態において、免疫複合体V B 4 - 8 4 5は、p e l Bリーダー配列を欠いていてもよく、配列番号2のアミノ酸23～アミノ酸669を含む。

20

【0040】

別の実施形態において、対象において肝細胞癌を検出または監視する方法は、抗体-抗原複合体を形成するために、前記対象から採取した試験試料を抗体と接触させるステップと（その際、抗体は、配列番号4、5および6によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号7、8、および9によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む）、試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定するステップと、ならびに対照に対して結果を正規化するステップと、を含む。

30

【0041】

さらなる実施形態において、肝細胞癌を診断するためのキットは、配列番号4、5および6によって定義されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域、ならびに配列番号7、8、および9によって定義されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域を含む抗原と、その使用説明書と、を含む。

【0042】

さらなる実施形態において、肝細胞癌を治療するための方法は、上皮細胞接着分子（E p - C A M）の発現について患者からの腫瘍試料を試験することと、タンパク質が対照と比較して腫瘍試料中でより高いレベルで発現している場合に、配列番号2に示す配列を有する有効量のV B 4 - 8 4 5を患者に投与することと、を含む。いくつかの実施形態において、免疫複合体V B 4 - 8 4 5は、p e l Bリーダー配列を欠いていてもよく、配列番号2のアミノ酸23～アミノ酸669のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、免疫複合体は癌部位に直接投与される。

40

【0043】

さらなる実施形態において、肝細胞癌を治療するためのキットは、配列番号2に示す配列を有するV B 4 - 8 4 5である有効量の免疫複合体と、癌を治療するためのその使用説明書と、を含む。いくつかの実施形態において、免疫複合体V B 4 - 8 4 5は、p e l Bリーダー配列を欠いていてもよく、配列番号2のアミノ酸23～アミノ酸669のアミノ酸配列を含む。

【0044】

50

本明細書に開示する方法およびシステムは、肝臓または肝細胞癌の原発腫瘍を治療すること、または肝細胞癌の転移の可能性を減少させることが企図される。このような方法は、異なる起源の癌性腫瘍が身体の別の部分から肝臓に転移（蔓延）する肝転移の治療を含まない。

【0045】

別の実施形態において、インビトロまたはインビボでの癌幹細胞を死滅させる方法は、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む有効量の免疫複合体に癌幹細胞を接触させることを含み、ここで前記抗体は上皮細胞接着分子（E p - C A M）を認識する。予後不良の多くの悪性腫瘍は、通常、胚性幹細胞が濃縮されている遺伝子の優先的過剰発現を示す。これらの肝幹／前駆細胞マーカーのいくつかには、E p - C A M、C D 1 3 3、C D 4 4、およびC D 9 0が含まれる。したがって、幹細胞／前駆細胞マーカーを発現する癌細胞は、肝細胞癌の治療のための重要な標的として認識される可能性がある。さらに、本明細書で開示する免疫複合体はまた、肺の癌幹細胞、乳癌幹細胞、前立腺癌幹細胞、肝癌幹細胞、脳癌幹細胞、膀胱癌幹細胞、結腸癌幹細胞、胃癌幹細胞、頭頸部癌幹細胞、膵臓癌幹細胞、および卵巣癌幹細胞などの様々な癌幹細胞を死滅させるために使用され得る。

【0046】

さらなる実施形態において、インビトロまたはインビボで肝癌細胞を死滅させる方法は、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含む有効量の免疫複合体に肝癌細胞を接触させることを含み、ここで前記抗体は上皮細胞接着分子（E p - C A M）を認識する。

【0047】

いくつかの実施形態において、インビトロまたはインビボで肝癌細胞を死滅させる方法は、抗癌剤と共に有効量の免疫複合体と肝癌細胞を接触させることを含む。免疫複合体は、エフェクター分子にコンジュゲートされた抗体を含んでもよく、前記抗体は上皮細胞接着分子（E p - C A M）を認識する。抗癌剤は、本明細書に記載の任意の抗癌剤であってよい。いくつかの実施形態において、免疫複合体はV B 4 - 8 4 5であり、抗癌剤は5 - フルオロウラシルである。

【0048】

したがって、一実施形態において、本発明は、肝細胞癌を治療または予防する方法であって、（a）結合される癌細胞上のタンパク質に結合する抗体と、（b）癌細胞に対して細胞傷害性である毒素とを含む有効量の免疫複合体を、そのような治療を必要とする動物に投与することを含む方法を提供する。本発明はまた、肝細胞癌を治療または予防するための、（a）結合される癌細胞上のタンパク質に結合する抗体と、（b）癌細胞に対して細胞傷害性である毒素とを含む有効量の免疫複合体の使用も提供する。本発明は、肝細胞癌を治療または予防するための医薬の製造における（a）結合される癌細胞上のタンパク質に結合する抗体と、（b）癌細胞に対して細胞傷害性である毒素と、を含む有効量の免疫複合体の使用をさらに提供する。

【0049】

別の実施形態において、本発明は、癌幹細胞を死滅させるための方法であって、（a）結合される癌細胞上のタンパク質に結合する抗体と、（b）癌細胞に対して細胞傷害性である毒素とを含む有効量の免疫複合体を、そのような治療を必要とする動物に投与することを含む方法を提供する。本発明はまた、癌幹細胞を死滅させるための医薬の製造における（a）結合される癌細胞上のタンパク質に結合する抗体と、（b）癌細胞に対して細胞傷害性である毒素と、を含む有効量の免疫複合体の使用を提供する。

【0050】

癌細胞上のタンパク質に結合する抗体は、癌細胞に対して免疫複合体を選択的に標的化することができる任意の分子であり得る。一実施形態において、本抗体は、腫瘍関連抗原に結合する。肝癌細胞上で発現するタンパク質の例としては、I L - 4 受容体、E G F 受容体、H E R 2 / n e u 表面タンパク質、E G F 受容体、g p 5 4、E p - C A M、C D

10

20

30

40

50

133、CD13、CD44、およびCD90が挙げられる。特定の実施形態において、本抗体はEp-CAMに結合する。

【0051】

肝癌細胞または癌幹細胞上の抗原を認識する特異的抗体または抗体断片はまた、免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリーをスクリーニングし、そのタンパク質をコードする核酸分子から産生されるペプチドと共に細菌内で発現させることによって生成できる。例えば、完全なFab断片、V_H領域およびV_L領域は、ファージ発現ライブラリーを用いて細菌内で発現させることができる。あるいは、SCID-huマウスを用いて、抗体またはその断片を産生することができる。

【0052】

免疫複合体の抗体部分は、免疫グロブリン由来であってもよく、すなわち、免疫グロブリン（または抗体）である出発分子を追跡することができる。例えば、抗体は、当技術分野で公知の標準的な技術を使用する免疫グロブリン骨格の修飾によって産生できる。別の非限定的な例では、免疫グロブリンドメイン（例えば、可変重鎖および／または軽鎖）は、非免疫グロブリン骨格に連結できる。さらに、抗体は、限定されないが、化学反応または遺伝子設計なしで開発できる。したがって、非限定的な例において、免疫複合体は、肝癌細胞に特異的に結合する免疫グロブリン由来のポリペプチド（例えば、抗体ライブラリーから選択された抗体）、またはその変異体と、毒素またはその変異体と、を含み得る。このような免疫グロブリンポリペプチドは、例えば、標的腫瘍関連分子へのそれらの結合特性に影響を与えるように、またはそれらの物理的特性を改善するように再設計できる。

【0053】

免疫複合体の抗体部分は、免疫グロブリンベースである必要はない。したがって、免疫複合体は、肝癌細胞に特異的に結合する非免疫グロブリンポリペプチド（例えば、Affibody（登録商標））、またはその変異体と、毒素またはその変異体と、を含み得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、標的腫瘍関連分子に結合するように設計できる。さらに、非免疫グロブリンポリペプチドは、所望の親和性または結合活性を有するように操作でき、かつ極端なpH範囲および比較的高い温度を含む様々な物理的条件に耐容性を示すように設計できる。

【0054】

実際に、医薬組成物で使用するために、生理的条件（例えば、ペプチダーゼの存在下で37℃）で比較的長い半減期を有する非免疫グロブリンポリペプチドの設計が有利であり得る。さらに、そのような分子、またはその変異体は、良好な溶解性、小型、適切な折り畳みを実証することができ、容易に入手可能で低コストの細菌系で発現させることができ、したがって、商業的に合理的な量で製造できる。非免疫グロブリンポリペプチドを設計する能力は、当業者の技術の範囲内である。

【0055】

エピトープ結合ポリペプチドの例としては、限定されないが、フィブロネクチンIII型ドメインを含むリガンド、プレクストリン相同性（PH）ドメイン、およびアンキリンリピートなどを含むタンパク質リピートドメインのアセンブリに基づく結合分子が挙げられる。

【0056】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、ヒト化、安定化、単鎖、抗Ep-CAM抗体、マウスモノクローナル抗体MOC31に由来する4D5MOC-Bであり得、本発明の主題である。

【0057】

いくつかの実施形態において、抗体は、好ましくは、Ep-CAMを認識する。一実施形態において、免疫複合体は、（a）結合される癌細胞上のEp-CAMに結合する抗体または抗体断片と、（b）癌細胞に対して細胞傷害性である毒素と、を含む。特定の実施形態において、免疫複合体は、（a）ヒトEp-CAMの細胞外ドメインに結合し、結合されるMOC-31抗体由来の相補性決定領域（CDR）配列を含むヒト化抗体または抗

10

20

30

40

50

体断片と、(b) 癌細胞に対して細胞傷害性である毒素と、を含む。4 D 5 M O C - B 抗体由来の C D R 配列を配列番号 4 ~ 9 に示す。

【0058】

一実施形態において、軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3、ならびに重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 の変異体のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 4 ~ 9 と少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 70 %、最も好ましくは少なくとも 80 %、さらにより好ましくは少なくとも 90 %、さらに最も好ましくは 95 % の配列同一性を有する。

【0059】

別の実施形態において、E p - C A M 抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の変異体のアミノ酸配列は、配列番号 1 と少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 70 %、最も好ましくは少なくとも 80 %、さらにより好ましくは少なくとも 90 %、およびさらに最も好ましくは 95 % の配列同一性を有する。

【0060】

適切な E p - C A M 標的免疫複合体には、限定されないが、V B 4 - 8 4 5 またはその変異体、M O C 3 1 可変領域またはその変異体を含む他の免疫複合体、および E p - C A M に選択的に結合する他の一本鎖または二本鎖免疫グロブリンを含む免疫複合体が含まれる。

【0061】

具体的な、非限定的な実施形態において、この免疫複合体は、配列番号 2 に示されるような V B 4 - 8 4 5 を含む。他の非限定的な実施形態において、この免疫複合体は、V B 4 - 8 4 5 の変異体を含む。V B 4 - 8 4 5 の変異体は、V B 4 - 8 4 5 が結合する同じ E p - C A M エピトープまたは実質的に類似した E p - C A M エピトープに結合し、この変異体は、生理的条件下で E p - C A M への V B 4 - 8 4 5 の結合を少なくとも 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、または 95 % 競合的に阻害し得る。V B 4 - 8 4 5 変異体は、V B 4 - 8 4 5 と同じシュードモナス外毒素 A 断片を含むか、もしくは同じ外毒素の異なる部分または異なる毒素を含み得る。いくつかの実施形態において、免疫複合体 V B 4 - 8 4 5 は、p e l B リーダー配列を欠いていてもよく、配列番号 2 のアミノ酸 23 ~ アミノ酸 669 のアミノ酸配列を含む。

【0062】

一実施形態において、V B 4 - 8 4 5 の変異体アミノ酸配列は、配列番号 2 と少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 70 %、最も好ましくは少なくとも 80 %、さらにより好ましくは少なくとも 90 %、さらに最も好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性を有する。

【0063】

同様に、様々な毒素を用いて、本発明による E p - C A M - 標的化免疫複合体を設計してもよい。好ましい実施形態において、毒素は、植物毒素または細菌毒素であり得る。非限定的な例としては、アブリン、モデシン、ビスクミン、ゲロニン、ボウガニン、サボリン、リシン、リシン A 鎖、ブリオジン、ルフィン、モモルディン、リストリクトシン (r e s t r i c t o c i n)、シュードモナス外毒素 A、百日咳毒素、破傷風、ボツリヌス毒素、赤痢菌毒素、コレラ毒素、ジフテリア毒素およびそれらの組み合わせが挙げられる。毒素がリボソーム不活性化タンパク質である場合、免疫複合体は、毒素が細胞にとって細胞傷害性であるために、癌細胞に結合すると内部移行できる。

【0064】

特に好ましい実施形態において、毒素部分は、少なくともシュードモナス外毒素 A (「E T A」) の毒性部分、またはその変異体を含む。特定の実施形態において、細胞傷害性部分は、単独で投与された場合、細胞に結合することが実質的にできない E T A 変異体を含む。さらに、特定の実施形態において、細胞傷害性部分は、E T A₂₅₂₋₆₀₈ を含む。細胞傷害性部分は、当技術分野で公知の 1 つまたは複数のシュードモナス外毒素を含

み得る。

【0065】

他の非限定的な実施形態において、毒素は、DNAを妨害するように作用する薬剤を含む。したがって、毒素は、限定されないが、エンジン（例えば、カリケアマイシンおよびエスペラマイシン）および非エンジン低分子薬剤（例えば、ブレオマイシン、メチウムプロピル-E D T A - F e (I I) を含む得る。本発明による有用な他の毒素には、限定されないが、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ジスタマイシンA、シスプラチン、マイトマイシンC、エクチナサイジン、デュオカルマイシン/ C C - 1 0 6 5、およびブレオマイシン/ペブレオマイシンが含まれる。

【0066】

他の非限定的な実施形態において、毒素は、チューブリンを破壊するように作用する薬剤を含む。このような毒素は、限定されないが、リゾキシシン/メイタンシン、パクリタキセル、ビンクリスチンおよびビンブラスチン、コルヒチン、アウリスタチン、ドラスタチン10 MMAE、ならびにペロルシドAを含む得る。

【0067】

他の非限定的な実施形態において、本発明の免疫複合体の毒素部分は、限定されないが、アサレイ (A s a l e y) N S C 1 6 7 7 8 0、A Z Q N S C 1 8 2 9 8 6、B C N U N S C 4 0 9 9 6 2、ブスルファン N S C 7 5 0、カルボキシフタラート白金 N S C 2 7 1 6 7 4、C B D C A N S C 2 4 1 2 4 0、C C N U N S C 7 9 0 3 7、C H I P N S C 2 5 6 9 2 7、クロラムブシル N S C 3 0 8 8、クロロゾトシン N S C 1 7 8 2 4 8、シスプラチン N S C 1 1 9 8 7 5、クロメゾン N S C 3 3 8 9 4 7、シアノモルホリノドキソルビシン N S C 3 5 7 7 0 4、シクロジソン N S C 3 4 8 9 4 8、ジアンヒドロガラクトール N S C 1 3 2 3 1 3、フルオロドパン N S C 7 3 7 5 4、ヘブスルファン N S C 3 2 9 6 8 0、ヒカントン N S C 1 4 2 9 8 2、メルファラン N S C 8 8 0 6、メチル C C N U N S C 9 5 4 4 1、マイトマイシンC N S C 2 6 9 8 0、ミトゾラミド N S C 3 5 3 4 5 1、窒素マスタード、N S C 7 6 2、P C N U N S C 9 5 4 6 6、ピペラジン N S C 3 4 4 0 0 7、ピペラジンジオン N S C 1 3 5 7 5 8、ピポプロマン N S C 2 5 1 5 4、ポルフィロマイシン N S C 5 6 4 1 0、スピロヒダントインマスタード N S C 1 7 2 1 1 2、テロキシロン N S C 2 9 6 9 3 4、テトラプラチン N S C 3 6 3 8 1 2、チオテバ N S C 6 3 9 6、トリエチレンメラミン N S C 9 7 0 6、ウラシルナイトロジェンマスタード N S C 3 4 4 6 2、および Y o s h i - 8 6 4 N S C 1 0 2 6 2 7 を含むアルキル化剤を含む得る。

【0068】

他の非限定的な実施形態において、本発明の免疫複合体の毒素部分は、限定されないが、アロコルヒチン N S C 4 0 6 0 4 2、ハリコンドリンB N S C 6 0 9 3 9 5、コルヒチン N S C 7 5 7、コルヒチン誘導体 N S C 3 3 4 1 0、ドラスタチン10 N S C 3 7 6 1 2 8、メイタンシン N S C 1 5 3 8 5 8、リゾキシシン N S C 3 3 2 5 9 8、タキソール N S C 1 2 5 9 7 3、タキソール誘導体 N S C 6 0 8 8 3 2、チオコルヒチン N S C 3 6 1 7 9 2、トリチルシステイン N S C 8 3 2 6 5、ビンブラスチン硫酸塩 N S C 4 9 8 4 2、およびビンクリスチン硫酸塩 N S C 6 7 5 7 4 を含む抗有糸分裂剤を含む得る。

【0069】

他の非限定的な実施形態において、本発明の免疫複合体の毒素部分は、限定されないが、カンプトテシン N S C 9 4 6 0 0、カンプトテシンNa塩 N S C 1 0 0 8 8 0、アミノカンプトテシン N S C 6 0 3 0 7 1、カンプトテシン誘導体 N S C 9 5 3 8 2、カンプトテシン誘導体 N S C 1 0 7 1 2 4、カンプトテシン誘導体 N S C 6 4 3 8 3 3、カンプトテシン誘導体 N S C 6 2 9 9 7 1、カンプトテシン誘導体 N S C 2 9 5 5 0 0、カンプトテシン誘導体 N S C 2 4 9 9 1 0、カンプトテシン誘導体 N S C 6 0 6 9 8 5、カンプトテシン誘導体 N S C 3 7 4 0 2 8、カンプトテシン

誘導体 NSC 176323、カンプトテシン誘導体 NSC 295501、カンプトテシン誘導体 NSC 606172、カンプトテシン誘導体 NSC 606173、カンプトテシン誘導体 NSC 618939、カンプトテシン誘導体 NSC 610457、カンプトテシン誘導体 NSC 606499、カンプトテシン誘導体 NSC 610456、カンプトテシン誘導体 NSC 364830、カンプトテシン誘導体 NSC 606497、およびモルホリノドキシソルビシン NSC 354646を含むトポイソメラーゼ I 阻害剤を含み得る。

【0070】

他の非限定的な実施形態において、本発明の免疫複合体の毒素部分は、限定されないが、ドキシソルビシン NSC 123127、アモナフィド NSC 308847、m-AMSA NSC 249992、アントラピラゾール誘導体 NSC 355644、ピラゾロアクリジン NSC 366140、ピサントレン HCL NSC 337766、ダウノルビシン NSC 82151、デオキシドキシソルビシン NSC 267469、ミトキサントロン NSC 301739、メノガリル NSC 269148、N、N-ジベンジルダウノマイシン NSC 268242、オキサントラゾール NSC 349174、ルビダゾン NSC 164011、VM-26 NSC 122819、および VP-16 NSC 141540を含むトポイソメラーゼ II 阻害剤を含み得る。

【0071】

他の非限定的な実施形態において、本発明の免疫複合体の毒素部分は、限定されないが、L-al-アノシン NSC 153353、5-アザシチジン NSC 102816、5-フルオロウラシル NSC 19893、アシビシン NSC 163501、アミノプテリン誘導体 NSC 132483、アミノプテリン誘導体 NSC 184692、アミノプテリン誘導体 NSC 134033、アンチホル (anti fol) NSC 633713、アナンチホル NSC 623017、ベーカーの可溶性アンチホル NSC 139105、ジクロロアリルローソン NSC 126771、ブレキナル NSC 368390、フトラフル (プロドラッグ) NSC 148958、5, 6-ジヒドロ-5-アザシチジン NSC 264880、メトトレキサート NSC 740、メトトレキサート誘導体 NSC 174121、N-(ホスホノアセチル)-L-アスパラギン酸 (PALA) NSC 224131、ピラゾフリン NSC 143095、トリメトトレキサート NSC 352122、3-HP NSC 95678、2'-デオキシ-5-フルオロウリジン NSC 27640、5-HP NSC 107392、アルファ-TGDR NSC 71851、アフィジコリングリシネート NSC 303812、ara-C NSC 63878、5-アザ-2'-デオキシシチジン NSC 127716、ベーター-TGDR NSC 71261、シクロシチジン NSC 145668、グアナゾール NSC 1895、ヒドロキシウレア NSC 32065、イノシングリコジアルデヒド NSC 118994、マクベシン II NSC 330500、ピラゾールイミダゾール NSC 51143、チオグアニン NSC 752、およびチオプリン NSC 755を含むRNAまたはDNA代謝拮抗物質を含み得る。

【0072】

抗体は、毒素に関連付けることができるか、または毒素に連結できる任意の手段によって、標的にコンジュゲートさせてもよい。例えば、抗体または抗体断片は、化学的または組換え手段によって毒素に結合させることができる。融合またはコンジュゲートを調製するための化学的手段は、当技術分野で公知であり、免疫複合体を調製するために用いることができる。抗体および毒素をコンジュゲートするために使用される方法は、癌細胞上の標的分子に結合する抗体の能力を妨害することなく、毒素と抗体を結合することができなければならない。

【0073】

一実施形態において、抗体および毒素の両方はタンパク質であり、当技術分野において公知の技術を用いてコンジュゲートできる。2つのタンパク質をコンジュゲートでき、当技術分野で開示されている架橋剤は数百存在する。架橋剤は、一般的に利用可能な反応性

10

20

30

40

50

官能基または抗体もしくは毒素に挿入される反応性官能基に基づいて選択される。さらに、反応性基がない場合には、光活性化架橋剤が使用できる。特定の例において、抗体と毒素の間にスパーサーを含めることが望ましい場合がある。当技術分野で公知の架橋剤には、ホモ二官能性剤：グルタルアルデヒド、ジメチルアジピミデートおよびビス（ジアゾベンジジン）およびヘテロ二官能性剤：m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドおよびスルホ-m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドが含まれる。

【0074】

抗体-毒素タンパク質融合はまた、組換えDNA技術を用いて調製することもできる。このような場合には、抗体をコードするDNA配列は毒素をコードするDNA配列に融合され、その結果、キメラDNA分子が生じる。このキメラDNA配列は、抗体-毒素融合タンパク質を発現する宿主細胞にトランスフェクトされる。融合タンパク質は、当技術分野において公知の技術を用いて細胞培養物から収集され、精製できる。

【0075】

いくつかの実施形態において、本発明の免疫複合体を用いて、肝臓癌または肝細胞癌を治療できる。

【0076】

さらに、本発明はまた、幹/前駆細胞マーカーを発現する肝細胞を含む癌幹細胞を死滅させるための方法も提供する。腫瘍または腫瘍細胞は、本発明の治療方法に対するそれらの感受性を決定するために、例えば、腫瘍組織または細胞の試料を入手し、免疫複合体の抗体部分に結合する試料の能力を決定することによって評価され得る。一実施形態において、癌細胞上のタンパク質はEp-CAMである。Ep-CAMの細胞表面発現を、前癌または癌組織中の細胞表面Ep-CAMの定常状態レベルを増加させる薬剤により誘導または上昇させてもよい。

【0077】

したがって、本発明は、肝癌細胞が免疫複合体中の抗体によって結合されるタンパク質のレベルを発現するか否かを判定するために、本発明の治療方法の前に使用できる診断方法およびキットを含む。したがって、さらなる実施形態において、本発明は、肝細胞癌を治療または予防するための方法であって、上皮細胞接着分子（Ep-CAM）の発現について、患者の腫瘍試料を試験することと、タンパク質が対照と比較して腫瘍試料中でより高いレベルで発現される場合に、配列番号2に示す配列を有する有効量のVB4-845を患者に投与することと、を含む方法を含む。

【0078】

本発明は、肝細胞癌を診断するためのキットであって、癌を診断するための癌細胞上のタンパク質に結合する抗体と、その使用説明書と、を含むキットを含む。

【0079】

好ましい非限定的な実施形態において、癌は、免疫複合体の直接投与による治療の影響を受けやすい。例えば、標的腫瘍塊は皮膚の表面の近くに存在し得る。別の例では、病変組織は嚢胞によってカプセル化され得るか、または限定されないが、管腔を含む実質的に密閉されたキャビティ内に見出される。他の実施形態において、癌は、免疫複合体の静脈内投与による治療の影響を受けやすい。

【0080】

本発明はまた、手術後合併症のリスクを低減するための方法であって、手術、および特定の非限定的な実施形態において、癌を治療するための手術の前、手術中、または手術後に、有効量の免疫複合体を投与することを含む方法も提供する。

【0081】

本発明はまた、肝細胞癌の発生を予防する、再発を予防もしくは遅延させる、または再発率を低下させるための方法であって、有効量の免疫複合体を、それを必要とする患者に直接投与することを含む方法も提供する。

【0082】

10

20

30

40

50

本発明はまた、1つまたは複数の他の抗癌剤に対して腫瘍または癌を感作させるための方法であって、本発明の免疫複合体を投与することを含む方法も提供する。非限定的な実施形態において、他の抗癌剤は、別のE p - C A M標的免疫複合体を含む。別の非限定的な実施形態において、他の抗癌剤は放射線を含む。他の抗癌剤は、免疫複合体の投与前に、それと重複して、それと同時に、および／またはその後投与されてもよい。同時に投与される場合には、免疫複合体および他の抗癌剤は、単一の製剤または別々の製剤で投与されてもよく、別々であれば、必要に応じて、異なる投与様式による。したがって、1つまたは複数の免疫複合体と1つまたは複数の他の抗癌剤との組み合わせは、相乗的に腫瘍または癌に対抗するように作用し得る。

【0083】

いくつかの実施形態において、抗癌剤は、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン、酢酸メゲストロール、アナストロゾール、レトラゾール (letrazole)、ボラゾール、エキセメスタン、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、酢酸シプロテロン、酢酸ゴセレリン、ルプロリド (luprolide)、フィナステリド、ハーセプチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、ドキソルビシン、ダウノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシンC、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、シクロホスファミド、イホスファミド、ニトロソウレア、チオテファン、ビンクリスチン、タキソール、タキソテール、エトポシド、テニポシド、アムサクリン、イリノテカン、トポテカン、エボシロン、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、血管新生阻害剤、EGF阻害剤、VEGF阻害剤、CDK阻害剤、サイトカイン、Her1およびHer2阻害剤、ならびにモノクローナル抗体であり得る。

【0084】

別の実施形態において、免疫複合体は、放射線療法の計画と組み合わせて投与される。この療法はまた、外科手術および／または化学療法も含み得る。例えば、免疫複合体は、放射線療法とシスプラチン (プラチノール)、フルオロウラシル (5-FU、アドルシル)、カルボプラチン (パラプラチン)、および／またはパクリタキセル (タキソール) と組み合わせて投与されてもよい。免疫複合体による治療は、例えば、望ましくない体重減少または脱水をもたらす可能性のある嚥下機能を妨げる深刻な咽頭炎の発生率を減少させることができる低用量の放射線および／またはより低頻度の放射線治療の使用を可能し得る。

【0085】

1つまたは複数の他の抗癌剤に加えて本発明の免疫複合体が投与される場合、これらの他の抗癌剤には、限定されないが、2, 2', 2"-トリクロロトリエチルアミン、6-アザウリジン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、メルカプトプリン、アセグラロン (aceglaron)、アクラシノマイシンA、アクチノマイシン、アルトレタミン、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アンシタビン、アンギオゲニンアンチセンスオリゴヌクレオチド、アントラマイシン、アザシチジン、アザセリン、アジリジン、バチマスタール (batimastar)、bcl-2アンチセンスオリゴヌクレオチド、ベンゾデパ、ピカルタミド、ビスアントレン、プレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カルボプラチン、カルボコン、カルモフル、カルムスチン、カルビシン、カルジノフィリン、クロラムブシル、クロルナファジン、酢酸クロルマジノン、クロロゾトシン、クロモマイシン、シスプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デフォスファミド、デメコルチン、デノプテリン (denopterin)、ジアジコン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、ドロロキシフェン、ドロモスタノロン、エダトレキセート、エフロミシン、酢酸エリブチニウム、エミテフル、エノシタブun (enocitabun)、エピルビシン、エピチオスタノール、エストラムスチン、エトグルシド、エトポシド、ファドロゾール、フェンレチニド、フロクスウリ

ジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、フォリン酸、フォルメスタン、ホ
 スフェストロール、フォテムスチン、硝酸ガリウム、ゲムシタビン、ゴセレリン、ヘキセ
 ストロール、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、インプロスルファン、
 インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、インターロイキ
 ン-2、L-アスパラギナーゼ、レンチナン、レトロゾール、ロイプロリド、ロムスチン
 、ロニダミン、マンノムスチン、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メド
 ロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メレンゲストロール、メルファラン、メノ
 ガリル、メピチオスタン、メトトレキサート、メツレデパ、ミボプラチン、ミルテフォシ
 ン、ミトプロニトール、ミトグアゾン、ミトラクトール、マイトマイシン、ミトタン、ミ
 トキサントロン、モピダモール、ミコフェノール酸、ニルタミド、ニムスチン、ニトラシ
 ン、ノガラマイシン、ノベムビチン、オリボマイシン、オキサリプラチン、パクリタキセ
 ル、ペントスタチン、ペプロマイシン、ペルフォスファミド、フェナメット、フェネステ
 リン、ピボプロマン、ピボスルファン、ピラルビシン、ピリトレキシム、プリカマイシン
 、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、リン酸ポリエストラジオール、ポルフィマー
 ナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン、プロカバジン (procabaz
 ine)、プロパゲルマニウム、PSK、プテロプテリン、ピューロマイシン、ラニムス
 チン、ラゾキサシ、ロキニメックス、シゾフィカン (sizofrican)、ソブゾキサ
 シン、スピロゲルマニウム、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テ
 ガフル、テモゾロミド、テニボシド、テヌゾン酸 (tenuzonic acid)、
 テストラコン (testolacone)、チアミプリン、チオグアニン、トムデックス、
 トポテカン、トレミフェン、トリアジクオン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホス
 ホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、トリロスタン、トリメトレキセート、トリブ
 トレリン、トロホスファミド、トロンテカン (trontecan)、ツベルシジン、ウ
 ベニメクス、ウラシルマスタード、ウレデパ、ウレタン、ビンクリスチン、ジノスタチン
 、ゾルビシン、シトシンアラビノシド、ゲムツズマブ、チオテパ、シクロホスファミド、
 代謝拮抗剤 (例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シ
 タラビン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、ゲムシタビン、ダカルバジン、テモゾ
 ロミド (temozamide))、ヘキサメチルメラミン、リソドレン (LYSOD
 REN)、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド (例えば、タキソール、パクリタキセ
 ル、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン (CAMPTOSAR、CPT-11))
 、ビンブラスチンなどのビンカアルカロイド、ポドフィロトキシシン、エピポドフィロトキ
 シン、VP-16 (エトポシド)、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム
 、エメチン、アントラサイクリン、リボソーマルドキソルビシン、ジヒドロキシアントラ
 シンジオン (dihydroxyanthracindione)、ミトラマイシン、ア
 クチノマイシンD、アルデスロイキン、アルタミン、ピアオマイシン、カペシタビン、カ
 ルボプラチン (carboplatin)、クロラブシン (chlorabusin)、シクラ
 ラビン (cyclarabine)、ダクリノマイシン (dacclinomycin)、フ
 ロクスウリジン (floxuridhe)、酢酸ラウプロリド (lauprolide)
 、レバミゾール、ロムスリン (lomusline)、メルカプトプリン (mercap
 topurino)、メスナ、ミトランク (mitolanc)、ペガスベルガーゼ (p
 egaspergase)、ペントスラチン (pentoslatin)、ピカマイシン
 (picamycin)、リウキシルマブ (riuxlmab)、カンパス (campath)
 -1、ストラプロゾシン (straplozocin)、トレチノイン、VEGF
 アンチセンスオリゴヌクレオチド、ビンデシン、ならびにビノレルビンが含まれ得る。1
 つまたは複数の抗癌剤を含む組成物 (例えば、FLAG、CHOP) もまた、本発明によ
 って企図される。FLAGは、フルダラビン、シトシンアラビノシド (Ara-C) およ
 びG-CSFを含む。CHOPは、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルビシ
 ン、およびプレドニゾンを含む。同様に、本発明の免疫複合体は、放射線療法または他の
 既知の抗癌モダリティと組み合わせて使用できる。

10

20

30

40

50

併用療法のための医薬組成物はまた、限定されないが、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン）、アスパラギナーゼ、B C Gタンパク質、ジフテリア毒素、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、抗有糸分裂剤、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、抗ヒスタミン薬、抗悪心薬なども含まれ得る。

【0087】

実際に、そのような治療を必要とする患者への有効量の免疫複合体の直接投与は、臨床的に有意な効果を有する別の抗癌剤の用量の低減をもたらし得る。このような用量が低減された他の抗癌剤の有効性は、免疫複合体の投与が無い場合には観察され得ない。したがって、本発明は、腫瘍または癌を治療するための方法であって、用量が低減された1つまたは複数の他の抗癌剤を投与することを含む方法を提供する。

10

【0088】

さらに、このような治療を必要とする患者に対する免疫複合体を含む併用療法は、標準的な治療計画の期間またはサイクル数と比較して、比較的短い治療回数を可能し得る。したがって、本発明は、腫瘍または癌を治療するための方法であって、比較的短い期間および／またはより少ない治療サイクルで1つまたは複数の他の抗癌剤を投与することを含む方法を提供する。

【0089】

したがって、本発明によれば、免疫複合体および別の抗癌剤を含む併用療法は、全体的な癌治療の毒性（すなわち、副作用）を低減し得る。例えば、単独療法または別の併用療法と比較した場合に、毒性の低減は、低減された用量の免疫複合体および／または他の抗癌剤を送達する場合、かつ／またはサイクルの期間（すなわち、単回投与の期間または一連のそのような投与の期間）を低減した場合、かつ／またはサイクル数を低減した場合に観察され得る。

20

【0090】

好ましい実施形態において、本発明は、肝細胞癌を患っている患者の臨床状態を治療および／または改善するための方法を提供する。したがって、本発明は、（i）肝臓腫瘍サイズ、成長速度、侵襲性、悪性度、および／または再発のリスクを減少させるため、（i i）治療後の無病期間を延長するため、ならびに（i i i）有効量の免疫複合体を患者に投与することにより肝細胞癌の転移の可能性を減少させるため、の方法を提供する。

30

【0091】

本発明の免疫複合体を用いた癌治療の臨床転帰は、医師などの関連分野の当業者によって容易に認識される。例えば、癌の臨床マーカーを測定するための標準的な医学的検査は、治療の有効性の強力な指標であり得る。このような試験には、限定されないが、身体検査、性能尺度、疾患マーカー、12-誘導ECG、腫瘍測定、組織生検、細胞検査、細胞診、腫瘍の最長直径の計算、X線検査、腫瘍のデジタル画像、バイタルサイン、体重、有害事象の記録、感染エピソードの評価、併用薬の評価、痛みの評価、血液または血清化学、血清マーカーの検出、尿検査、CTスキャン、および薬物動態解析が含まれ得る。さらに、免疫複合体および別の抗癌剤を含む併用療法の相乗効果は、単剤療法を受けている患者との比較研究によって決定され得る。

40

【0092】

サイクル中に投与される有効量の免疫複合体は、投与の様式に応じて変化する。直接投与（例えば、腫瘍内注射）は、免疫複合体の全身静脈内投与と比較して、はるかに少ない免疫複合体の全身投与量を必要とする。局所投与は、より低い全身用量をもたらす、そのような状況では、結果として低い循環血漿レベルの免疫複合体が期待および希望されることは当業者には明らかであろう。

【0093】

一実施形態において、免疫複合体の直接投与による有効用量は、約10～3000、20～900、30～800、40～700、50～600、60～500、70～400

50

、80～300、90～200、または100～150マイクログラム／腫瘍／日の範囲であり得る。他の実施形態において、この用量は、約10～20、21～40、41～80、81～100、101～130、131～150、151～200、201～280、281～350、351～500、501～1000、1001～2000、または2001～3000マイクログラム／腫瘍／日の範囲であり得る。特定の実施形態において、この用量は、少なくとも約20、40、80、130、200、280、400、500、750、1000、2000、または3000マイクログラム／腫瘍／日であり得る。

【0094】

別の実施形態において、免疫複合体の有効用量は、100～5000、200～4000、300～3000、400～2000、500～1000、600～900、または700～1500マイクログラム／腫瘍／月の範囲であり得る。他の実施形態において、この用量は、約100～199、200～399、400～649、650～999、1000～1799、1800～2499、2500～3499、3500～4999、5000～7499、7500～10000、または10001～20000マイクログラム／腫瘍／月の範囲であり得る。特定の実施形態において、この用量は、少なくとも約100、200、400、650、1000、1400、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、7500、10000、または20000マイクログラム／腫瘍／月であり得る。

【0095】

別の実施形態において、免疫複合体の有効用量は、免疫複合体の少なくとも約5、10、20、30、40、50、60、75、100、125、150、100、200、300、400、または500マイクログラム／ cm^3 の腫瘍内濃度をもたらす。他の実施形態において、結果として生じる免疫複合体の腫瘍内濃度は、約5～500、10～400、15～300、20～200、25～100、30～90、35～80、40～70、45～60、または50～55マイクログラム／ cm^3 である。他の実施形態において、結果として生じる免疫複合体の腫瘍内濃度は、約10～15、16～20、21～25、26～30、31～35、36～40、41～45、46～50、51～55、56～60、61～65、66～70、71～75、76～80、81～85、86～90、91～95、96～100、または100～200マイクログラム／ cm^3 である。

【0096】

別の実施形態において、免疫複合体の有効用量は、約0.1、1、2.5、5、7.5、10、15、20、30、40、または50マイクログラム／リットル未満の血漿濃度をもたらす。他の実施形態において、結果として生じる免疫複合体の循環濃度は、約0.1～50、1～40、2.5～30、5～20、または7.5～10マイクログラム／リットルである。他の実施形態において、結果として生じる免疫複合体の循環濃度は、約0.1～1、1.1～2.4、2.5～5、5.1～7.4、7.5～10、11～15、16～20、21～30、31～40、または41～50マイクログラム／リットルである。

【0097】

特定の非限定的な実施形態において、免疫複合体の有効用量は、約100～3000マイクログラム／腫瘍／月、例えば、約100、200、300、400、750、または1000マイクログラム／腫瘍／月であり、患者は1日あたりの単回用量を投与される。単回用量は、約1、2、3、4、5、または6ヶ月連続でほぼ毎月投与される。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、4、6または12ヶ月後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、4、6、または12ヶ月間隔を開けてもよい。

【0098】

特定の非限定的な実施形態において、免疫複合体の有効用量は、約20～1240マイクログラム／腫瘍／日、例えば、約20、40、80、130、200、もしくは280マイクログラム／腫瘍／日または約100、200、330、500、700、930、

1 2 4 0 マイクログラム／腫瘍／日であり、患者は1日あたりの単回用量を投与される。単回用量は、約1、2、3、4、5、6、または7日間連続してほぼ毎日（必要に応じて、1日または複数日省略されてもよい）投与される。このサイクルの後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。

【0099】

一実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約100マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約200マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約300マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約400マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約500マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約600マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約700マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約900マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約1000マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約1100マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約1200マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約1300マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約1400マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約1500マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約2000マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日の範囲であり得る。投与量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、21日、28日、35日、42日、49日、56日、63日、または70日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。ストックVB4-845は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

【0100】

一実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約100マイクログラム／日～約2500マイクログラム／日、約100マイクログラム～約2400マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約2300マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約2200マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約2100マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約2000マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1900マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1800マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1700マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1600マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1500マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1400マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1300マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1200マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1100マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約1000マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約900マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約800マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約700マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約600マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約500マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約400マイクログラム／日、約100マイクログラム／日～約300マイクログラム／日、または約100マイクログラム／日～約200マイクログラム／日の範囲であり得る。投与量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、21日、28日、35日、42日、49日、56日、63日、または70日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る

10

20

30

40

50

。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。ストックVB4-845は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

【0101】

一実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約200マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日、約200マイクログラム～約2400マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約2300マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約2200マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約2100マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約2000マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1900マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1800マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1700マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1600マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1500マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1400マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1300マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1200マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1100マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約1000マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約900マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約800マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約700マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約600マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約500マイクログラム/日、約200マイクログラム/日～約400マイクログラム/日、または約200マイクログラム/日～約300マイクログラム/日の範囲であり得る。投与量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、21日、28日、35日、42日、49日、56日、63日、または70日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。ストックVB4-845は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

【0102】

一実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約300マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日、約300マイクログラム～約2400マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約2300マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約2200マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約2100マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約2000マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1900マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1800マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1700マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1600マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1500マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1400マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1300マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1200マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1100マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約1000マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約900マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約800マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約700マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約600マイクログラム/日、約300マイクログラム/日～約500マイクログラム/日、または約300マイクログラム/日～約400マイクログラム/日の範囲であり得る。投与量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、21日、28日、35日、42日、49日、56日、63日、または70日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、

約 1、2、3、4、5、または 6 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、または 6 週間隔を開けてもよい。ストック VB 4-845 は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

【0103】

一実施形態において、癌部位での VB 4-845 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 400 マイクログラム/日～約 2500 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム～約 2400 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 2300 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 2200 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 2100 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 2000 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1900 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1800 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1700 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1600 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1500 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1400 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1300 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1200 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1100 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 1000 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 900 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 800 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 700 マイクログラム/日、約 400 マイクログラム/日～約 600 マイクログラム/日、または約 400 マイクログラム/日～約 500 マイクログラム/日の範囲であり得る。投与量は、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、21 日、28 日、35 日、42 日、49 日、56 日、63 日、または 70 日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、または 6 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、または 6 週間隔を開けてもよい。ストック VB 4-845 は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

【0104】

一実施形態において、癌部位での VB 4-845 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 500 マイクログラム/日～約 2500 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム～約 2400 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 2300 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 2200 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 2100 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 2000 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1900 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1800 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1700 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1600 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1500 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1400 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1300 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1200 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1100 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 1000 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 900 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 800 マイクログラム/日、約 500 マイクログラム/日～約 700 マイクログラム/日、または約 500 マイクログラム/日～約 600 マイクログラム/日の範囲であり得る。投与量は、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、21 日、28 日、35 日、42 日、49 日、56 日、63 日、または 70 日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、または 6 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、または 6 週間隔を開けてもよい。ストック VB 4-845 は

、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

【0105】

一実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約600マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日、約600マイクログラム～約2400マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約2300マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約2200マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約2100マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約2000マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1900マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1800マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1700マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1600マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1500マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1400マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1300マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1200マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1100マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約1000マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約900マイクログラム/日、約600マイクログラム/日～約800マイクログラム/日、または約600マイクログラム/日～約700マイクログラム/日の範囲であり得る。投与量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、21日、28日、35日、42日、49日、56日、63日、または70日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。ストックVB4-845は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

10

20

【0106】

一実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約700マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日、約700マイクログラム～約2400マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約2300マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約2200マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約2100マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約2000マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1900マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1800マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1700マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1600マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1500マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1400マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1300マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1200マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1100マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約1000マイクログラム/日、約700マイクログラム/日～約900マイクログラム/日、または約700マイクログラム/日～約800マイクログラム/日の範囲であり得る。投与量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、21日、28日、35日、42日、49日、56日、63日、または70日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。ストックVB4-845は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

30

40

【0107】

一実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約800マイクログラム/日～約2500マイクログラム/日、約800マイクログ

50

ラム～約2400マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約2300マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約2200マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約2100マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約2000マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1900マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1800マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1700マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1600マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1500マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1400マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1300マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1200マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1100マイクログラム／日、約800マイクログラム／日～約1000マイクログラム／日、または約800マイクログラム／日～約900マイクログラム／日の範囲であり得る。投与量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、21日、28日、35日、42日、49日、56日、63日、または70日間、毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。ストックVB4-845は、投与に必要な濃度を得るために、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の滅菌溶液で希釈され得る。

10

【0108】

20

いくつかの実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約100マイクログラム／週～約5000マイクログラム／週、約100マイクログラム～約4500マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約4000マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約3500マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約3000マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約2500マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約2000マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1800マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1700マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1600マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1500マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1400マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1300マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1200マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1100マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約1000マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約900マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約800マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約700マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約600マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約500マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約400マイクログラム／週、約100マイクログラム／週～約300マイクログラム／週、または約100マイクログラム／週～約200マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は1週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に2用量、3用量、4用量、または5用量を投与され得る。投与サイクルは、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12週間隔を開けてもよい。

30

40

【0109】

いくつかの実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による有効用量は、約200マイクログラム／週～約5000マイクログラム／週、約200マイクログラム～約4500マイクログラム／週、約200マイクログラム／週～約400

50

0 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 3500 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 3000 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 2500 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 2000 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1800 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1700 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1600 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1500 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1400 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1300 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1200 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1100 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 1000 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 900 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 800 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 700 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 600 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 500 マイクログラム/週、約 200 マイクログラム/週～約 400 マイクログラム/週、または約 200 マイクログラム/週～約 300 マイクログラム/週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は 1 週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に 2 用量、3 用量、4 用量、または 5 用量を投与され得る。投与サイクルは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、または 10 週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週間隔を開けてもよい。

10

20

【0110】

いくつかの実施形態において、癌部位での VB4-845 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 300 マイクログラム/週～約 5000 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 4500 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 4000 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 3500 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 3000 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 2500 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 2000 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1800 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1700 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1600 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1500 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1400 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1300 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1200 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1100 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 1000 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 900 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 800 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 700 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 600 マイクログラム/週、約 300 マイクログラム/週～約 500 マイクログラム/週、または約 300 マイクログラム/週～約 400 マイクログラム/週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は 1 週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に 2 用量、3 用量、4 用量、または 5 用量を投与され得る。投与サイクルは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、または 10 週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週間隔を開けてもよい。

30

40

【0111】

いくつかの実施形態において、癌部位での VB4-845 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 400 マイクログラム/週～約 5000 マイクログラム/週、約 400 マ

50

イクログラム～約4500マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約400
 0マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約3500マイクログラム／週、
 約400マイクログラム／週～約3000マイクログラム／週、約400マイクログラム
 ／週～約2500マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約2000マイク
 ログラム／週、約400マイクログラム／週～約1800マイクログラム／週、約400
 マイクログラム／週～約1700マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約
 1600マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約1500マイクログラム
 ／週、約400マイクログラム／週～約1400マイクログラム／週、約400マイク
 ログラム／週～約1300マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約1200
 マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約1100マイクログラム／週、約
 400マイクログラム／週～約1000マイクログラム／週、約400マイクログラム／
 週～約900マイクログラム／週、約400マイクログラム／週～約800マイクログラ
 ム／週、約400マイクログラム／週～約700マイクログラム／週、約400マイク
 ログラム／週～約600マイクログラム／週、または約400マイクログラム／週～約50
 0マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は1週
 間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に2用量、
 3用量、4用量、または5用量を投与され得る。投与サイクルは、1週間、2週間、3週
 間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間の投与を含み得
 る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、
 11、または12週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイク
 ルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または1
 2週間隔を開けてもよい。

10

20

【0112】

いくつかの実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による
 有効用量は、約500マイクログラム／週～約5000マイクログラム／週、約500マ
 イクログラム～約4500マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約400
 0マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約3500マイクログラム／週、
 約500マイクログラム／週～約3000マイクログラム／週、約500マイクログラム
 ／週～約2500マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約2000マイク
 ログラム／週、約500マイクログラム／週～約1800マイクログラム／週、約500
 マイクログラム／週～約1700マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約
 1600マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約1500マイクログラム
 ／週、約500マイクログラム／週～約1400マイクログラム／週、約500マイク
 ログラム／週～約1300マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約1200
 マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約1100マイクログラム／週、約
 500マイクログラム／週～約1000マイクログラム／週、約500マイクログラム／
 週～約900マイクログラム／週、約500マイクログラム／週～約800マイクログラ
 ム／週、約500マイクログラム／週～約700マイクログラム／週、または約500マ
 イクログラム／週～約600マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態
 において、単回用量は1週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量
 は、例えば、週に2用量、3用量、4用量、または5用量を投与され得る。投与サイク
 ルは、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、また
 は10週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5
 、6、7、8、9、10、11、または12週後に開始され得る。治療計画は1、2、3
 、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、6、7、8、
 9、10、11、または12週間隔を開けてもよい。

30

40

【0113】

いくつかの実施形態において、癌部位でのVB4-845免疫複合体の直接投与による
 有効用量は、約600マイクログラム／週～約5000マイクログラム／週、約600マ
 イクログラム～約4500マイクログラム／週、約600マイクログラム／週～約400

50

0 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 3500 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 3000 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 2500 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 2000 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1800 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1700 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1600 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1500 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1400 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1300 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1200 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1100 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 1000 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 900 マイクログラム／週、約 600 マイクログラム／週～約 800 マイクログラム／週、または約 600 マイクログラム／週～約 700 マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は 1 週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に 2 用量、3 用量、4 用量、または 5 用量を投与され得る。投与サイクルは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、または 10 週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週間隔を開けてもよい。

10

【0114】

20

いくつかの実施形態において、癌部位での VB4-845 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 700 マイクログラム／週～約 5000 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 4500 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 4000 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 3500 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 3000 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 2500 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 2000 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1800 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1700 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1600 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1500 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1400 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1300 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1200 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1100 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 1000 マイクログラム／週、約 700 マイクログラム／週～約 900 マイクログラム／週、または約 700 マイクログラム／週～約 800 マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は 1 週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に 2 用量、3 用量、4 用量、または 5 用量を投与され得る。投与サイクルは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、または 10 週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 週間隔を開けてもよい。

30

40

【0115】

いくつかの実施形態において、癌部位での VB4-845 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 800 マイクログラム／週～約 5000 マイクログラム／週、約 800 マイクログラム／週～約 4500 マイクログラム／週、約 800 マイクログラム／週～約 4000 マイクログラム／週、約 800 マイクログラム／週～約 3500 マイクログラム／週、約 800 マイクログラム／週～約 3000 マイクログラム／週、約 800 マイクログラム／週～約 2500 マイクログラム／週、約 800 マイクログラム／週～約 2000 マイクログラム／週、約 800 マイクログラム／週～約 1800 マイクログラム／週、約 800

50

マイクログラム／週～約 1 7 0 0 マイクログラム／週、約 8 0 0 マイクログラム／週～約 1 6 0 0 マイクログラム／週、約 8 0 0 マイクログラム／週～約 1 5 0 0 マイクログラム／週、約 8 0 0 マイクログラム／週～約 1 4 0 0 マイクログラム／週、約 8 0 0 マイクログラム／週～約 1 3 0 0 マイクログラム／週、約 8 0 0 マイクログラム／週～約 1 2 0 0 マイクログラム／週、約 8 0 0 マイクログラム／週～約 1 1 0 0 マイクログラム／週、約 8 0 0 マイクログラム／週～約 1 0 0 0 マイクログラム／週、または約 8 0 0 マイクログラム／週～約 9 0 0 マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は 1 週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に 2 用量、3 用量、4 用量、または 5 用量を投与され得る。投与サイクルは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、または 1 0 週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、または 1 2 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、または 1 2 週間隔を開けてもよい。

10

【0 1 1 6】

いくつかの実施形態において、癌部位での V B 4－8 4 5 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 5 0 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 4 5 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 4 0 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 3 5 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 3 0 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 2 5 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 2 0 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 8 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 7 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 6 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 5 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 4 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 3 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 2 0 0 マイクログラム／週、約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 1 0 0 マイクログラム／週、または約 9 0 0 マイクログラム／週～約 1 0 0 0 マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は 1 週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、週に 2 用量、3 用量、4 用量、または 5 用量を投与され得る。投与サイクルは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、または 1 0 週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、または 1 2 週後に開始され得る。治療計画は 1、2、3、4、5、または 6 サイクルを含み、各サイクルは約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、または 1 2 週間隔を開けてもよい。

20

30

【0 1 1 7】

いくつかの実施形態において、癌部位での V B 4－8 4 5 免疫複合体の直接投与による有効用量は、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 5 0 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 4 5 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 4 0 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 3 5 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 3 0 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 2 5 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 2 0 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 8 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 7 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 6 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 5 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 4 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 3 0 0 マイクログラム／週、約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 2 0 0 マイクログラム／週、または約 1 0 0 0 マイクログラム／週～約 1 1 0 0 マイクログラム／週の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、単回用量は 1 週間で投与され得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、例えば、

40

50

週に2用量、3用量、4用量、または5用量を投与され得る。投与サイクルは、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、または10週間の投与を含み得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12週後に開始され得る。治療計画は1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12週間隔を開けてもよい。

【0118】

注入量は、好ましくは、腫瘍の種類および／または場所に適する少なくとも有効量である。単回用量の最大注入量は、腫瘍体積の約25%～75%、例えば、推定標的腫瘍体積の4分の1、3分の1、または4分の3であり得る。特定の非限定的な実施形態において、単回用量の最大注入量は、腫瘍容積の約30%である。

10

【0119】

別の実施形態において、免疫複合体は、安全性試験で確立された最大耐量以下で、サイクルあたり総用量で腫瘍内に投与されるが、投与量は腫瘍容積に関して標準化される。例えば、対象は、腫瘍1cm³あたり1マイクログラム～500マイクログラム、または腫瘍組織1cm³あたり約14ピコモル～7ナノモルに達するのに十分な用量を受け取る。用量は、腫瘍容積の約20～50%を超えない量で投与される。免疫複合体は、適切な塩溶液中に希釈される。例えば、3cm³推定容積の腫瘍、14ピコモル（1cm³あたり1マイクログラム）の標的用量、および腫瘍の約1/3の最大注入相対量については、3マイクログラムの免疫複合体が約1mlの希釈液に希釈される。

20

【0120】

別の特定の実施形態において、免疫複合体の有効用量は、約20～300マイクログラム／腫瘍／日、例えば、約20、40、80、130、200、または280マイクログラム／腫瘍／日であり、患者は1日あたりの単回用量を投与される。単回用量の最大注入量は、腫瘍体積の約25%～75%、例えば、推定標的腫瘍体積の約4分の1、3分の1、または4分の3であり得る。単回用量は、約5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、または31日間連続して一日おきに投与される。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12週後に開始され得る。治療計画は、1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12週間隔を開けてよい。

30

【0121】

1つの特定の非限定的な実施形態において、VB4-845などの免疫複合体は、約280マイクログラム／腫瘍／日の用量で投与され、患者は1日あたりの単回用量を投与される。単回用量の最大注入量は、推定標的腫瘍容積の約3分の1である。単回用量は、約5日間連続して毎日投与される。このサイクル後、次のサイクルは約1ヶ月後、好ましくは最初のサイクルの最初の日から1ヶ月目に開始され得る。治療計画は3サイクルを含み、各サイクルは、無治療の約1週の間隔を開けてもよい。

【0122】

別の特定の非限定的な実施形態において、VB4-845などの免疫複合体は、約280マイクログラム／腫瘍／日の用量で投与され、患者は1日あたりの単回用量を投与される。単回用量の最大注入量は、推定標的腫瘍容積の約3分の1である。単回用量は、約1週間、一日おきに投与される。このサイクル後、次のサイクルは、約1週間後に開始され得る。治療計画は3サイクルを含み、各サイクルは約1週間隔を開けてもよい。

40

【0123】

さらに別の特定の実施形態において、VB4-845などの免疫複合体は、約280マイクログラム／腫瘍／日の用量で投与され、患者は1日あたりの単回用量を投与される。単回用量の最大注入量は、推定標的腫瘍容積の約3分の1である。単回用量は、約3週間、一日おきに投与される。このサイクル後、次のサイクルは、約1週間後に開始され得る。治療計画は3サイクルを含み、各サイクルは約1週間隔を開けてもよい。

50

【0124】

腹腔などの空洞への投与については、免疫複合体の有効用量は、50mlに約100～2000マイクログラム／週、例えば、50mlに約100、200、335、500、700、930、1240マイクログラム／週であり、患者は1週あたりの単回用量を投与され、腫瘍組織は、少なくとも約30分間、免疫複合体に暴露される。例えば、溶液は約30分～3時間腔内に保持される。特定の非限定的な実施形態において、腫瘍組織は、約1時間以上、より好ましくは、約2時間、免疫複合体に曝露される。このサイクル後、次のサイクルは、前回投与後約1、2、4、6、または12週目に開始され得る。治療計画は、1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、4、6、または12ヶ月間隔を開けてもよい。

10

【0125】

免疫複合体の投与量はまた、癌細胞上のタンパク質の結合部位のモル濃度として表すこともできる。例えば、免疫複合体VB4-845は、約69.7kDaの分子量、およびEp-CAMの1つの結合部位を有する。二価フォーマット、Fab、Fab1'または(Fab1')₂断片などの他の免疫複合体形式が、ポリペプチド鎖（複数可）の中のアミノ酸の数によって異なる分子量を有し得ることは知られている。また、同様の形式のために、糖部分などのポリペプチドまたはポリエチレングリコールに追加の基を結合することによって分子量を変化させることができることも知られている。別の毒素または毒素の異なる変異体の使用はまた、実施例で使用したVB4-845とは異なる分子量を有する免疫複合体をもたらす得る。さらに、より長いまたはより短い断片をもたらすポリペプチド鎖への変更は、癌細胞上の選択されたタンパク質への免疫複合体の結合を失うことなく行うこともできる。全てのこれらの変形は、本出願において企図される。結果として、癌細胞上のタンパク質の結合部位のモル数に関して免疫複合体の投与量を示すことは、有用であり得る。実施例および様々な実施形態において、投与量は、マイクログラムで表され、VB4-845の分子量に基づく。

20

【0126】

サイクルの間に免疫複合体と共に投与される別の抗癌剤の有効用量も、投与の様式に応じて変化する。1つまたは複数の抗癌剤は、腫瘍内に、または他の投与様式によって送達されてもよい。典型的には、化学療法剤は全身に投与される。標準的な投与量および治療計画は当技術分野で公知である（例えば、メルクインデックスの最新版および医師用卓上参考書を参照されたい）。

30

【0127】

例えば、一実施形態において、追加の抗癌剤は、約200～4000mg/m²/サイクルの範囲の用量でダカルバジンを含む。好ましい実施形態において、用量は、700～1000mg/m²/サイクルの範囲である。

【0128】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約25～50mg/m²/サイクルの範囲の用量でフルダリンを含む。

【0129】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約200～2000mg/m²/サイクルの範囲の用量でシトシンアラビノシド（Ara-C）を含む。

40

【0130】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約1.5～7.5mg/kg/サイクルの範囲の用量でドセタキセルを含む。

【0131】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約5～15mg/kg/サイクルの範囲の用量でパクリタキセルを含む。

【0132】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約5～20mg/kg/サイクルの範囲の用量でシスプラチンを含む。

50

【0133】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 2 mg/kg ～ 約 20 mg/kg 、約 2 mg/kg ～ 約 18 mg/kg 、約 2 mg/kg ～ 約 16 mg/kg 、約 2 mg/kg ～ 約 14 mg/kg 、約 2 mg/kg ～ 約 12 mg/kg 、約 2 mg/kg ～ 約 10 mg/kg 、約 2 mg/kg ～ 約 8 mg/kg 、約 2 mg/kg ～ 約 6 mg/kg 、または約 2 mg/kg ～ 約 4 mg/kg の範囲の用量で5-フルオロウラシルを含む。抗癌剤は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または30日間連続して毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は、1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは、約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。いくつかの実施形態において、5-FUは、前の治療コースの最後の日から30日ごとに、最初のサイクルの投薬を繰り返すメンテナンス療法の中に含まれてよい。

10

【0134】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $2 \sim 8 \text{ mg/kg}$ / サイクルの範囲の用量でドキソルビシンを含む。

【0135】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $40 \sim 160 \text{ mg/kg}$ / サイクルの範囲の用量でエピドフィロトキシンを含む。

【0136】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $50 \sim 200 \text{ mg/kg}$ / サイクルの範囲の用量でシクロホスファミドを含む。

20

【0137】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $50 \sim 75$ 、 $75 \sim 100$ 、 $100 \sim 125$ 、または $125 \sim 150 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でイリノテカンを含む。

【0138】

さらに別の実施形態において、抗癌剤は、約 $3.7 \sim 5.4$ 、 $5.5 \sim 7.4$ 、 $7.5 \sim 11$ 、または $11 \sim 18.5 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でビンブラスチンを含む。

【0139】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $0.7 \sim 1.4$ 、または $1.5 \sim 2 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でビンクリスチンを含む。

30

【0140】

さらに別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $3.3 \sim 5$ 、 $5 \sim 10$ 、 $10 \sim 100$ 、または $100 \sim 1000 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でメトトレキサートを含む。

【0141】

上述の実施形態において、抗癌剤は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21日間連続して毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は、1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてもよい。

40

【0142】

免疫複合体との併用療法は、追加の抗癌剤の投与に対して癌または腫瘍を感作させ得る。したがって、本発明は、癌の予防、治療、および/または癌の再発の予防のための併用療法であって、用量が低減された抗癌剤の前、その後、またはそれと同時に有効量の免疫複合体を投与することを含む併用療法を企図する。例えば、免疫複合体により初期治療は、抗癌剤の投与によるその後の負荷に対する癌または腫瘍の感受性を増大できる。抗癌剤が単独で、または免疫複合体の不存在下で投与される場合には、この用量は標準的な投与量下限に近い、またはそれ未満である。同時に投与される場合は、免疫複合体は抗癌剤

50

とは別に投与され、かつ必要に応じて、異なる投与様式により投与されてもよい。

【0143】

いくつかの実施形態において、以下のVB4-845および5-フルオロウラシル（5-FU）の組み合わせが投与され得る：

VB4-845	5-FU
2500 µg/日	20 mg/kg/日
2500 µg/日	15 mg/kg/日
2500 µg/日	10 mg/kg/日
2500 µg/日	6 mg/kg/日
2500 µg/日	4 mg/kg/日
2500 µg/日	2 mg/kg/日

10

VB4-845および5-FUの組み合わせは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21日間連続して毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は、1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは、約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてよい。

20

【0144】

いくつかの実施形態において、以下のVB4-845および5-フルオロウラシル（5-FU）の組み合わせが投与され得る：

VB4-845	5-FU
2500 µg/日	20 mg/kg/日
2000 µg/日	20 mg/kg/日
1500 µg/日	20 mg/kg/日
1000 µg/日	20 mg/kg/日
500 µg/日	20 mg/kg/日
250 µg/日	20 mg/kg/日

30

VB4-845および5-FUの組み合わせは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21日間連続して毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は、1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは、約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてよい。

【0145】

いくつかの実施形態において、以下のVB4-845および5-フルオロウラシル（5-FU）の組み合わせが投与され得る：

40

VB4-845	5-FU
100~2500 µg/日	20 mg/kg/日
100~2500 µg/日	15 mg/kg/日
100~2500 µg/日	10 mg/kg/日
100~2500 µg/日	6 mg/kg/日
100~2500 µg/日	4 mg/kg/日
100~2500 µg/日	2 mg/kg/日

10

VB4-845および5-FUの組み合わせは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21日間連続して毎日投与され得る。このサイクル後、次のサイクルは、約1、2、3、4、5、または6週後に開始され得る。治療計画は、1、2、3、4、5、または6サイクルを含み、各サイクルは、約1、2、3、4、5、または6週間隔を開けてよい。

【0146】

したがって、一実施形態において、追加の抗癌剤は、約5~10、11~20、21~40、または41~75 mg/m²/サイクルの範囲の用量でシスプラチン、例えば、プラチノールまたはプラチノール-AQ (Bristol Myers 社) を含む。

20

【0147】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約2~3、4~8、9~16、17~35、または36~75 mg/m²/サイクルの範囲の用量でカルボプラチン、例えば、パラプラチン (Bristol Myers 社) を含む。

【0148】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約0.25~0.5、0.6~0.9、1~2、3~5、6~10、11~20、または21~40 mg/kg/サイクルの範囲の用量でシクロホスファミド、例えば、シトキサン (Bristol Myers Squibb 社) を含む。

【0149】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約0.5~1、2~4、5~10、11~25、26~50、または51~100 mg/m²/サイクルの範囲の用量でシタラビン、例えば、サイトサル (CYTOSAR-U) (Pharmacia & Upjohn 社) を含む。別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約5~50 mg/m²/サイクルの範囲の用量で、シタラビンリポソーム、例えば、デポサイト (DEPOCYT) (Chiron 社) を含む。

30

【0150】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約15~250 mg/m²/サイクルの範囲または約0.2~2 mg/kg/サイクルの範囲の用量で、ダカルバジン、例えば、DTICまたはDTICDOME (Bayer 社) を含む。

40

【0151】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約0.1~0.2、0.3~0.4、0.5~0.8、または0.9~1.5 mg/m²/サイクルの範囲の用量でトポテカン、例えば、ハイカムチン (SmithKline Beecham 社) を含む。

【0152】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約5~9、10~25、または26~50 mg/m²/サイクルの範囲の用量でイリノテカン、例えば、カンプトサル (Pharmacia & Upjohn 社) を含む。

【0153】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約2.5~5、6~10、11~15、また

50

は $16 \sim 25 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でフルダラビン、例えば、フルダラ（Berlex Laboratories 社）を含む。

【0154】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $200 \sim 2000 \text{ mg/m}^2$ / サイクル、 $300 \sim 1000 \text{ mg/m}^2$ / サイクル、 $400 \sim 800 \text{ mg/m}^2$ / サイクル、または $500 \sim 700 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でシトシンアラビノシド（Ara-C）を含む。

【0155】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、 $6 \sim 10$ 、 $11 \sim 30$ 、または $31 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でドセタキセル、例えば、タキソテール（Rhône Poulenc Rorer 社）を含む。

10

【0156】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $10 \sim 20$ 、 $21 \sim 40$ 、 $41 \sim 70$ 、または $71 \sim 135 \text{ mg/kg}$ / サイクルの範囲の用量でパクリタキセル、例えば、タキソール（Bristol Myers Squibb 社）を含む。

【0157】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $0.5 \sim 5 \text{ mg/kg}$ / サイクル、 $1 \sim 4 \text{ mg/kg}$ / サイクル、または $2 \sim 3 \text{ mg/kg}$ / サイクルの範囲の用量で、5-フルオロウラシルを含む。

【0158】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $2 \sim 4$ 、 $5 \sim 8$ 、 $9 \sim 15$ 、 $16 \sim 30$ 、または $31 \sim 60 \text{ mg/kg}$ / サイクルの範囲の用量でドキソルビシン、例えば、アドリアマイシン（Pharmacia & Upjohn 社）、ドキシル（Alza 社）、ルベックス（Bristol Myers Squibb 社）を含む。

20

【0159】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $3.5 \sim 7$ 、 $8 \sim 15$ 、 $16 \sim 25$ 、または $26 \sim 50 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でエトポシド、例えば、ベペシド（Pharmacia & Upjohn 社）を含む。

【0160】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $0.3 \sim 0.5$ 、 $0.6 \sim 0.9$ 、 $1 \sim 2$ 、または $3 \sim 3.6 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でビンブラスチン、例えば、ベルバン（Eli Lilly 社）を含む。

30

【0161】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.6 または 0.7 mg/m^2 / サイクルの範囲の用量でピンクリスチン、例えば、オンコビン（Eli Lilly 社）を含む。

【0162】

別の実施形態において、追加の抗癌剤は、約 $0.2 \sim 0.9$ 、 $1 \sim 5$ 、 $6 \sim 10$ 、または $11 \sim 20 \text{ mg/m}^2$ / サイクルの範囲の用量でメトトレキサートをを含む。

【0163】

別の実施形態において、免疫複合体は、限定されないが、リツキサン、リツキシマブ、キャンパス-1、ゲムツズマブ、およびトラツズマブを含む少なくとも1つの他の免疫治療薬と組み合わせて投与される。

40

【0164】

別の実施形態において、免疫複合体は、限定されないが、アンジオスタチン、サリドマイド、クリングル5、エンドスタチン、セルピン（セリンプロテアーゼ阻害剤）、抗トロニンビン、フィブロネクチンの 29 kDa のN末端および 40 kDa のC末端タンパク質分解断片、プロラクチンの 16 kDa のタンパク質分解断片、血小板因子-4の 7.8 kDa のタンパク質分解断片、血小板因子-4の断片に対応する13アミノ酸ペプチド、コラーゲンIの断片に対応する14アミノ酸ペプチド、トロンボスポンジンIの断片に対応す

50

る19アミノ酸ペプチド、SPARCの断片に対応する20アミノ酸ペプチド、およびその変異体を含み、その薬学的に許容される塩を含む1つまたは複数の抗血管新生剤と組み合わせて投与される。

【0165】

別の実施形態において、免疫複合体は、限定されないが、リンフォカイン、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子様サイトカイン、リンホトキシン、インターフェロン、マクロファージ炎症性タンパク質、顆粒球単球コロニー刺激因子、インターロイキン（限定されないが、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-6、インターロイキン-12、インターロイキン-15、インターロイキン-18を含む）、およびその変異体を含み、その薬学的に許容される塩を含む1つまたは複数のサイトカインと組み合わせて投与される。

10

【0166】

さらに別の実施形態において、免疫複合体は、限定されないが、自己細胞または組織、非自己細胞または組織、癌胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、BCG生ワクチン、メラニン細胞系統タンパク質、および腫瘍特異的変異抗原を含む癌ワクチンと組み合わせて投与される。

【0167】

さらに別の実施形態において、免疫複合体は、ホルモン療法と関連して投与される。ホルモン治療薬には、限定されないが、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト（例えば、フルタミド、タモキシフェン、酢酸ロイプロリド（LUPRON））、およびステロイド（例えば、デキサメタゾン、レチノイド、ベタメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステン）が含まれる。

20

【0168】

さらに別の実施形態において、免疫複合体は、癌を治療または予防するための遺伝子治療プログラムと関連して投与される。

【0169】

さらに別の実施形態において、Ep-CAM標的免疫複合体は、興味腫瘍細胞においてEp-CAM発現を増加させる1つまたは複数の薬剤と組み合わせて投与される。Ep-CAMの発現は、好ましくは、より多数のEp-CAM分子が腫瘍細胞表面上に発現するように増加される。例えば、この薬剤は、Ep-CAM抗原エンドサイトーシスの通常のサイクルを阻害し得る。このような併用治療は、単独で、または他の抗癌剤もしくは放射線療法と共にEp-CAM標的免疫複合体の臨床的有効性を改善し得る。特定の非限定的な実施形態において、腫瘍細胞内でEp-CAM発現を増加させる薬剤は、酒石酸ビンレルビン（ナベルピン）および／またはパクリタキセル（タキソール）である。

30

【0170】

したがって、併用療法は、投与される免疫複合体および／もしくは追加の抗癌剤に対する癌または腫瘍の感受性を増大させ得る。このように、より短い治療サイクルが可能になることにより、毒性事象を減少させることができる。したがって、本発明は癌を治療または予防するための方法であって、短い治療サイクルの間、有効量の免疫複合体および少なくとも1つの他の抗癌剤を、それを必要とする患者に投与することを含む方法を提供すること。サイクル期間は、約1～30、2～27、3～15、4～12、5～9、または6～8日の範囲であり得る。サイクル期間は、使用する特定の抗癌剤に応じて変化してよい。本発明はまた、連続もしくは不連続投与、またはいくつかの部分投与に分割した1日用量も企図する。特定の抗癌剤のための適切なサイクル期間は当業者によって理解され、本発明は、各抗癌剤に最適な治療スケジュールの継続的な評価を企図する。当業者のための具体的な指針は、当技術分野で公知である。

40

【0171】

あるいは、より長い治療サイクルが望ましい場合がある。したがって、サイクル期間は、約10～56、12～48、14～28、16～24、または18～20日の範囲であ

50

り得る。サイクル期間は、使用する特定の抗癌剤に応じて変化してよい。

【0172】

本発明は、単一の抗癌剤または一連の薬剤が投与される間、少なくとも1サイクル、好ましくは複数のサイクルを企図する。適切な全サイクル数、およびサイクル間の間隔は、当業者によって理解されるであろう。サイクル数は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21サイクルであってよい。サイクル間の間隔は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21日であってよい。本発明は、それぞれの免疫複合体および追加の抗癌剤に最適な治療スケジュールの継続的な評価を企図する。

10

【0173】

本発明の非限定的な一実施形態において、免疫複合体は、より短い期間、高用量（例えば、約100、200、300、400、500、または1000マイクログラム／ cm^3 より高くなる用量）で直接投与される。したがって、1つの非限定的な、具体的な実施態様において、免疫複合体は、少なくとも約200、300、400、または500マイクログラム／ cm^3 の免疫複合体の腫瘍内濃度をもたらす用量で週に1回、2週間腫瘍内に投与される。

【0174】

本発明による免疫複合体は、医薬組成物または医薬品に含まれ得る。直接投与に適合する医薬組成物には、限定されないが、凍結乾燥粉末または水性もしくは非水性の滅菌注射溶液または水性もしくは非水性の懸濁液が含まれ、この組成物を意図されるレシピエントの血液と実質的に等張にさせる抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および溶質をさらに含んでもよい。そのような組成物中に存在し得る他の成分には、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリンおよび植物油が含まれる。即席の注射溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製できる。免疫複合体は、例えば、限定されないが、患者への投与の前に滅菌水または生理食塩水で再構成される凍結乾燥粉末として供給されてもよい。

20

【0175】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含んでよい。適切な薬学的に許容される担体には、医薬組成物の生物活性の有効性を妨げない本質的に化学的に不活性かつ非毒性の組成物が含まれる。好適な医薬担体の例としては、水、生理食塩水、グリセロール溶液、エタノール、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、ジオレシルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、およびリポソームが挙げられるが、これらに限定されない。このような組成物は、患者への直接投与のための形態を提供するために、適切な量の担体と共に、治療有効量の化合物を含まなければならない。

30

【0176】

別の実施形態において、医薬組成物は、必要に応じて、薬学的に許容される担体中に、免疫複合体および1つまたは複数の追加の抗癌剤を含む。

【0177】

本組成物は、限定されないが、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるものなどの遊離アミノ基で形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどの遊離カルボキシル基で形成されるものを含む薬学的に許容される塩の形態であり得る。

40

【0178】

本発明の様々な実施形態において、医薬組成物は、例えば、手術中の局所注入、（例えば、外科手術後の創傷包帯と併せた）局所適用、注射、カテーテルの手段、坐薬の手段、またはインプラントの手段によって腫瘍（複数可）の領域に直接投与される。インプラントは、シラスティック膜、または繊維などの膜を含む多孔性、非多孔性、またはゼラチン状の材料であり得る。坐剤は、一般的に、0.5重量%～10重量%の範囲の有効成分を

50

含む。

【0179】

他の実施形態において、放出制御システムを標的腫瘍の近傍に配置できる。例えば、マイクロポンプで腫瘍の領域に制御された用量を直接送達することにより、医薬組成物のタイミングおよび濃度を細かく調節できる。

【0180】

本発明の一態様によれば、免疫複合体および／または他の抗癌剤は、直接投与によって患者に送達される。したがって、免疫複合体および／または他の抗癌剤は、限定されないが、腫瘍への1回または複数回の直接注射によって、腫瘍への連続的または不連続な灌流によって、免疫複合体の貯蔵庫の導入により、腫瘍への徐放器具の導入により、腫瘍への徐放製剤の導入により、および／または腫瘍への直接適用により投与され得る。腫瘍内への投与様式により、腫瘍の領域、または腫瘍の領域に実質的に直接流入する血管もしくはリンパ管への免疫複合体および／または他の抗癌剤の導入も企図される。それぞれの場合において、医薬組成物は、少なくともエンドポイントを達成するのに十分な量で投与され、必要に応じて、薬学的に許容される担体を含む。

【0181】

免疫複合体は腫瘍内に投与され得るが、任意の他の抗癌剤は、他の投与様式（例えば、静脈内）によって患者に送達され得ることが企図される。さらに、多数の抗癌剤が患者に送達されることが意図される場合は、免疫複合体および他の抗癌剤のうちの1つまたは複数は腫瘍内に送達され得るが、他の抗癌剤は他の投与様式（例えば、静脈内および経口）によって送達され得る。

【0182】

いくつかの実施形態において、薬学的担体は、限定されないが、結合剤、コーティング、崩壊剤、充填剤、希釈剤、香料、着色剤、潤滑剤、流動促進剤、防腐剤、吸着剤、甘味料、共役リノール酸（CLA）、ゼラチン、ミツロウ、精製水、グリセリン、または限定されないが、魚油もしくは大豆油を含む任意の種類の油などを含み得る。ペプチド／化合物の医薬組成物はまた、適切な固相もしくはゲル相の担体または固相もしくはゲル相の賦形剤も含み得る。このような担体または賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0183】

本発明の免疫複合体は、それらが活性である任意の経路によって従来の方法で投与できる。投与は、全身、局所、または経口投与であり得る。例えば、投与は、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、経口、口腔内、もしくは眼内の経路、または腔内投与、吸入によって、デポー注射によって、またはインプラントによって投与され得るが、これらに限定されない。したがって、本発明のペプチド／化合物のための（単独、または他の医薬品と組み合わせた）投与形態は、舌下、（皮下または筋肉内に注射される短期作用型、デポー、インプラントおよびベレットの形態を含む）注射、または腔クリーム、坐剤、ペッサリー、腔リング、直腸坐剤、子宮内デバイス、ならびにパッチおよびクリームなどの経皮形態の使用によるものであり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、免疫複合体の投与は、癌部位への直接投与であり得る。

【0184】

経口投与の場合には、免疫複合体は、当技術分野で周知の薬学的に許容される担体とこれらの免疫複合体を組み合わせるによって容易に製剤化できる。このような担体は、本発明の免疫複合体が、治療される患者による経口摂取のための錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、および懸濁液などとして製剤化されるのを可能にする。経口使用のための医薬製剤は、必要に応じて、錠剤または糖衣錠コアを得るために、適切な助剤を添加した後に、固体賦形剤を添加し、必要に応じて、得られた混合物を粉碎し、顆粒の混合物を処理することにより取得できる。適切な賦形剤には、ラクトース、スクロース、マンニトール、およびソルビトールを含むが、これらに限定されない

糖などの充填剤；トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、およびポリビニルピロリドン（PVP）などのセルロース調製物が含まれるが、これらに限定されない。所望の場合、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤が添加され得るが、これらに限定されない。

【0185】

糖衣錠コアは、適切なコーティングで提供され得る。この目的のために、必要に応じて、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および／もしくは二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を含み得る濃縮糖溶液が使用され得る。染料または色素は、識別のために錠剤または糖衣錠コーティングに添加され得るか、または活性ペプチド／化合物用量の異なる組み合わせを特徴付けるために添加され得る。

10

【0186】

経口使用できる医薬品には、ゼラチン製の押し込み型カプセル、ならびにグリセロールまたはソルビトールなどのゼラチンおよび可塑剤で作られた密封軟カプセル剤が含まれるが、これらに限定されない。押し込み型カプセルは、例えば、ラクトースなどの充填剤、例えば、デンプンなどの結合剤、および／または、例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、ならびに必要に応じて、安定剤と混合した有効成分を含み得る。軟カプセルでは、活性ペプチド／化合物は、脂肪油、液体パラフィン、もしくは液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤が添加され得る。経口投与用の全ての製剤は、このような投与に適した投与量でなければならない。

20

【0187】

口腔投与の場合には、本組成物は、例えば、従来の方法で製剤化された錠剤またはロゼンジの形態をとることができる。

【0188】

吸入による投与の場合には、本発明に従って使用するための組成物は、適切な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素もしくは他の適切なガスを使用して、加圧パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーの提示形態で都合よく送達される。加圧エアロゾルの場合には、用量単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定できる。ペプチド／化合物の粉末混合物およびラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤を含む、例えば、吸入器または注入器で使用するためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジが製剤化できる。

30

【0189】

本発明の組成物はまた、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を含有する坐剤または停留浣腸などの直腸用組成物にも製剤化できる。

【0190】

前述の製剤に加えて、本発明の組成物はまた、デポー製剤としても製剤化できる。このような長期作用製剤は、移植によって（例えば、皮下もしくは筋肉内に）または筋肉内注射によって投与できる。

40

【0191】

デポー注射は、約1～約6ヶ月またはそれより長い間隔で投与できる。したがって、例えば、ペプチド／化合物は、（例えば、許容される油中のエマルジョンとしての）適切なポリマーまたは疎水性材料もしくはイオン交換樹脂で、または難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として製剤化できる。

【0192】

経皮投与では、本発明の組成物は、例えば、石膏に適用できるか、または結果として生物に供給される経皮治療システムによって適用できる。

50

【0193】

本発明の組成物はまた、例えば、アジュバント、プロテアーゼ阻害剤、または他の適合性の薬剤もしくは化合物などの他の有効成分と組み合わせて投与でき、そのような組み合わせが、本明細書に記載の方法の所望の効果を達成するのに望ましいまたは有利であると考えられる。

【0194】

いくつかの実施形態において、崩壊剤成分は、クロスカルメロースナトリウム、カルメロースカルシウム、クロスポビドン、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸カルシウム、イオン交換樹脂、食物の酸性およびアルカリ性炭酸成分に基づく発泡系、クレー、タルク、デンプン、アルファ化デンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、セルロースフロック、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ケイ酸カルシウム、金属炭酸塩、重炭酸ナトリウム、クエン酸カルシウム、またはリン酸カルシウムのうちの1つまたは複数を含む。

10

【0195】

いくつかの実施形態において、希釈剤成分は、マンニトール、ラクトース、スクロース、マルトデキストリン、ソルビトール、キシリトール、粉末セルロース、微結晶性セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、アルファ化デンプン、リン酸カルシウム、金属炭酸塩、金属酸化物、または金属アルミノケイ酸塩のうちの1つまたは複数を含む。

20

【0196】

いくつかの実施形態において、任意の潤滑剤成分は、存在する場合、ステアリン酸、金属ステアレート、ステアリルフマル酸ナトリウム、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、ベヘン酸グリセリル、鉱物油、植物油、パラフィン、ロイシン、シリカ、ケイ酸、タルク、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリアルキレングリコール、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、ポリエトキシ化ステロール、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリエトキシ化植物油、または塩化ナトリウムのうちの1つまたは複数を含む。

30

【実施例】

【0197】

実施例1：VB4-845の構築

VB4-845は、シュードモナス外毒素A（ETA 252-608）の切断型に融合されている一本鎖Fv組換えヒト抗体断片で構成された免疫複合体である。この抗体断片は、Ep-CAMに特異的に結合するヒト化MOC31一本鎖抗体断片の4D5MOCBに由来する。

【0198】

外毒素Aは、緑膿菌の病原性株によって放出される毒性タンパク質の1種である。外毒素Aは、66,000ダルトンの分子量を有するプロ酵素として分泌される。外毒素Aは感受性哺乳動物細胞内に移行し、分子の共有改変により酵素的に活性化される。シュードモナス外毒素Aは、ジフタミドと呼ばれる伸長因子-2の翻訳後修飾されたヒスチジン残基をアデノシン二リン酸-リボシル化することにより細胞内でタンパク質合成を不可逆的に阻止し、アポトーシスを誘導する。この構築物に使用されるETAの切断型は、細胞死を誘導するドメインを依然として含むが、細胞結合ドメインを欠いており、それによって、免疫複合体の抗体部分による標的化を欠く細胞にETA部分が入るのを阻止する。

40

【0199】

ETA（ETA 252-608）の切断型をコードする遺伝子配列、およびEp-CAMに結合する4D5MOCBのscFv配列を用いて、VB4-845を構築した。分子は、図1に示すように、精製のためにN末端およびC末端の両方にHis6テールを含む。VB4-845のDNA配列およびアミノ酸配列を、図2ならびに配列番号3および2

50

に示す。E p - C A M結合部分を図 2 に示す。C D R配列を配列番号 4 ～ 9 に示す。

【0200】

得られたタンパク質は、E p - C A Mに対する親 4 D 5 M O C Bの特異性を保持する。タンパク質用の発現ベクター p I N G 3 3 0 2 (X o m a I r e l a n d社のプラスミド p I N G 3 3 0 2を発現ベクターの構築のために使用した)は、E 1 0 4大腸菌宿主株によって保有および発現される。このタンパク質は、6 4 8アミノ酸長であり、6 9 . 7キロダルトン (k D a)の予測分子量を有する。S D S - P A G E (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)分析では、V B 4 - 8 4 5は約 7 0 k D aの単一タンパク質バンドとして観察される。このタンパク質は、約 5 . 9の等電点 (p I)を有し、水溶性で、透明な溶液を形成する。

10

【0201】

実施例 2 : 投与量および製剤

V B 4 - 8 4 5は、新生薬剤として研究されており、腫瘍細胞株への結合に有効であり、いくつかのモデル系において腫瘍の増殖を防止するのに有効であることが見出された。V B 4 - 8 4 5は、2 0 m M リン酸ナトリウム、5 0 0 m M N a C l、p H 7 . 2 に 1 m g / m lで製剤化され、2 2ゲージ針を用いて腫瘍内経路によって投与できる。V B 4 - 8 4 5は、灰色のブチル栓およびアルミニウムのオーバーシールで閉じられた 1 m lのハウケイ酸ガラスバイアルにパッケージされる。現在、2つのフィルサイズが利用できる: 0 . 1 および 0 . 2 m L (それぞれ 0 . 1 m g および 0 . 2 m g の V B 4 - 8 4 5)。この薬物は - 7 0 ° Cで保存される。最終生成物は保存されず、使い捨てである。

20

【0202】

実施例 3 : V B 4 - 8 4 5の安定性

試料生成物は、記入および承認された標準操作手順に従って標識、貯蔵、および出荷される。生成物は凍結状態 (例えば、ドライアイス上) で出荷され、温度が定期的に監視され、アクセスが限られている制御された - 7 0 ° Cのフリーザーの中で研究場所にて維持され得る。この生成物は、使用時までこの状態で維持され得る。

【0203】

- 7 0 ° Cで保存される場合、生成物の貯蔵寿命は少なくとも 6 ヶ月である。生理的条件下 (例えば、3 7 ° Cで 4 時間、P B S中での薬品のインキュベーション) で、免疫複合体分子の大部分 (少なくとも 9 1 %) は、依然として適切な分子量 (約 7 0 k D a) の単量体として溶出される。V B 4 - 8 4 5の量は、ゆっくりと時間とともに減少し、3 7 ° Cで 2 0 時間後、初期タンパク質の約 4 7 % 以上が単量体型で存在する。同様の結果が、ヒト血清中の 9 9 m T c 標識 V B 4 - 8 4 5のインキュベーション時に得られ、さらにインビボアプリケーションのための免疫複合体の適合性を裏付ける。

30

【0204】

短期安定性研究を行い、臨床現場で日常的取り扱いの下で治験薬の固有の安定性を評価した。その標準製剤中の V B 4 - 8 4 5を室温および 2 ~ 8 ° Cで評価した。さらに、V B 4 - 8 4 5を、8 0 0 m Mの尿素を含む場合と含まない場合のリン酸緩衝生理食塩水の注入緩衝液で調製し、室温で 6 時間まで試験した。短期安定性研究はまた、V B 4 - 8 4 5に対する凍結融解サイクルの繰り返しの影響も評価した。

40

【0205】

V B 4 - 8 4 5は、全ての短期安定性研究の間にその生物活性を保持することが見出された。V B 4 - 8 4 5は、投与日に - 7 0 ° Cの冷凍庫から取り出され、室温で解凍され得る。V B 4 - 8 4 5は、- 7 0 ° Cの貯蔵条件から取り出された後 4 ~ 6 時間で注入緩衝液中に調製され得る。この生成物は、リン酸緩衝生理食塩水の注入緩衝液中で製剤化されると、調製後 6 時間以内に患者に注入され得る。この生成物が適切な時間内に使用できない場合は、新しいバイアルが投薬の全リストから取得され得る。

【0206】

V B 4 - 8 4 5は、室温では少なくとも 2 0 時間、冷蔵保存 (例えば、2 ~ 8 ° C) では少なくとも 2 4 時間、元のパッケージ内で安定している。生成物が使用されない場合、特

50

に元の容器／閉鎖系が無傷である場合には、後の使用のために再凍結できる。

【0207】

ヒトの血漿、血清および尿を含む生体液中での短期安定性試験（最大16時間のインキュベーション時間）により、VB4-845がその結合特性および細胞毒性を少なくとも16時間保持することが実証された。

【0208】

実施例4：生体内分布

一般的に文献には、scFvが、動物モデルにおいて循環から急速にクリアされ、早期の時点で高い腫瘍対バックグラウンド比（腫瘍塊内の特定の保持率）を与えると示されている。T1/2は平均で2～4時間であるが、分子の構造および投与経路に依存してより長く（>8時間）なり得る。最高の取り込みは、分子に依存して、全身注入後に腎臓および肝臓で生じる傾向にある。

【0209】

VB4-845の体内分布を、樹立したEp-CAM陽性SW2およびEp-CAM陰性COLO320異種移植片を反対側面に有するマウスで評価した。SW2腫瘍で検出された放射性標識VB4-845の最大用量は、4時間後に2.93% ID/gであり、その後、24および48時間後にそれぞれ、1.95% ID/gおよび1.13% ID/gまで徐々に減少した。対照的に、COLO320対照腫瘍におけるVB4-845は、30分後に1.65% ID/gの最大用量で局在化しており、次いで、4時間後には1.06% ID/gまで急速に減少し、48時間後にはバックグラウンドレベルのみを示した。

【0210】

VB4-845は、親scFvよりも遅い血液クリアランスを示した。24時間後、血液中のVB4-845の総用量は0.42% ID/gであり、親のscFv（0.28% ID/g）を1.5倍上回っていた。さらに、SW2腫瘍における免疫複合体の局在化はまた、親scFvに比べて遅れており、VB4-845の分布は48時間後に5.38の腫瘍血液比を示し、24時間後にscFvで得られた比率に匹敵していた。各時点で、VB4-845は、COLO320対照腫瘍と比較してEp-CAM陽性SW2腫瘍に優先的に蓄積し、SW2：COLO320比は1.28～2.95で変化する。これは、VB4-845が、特定の抗体－抗原相互作用および細胞内取り込みにより、Ep-CAM陽性腫瘍内に保持されたことを示す。COLO320対照腫瘍におけるわずかな蓄積は、腫瘍で見られる場合が多い血管透過性の増加に起因し得る。これらの動物における正常組織の分析により、VB4-845が腎臓、脾臓、肝臓に局在し、より低い程度で骨に局在することも示された。

【0211】

マウスモデルにおける薬物動態および有効性の分析中に行った臨床観察は、毒性を示す臨床徴候はなく、生成物が十分に耐容性であることを示す。全ての動物は、研究の間生きており、薬剤関連死はなかった。

【0212】

実施例5：VB4-845の調製

VB4-845（4D5MOCB-ETAとも呼ばれる）発現ベクターの構築

ETA（ETA252-608）の切断型をコードする配列を、プラスミドpSW200からPCRにより増幅し、pIG6ベース4D5MOCB scFv発現ベクターに存在するEp-CAM結合4D5MOCB scFv配列の下流に1164塩基対のEcoRI-HindIII断片としてクローニングした。プライマー（Tox1：CTCGGAATTTCGGTGGCGCGCCGGAGTTCCCGAAACCGTCCACCCCGCCGGGGTTCTTCTTGTTTAA（配列番号10）；Tox2：GTCAAGCTTCTACAGTTTCGTCTTTATGGTGAATGGTGGTGAATGCGGCGGTTTTCCCGGGCTG（配列番号11）を、scFvと毒素とC末端ヘキサヒスチジンタグの間のEcoRI制限部位に導入し、その後、小胞体（ER）保持シグナルKDEL、終止コドンおよびHindIII制限部位が続く。IMACにおける純度および

収率を改善するために、第2のヘキサヒスチジンタグを、ペリプラズムシグナル配列と4D5MOCBコード領域の間のN末端に付加した。この目的のために、2つのオリゴヌクレオチド対 (XbaI 5': CTAGATAACGAGGGCAAAAAAATGAAA
AAGACAGCTATTCGCGATTGTCAGTGGCACTGGCTG-GTTTTC
GCTACCGT (配列番号12); XbaI 3': GCCACTGC AATCGCG
ATAGCTGTCTTTTTCATTTTTCGCTTAT (配列番号13)
); および EcoRV 5': AGCGCAGGCGGACCAACCATCATCACCA
TCACGAT (配列番号14); EcoRV 3': ATCGTGTATGGTGTATGA
TGGTGGTCGGCCTGCGCTACGGTAGCGAAACCAAGCCAGT (配列番号15) を80℃まで加熱し、徐々に室温まで冷却することによりアニーリングさせ、次いで、pIG6-4D5MOCB-ETHA6KDELのXbaIとEcoRVの間の部位にライゲーションした。配列を実験で確認した。

10

【0213】

VB4-845のペリプラズム発現については、ペリプラズムプロテアーゼHhoAおよびHhoBを欠く大腸菌株SB536のlacプロモーター制御下に遺伝子を配置しているベクターpIG6を用いた。アンピシリン (100mg/mL) を含む5mLの2YT培地にVB4-845 (4D5MOCB-ETA) 発現プラスミドを含む単一細菌コロニーを接種し、25℃で一晩増殖させた。0.5%グルコースおよびアンピシリン (100mg/mL) を補充した2YT培地1リットルで細菌を希釈し、A550nmが0.1~0.2に到達すると、3リットルのバッフル付き振盪フラスコに移した。A550nmが0.5になるまで、培養物をさらに25℃で増殖させ、最終濃度1mMのイソプロピル-b-D-チオガラクトピラノシド (IPTG、Sigma社) を添加することにより、免疫複合体産生を4時間誘導した。最終のA550nmが6である細菌培養物由来の収集ペレットを-80℃で保存した。

20

【0214】

精製については、1リットルの培養物から得られたペレットを、50mM トリス-HCl (pH7.5)、300mM NaCl、2mM MgSO₄を含み、EDTAを含まないプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Diagnostics社、マンハイム、ドイツ) およびDNアーゼIを補った25mLの溶解緩衝液に再懸濁した。細菌懸濁液をフレンチ圧力セルプレス (SLS Instruments社、アーバナ) で、2サイクルで溶解し、4℃で30分間、SS-34ローター中で48,000×gで遠心分離し、その後、濾過滅菌した。透明な上清に存在する免疫複合体を、直列に接続されたNi²⁺-イミノ二酢酸 (IDA) カラムとHQ/M-陰イオン交換カラムを有するBIOCAD-システム (Perseptive Biosystems社) を使用して、記載されるようにクロマグラフィーにより精製した。溶解液を添加する前に、Ni²⁺-IDAカラムを20mM トリス (pH7.5)、300mM NaClで平衡化した。添加後、全て20mM トリス (pH7.5) で緩衝化した異なる塩溶液 (順に300mM、510mM、90mMのNaCl) で3回カラムを洗浄した。その後、20mM トリス (pH7.5)、10mM イミダゾール、90mM NaClでカラムを洗浄し、結合した免疫複合体を200mM イミダゾール (pH7.5) を含む同じ溶液で溶出した。

30

40

【0215】

溶出液をHQ/M-イオン交換カラムに直接添加し、結合した免疫複合体を20mMのトリス (pH7.5) で緩衝化した90~1000mMのNaCl塩勾配で溶出した。4D5MOCB-ETAを含む画分を収集し、4℃で2000×gの遠心分離によって10kDaのカットオフフィルター (ウルトラフリーMC低タンパク質結合、Millipore社) を用いて濃縮した。精製したVB4-845 (4D5MOCB-ETA) の品質を、10%SDSポリアクリルアミドゲルおよび製造業者の推奨に従って1:5000希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗テトラヒスチジン抗体 (QIAGEN社、ヒルデン、ドイツ) を用いるウェスタンブロットングにより分析した。

【0216】

50

分析用ゲル濾過および熱安定性の決定

精製したVB4-845 (4D5MOCB-ETA) の10マイクログラムを、0.05%のTween-20を含む50ml PBS pH7.4に希釈し、その後、37℃でインキュベートした。Superose-12 PC3.2/30カラムを有するスマートシステム (Pharmacia社、ウプサラ) を用いたゲルろ過によって異なる時点 (0時間、2時間、4時間、8時間、10時間および20時間後) で試料を分析した。カラムを、3種類のタンパク質標準物質のアルコールデヒドロゲナーゼ (Mr 150,000)、ウシ血清アルブミン (Mr 66,000) および炭酸脱水酵素 (Mr 29,000) を有する同じ緩衝液で校正した。37℃で20時間インキュベーションした後のヒト血清中の99mTc標識免疫複合体の熱安定性を、同じ分析設定を用いて評価した。免疫複合体の単量体の量を、溶出画分のg-シンチレーション計数によって決定した。

10

【0217】

放射性標識および抗原結合親和性の決定

VB4-845 (4D5MOCB-ETA) を、タンパク質配列に存在するヘキサヒスチジンタグへの99mTc-トリカルボニル三水和物の安定した部位特異的配位により放射性標識した。この自然反応を、30mlの免疫複合体溶液 (1mg/ml) と1/3体積の1Mの2[N-モルホリノ]エタンスルホン酸 (MES) pH6.8および1/3体積の新たに合成した99mTc-トリカルボニル化合物を混合することによって誘導した。混合物を37℃で1時間インキュベートし、製造業者の推奨に従って、0.005%のTween-20を含むPBSで平衡化したBiospin-6カラム (BioRad社、カリフォルニア州ハーキュリーズ) 上で脱塩することによって反応を停止させた。記載のように、免疫反応性免疫複合体の割合を評価した。99mTc標識免疫複合体の結合親和性を、本質的にはscFv 4D5MOCBについて記載したように、ラジオイムノアッセイ (RIA) でSW2細胞にて決定した。

20

【0218】

実施例6：コドン最適化DNA配列を有するVB4-845の構築および表現

大腸菌におけるVB4-845の発現収量を、発現ベクターのコーディングおよび非コーディング核酸配列を改変することによって改善した。より具体的には、改変にはオープンリーディングフレーム中の主な停止の除去が含まれ、この詳細については、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,318,472号に開示されている。VB4-845をコードするコドン最適化DNA配列を配列番号16に示す。コドン最適化VB4-845のDNA配列を、実施例5のようにpING3302プラスミドにライゲーションし、大腸菌で発現させた。

30

【0219】

実施例7：製造プロセス

VB4-845の大腸菌発酵

VB4-845の生成を、研究室でロータリーインキュベーターシェーカーを用いて2Lの振盪フラスコ中で行う。ロータリーシェーカーは、温度が摂氏1度の範囲内に調節できる環境制御室内に存在する。種培地、生成培地の接種および全ての無菌操作を、HEPA濾過および100の空気分級を備える生物学的安全キャビネットタイプII/B下で行う。細胞の分離、濃縮およびダイアフィルトレーションを研究室で行う。

40

【0220】

VB4-845を、VB4-845 E104宿主細胞大腸菌マスター細胞バンク (MCB) から生成する (Xoma Ireland社のプラスミドpING3302を発現ベクターの構築のために使用した)。臨床グレードのVB4-845の生成のための細胞増殖 (発酵) の最初のスケールアップは、フラスコあたり1リットルの作業容積で26x2Lの振盪フラスコのレベルまでであり、総容積は26Lである。VB4-845大腸菌MCBを、細胞成長のための主な炭素源としてグリセロールを含む複合窒素培地中で成長させる。発酵手順を以下に記載する。

【0221】

50

接種物の調製

26 Lの振盪フラスコでの実行のために、VB4-845大腸菌MCBの1つの500 ml培養物をプレ接種物として調製する。各培養物について、MCBのバイアルを-18℃の貯蔵タンクから取り出し、室温で解凍した。バイアルを70%エタノールで外部を拭き、生物学的安全キャビネット内で空気乾燥させる。MCB(1.5 ml)の細胞懸濁液を、無菌の種培地(改変2YT培地および25 mg/Lのテトラサイクリン)500 mLを含む2 Lの三角フラスコに添加する。フラスコを200 rpmに設定したロータリーシェーカーに移し、 3.0 ± 0.2 以上の光学密度に到達するまで(10.5 ± 1 時間、増殖の中期対数期) $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で成長させた。その後、接種物を種培養物として用い、26個の生成振盪フラスコに接種する。

10

【0222】

26 x 2 Lの振盪フラスコでの発酵

発酵を、それぞれ生成培地1 Lを含む2 L-バッフルなしフラスコで行う。臨床グレードのVB4-845のための代表的な生成工程は、フラスコあたり生成培地(改変テリフィックブロス(Terrific Broth)、TB)1 Lを含む26 x 2 Lフラスコで行った。発酵培地に上記培養物からの1%の接種物を播種し、接種した最後の振盪フラスコで光学濃度が1.2に達するまで(約6~7時間)、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で、シェーカー(200 rpm)上でインキュベートする。誘導の典型的なOD600の範囲は1.2~1.5である。VB4-845発現は、0.1%のL-アラビノースの添加により誘導される。誘導後約6時間の時点で細胞を収集する。

20

【0223】

細胞分離

収集時に、最初に接種したフラスコを最初に取り出し、全ての振盪フラスコを接種順にシェーカー室から取り出す。第1の振盪フラスコの内容物を、生物学的フード下で第2の振盪フラスコに加える。全ての後続の振盪フラスコも同様に取り出す。プールした振盪フラスコを2~8℃の冷凍庫に配置する。6群中のVB4-845のE104大腸菌細胞を、ソーバルおよびベックマンの遠心分離機で2~8℃で15分間、6800 gの力で遠心分離することにより、上記の発酵培養物から取り出す。細胞を廃棄し、無細胞培養液をさらなる処理のために保持する。濃縮した細胞懸濁液を収集し、不活性化して、確立された方法により処理する。得られた上清をプールし、試料5 mlを生成物の定量化のために貯蔵する。遠心分離機、ローターおよび遠心ボトルを、発酵ブロスを処理する前に完全に洗浄する。

30

【0224】

濃縮/ダイアフィルトレーション

収集した培養上清の濃縮およびダイアフィルトレーションを、10 kDの分子量カットオフNMW(公称分子量)のザルトリウス膜(Hydrosart社)を有し、3平方フィートの表面積を有する接線流ベリコンシステムを使用して行う。ベリコン濾過システムを使用前に完全に洗浄する。濃度は4 L/分の供給速度で、透過率は500 mL/分で行う。試料5 mlを最終濃度段階で取得する。ダイアフィルトレーションを、0.02 Mのリン酸ナトリウム、pH 7.2 ± 0.2 に対して行う。10ミリ秒を下回る所望の導電率を達成するために、5容積変化が必要とされる。ダイアフィルトレーション濃縮生成物を、2~8℃の設定温度で約30分間、6800 gの力でソーバル遠心機により清澄にする。目的の生成物を含む透明溶液を、0.22 μmフィルターを使用して精製前に濾過する。清澄化ステップには、ダイアフィルトレーション後に、遠心分離、0.2 μmフィルターへの通過、トリトンX-100の添加、導電性の調整、pHの調節が含まれ、その後に、精製が続く。

40

【0225】

VB4-845精製手順

VB4-845の精製を、HEPAろ過を用いてcGMP管理区域および10,000の空気分級を有する制御環境内で行う。VB4-タンパク質を金属親和性キレートクロマ

50

トグラフィーにより単離し、陰イオン交換クロマトグラフィー溶出によりさらに精製する。精製プロセスを図9のフローチャートに要約し、以下に記載する。

【0226】

キレート化セファロース金属相互作用クロマトグラフィー

金属親和性カラムを、約 17 ± 1 mLのカラム容量でXK26/20ガラスカラムにキレート化セファロースHP樹脂を充填することによって調製する。充填を3バールの背圧で行う。作業線流速(LFR)は90 cm/時である。5カラム容量(CV)の注射用水(WFI)を、キレート化セファロースカラムに通す。金属イオンをキレート化セファロースカラムにチャージするために、5CVの0.1 M塩化ニッケル溶液をカラムに通す。未結合の塩化ニッケルの残りを、5CVのWFIで洗い流す。次いで、カラムを150 mMの塩化ナトリウムおよび0.1%トリトンX-100を含む10CVの20 mMリン酸ナトリウム、pH 7.2 ± 0.1 緩衝液(キレート化セファロース平衡緩衝液)で平衡化する。

10

【0227】

VB4-845を含む濃縮/ダイアフィльтраーション溶液の伝導率を、塩化ナトリウムで 15 ± 1 ミリ秒に調整し、pHを1 Mの水酸化ナトリウム(NaOH)で 7.2 ± 0.1 に調整する。VB4-845含有溶液を90 cm/時または8 ml/分のLFRでキレート化セファロースHPカラムに適用する。次いで、カラムを、20CVの洗浄緩衝液(20 mM イミダゾールおよび0.1%トリトンX-100を含む20 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2 ± 0.1 緩衝液(洗浄緩衝液))で洗浄する。VB4-845を、500 mM イミダゾールを含む6CVの20 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2 ± 0.1 緩衝液(キレートセファロース溶出緩衝液)でカラムから溶出する。溶出ピークの始めから3CV画分中の生成物を収集する。

20

【0228】

Q-セファロース-陰イオン交換クロマトグラフィー

Q-セファロースHP樹脂をXK16/20ガラスカラムに充填すると、最終カラム体積は 5.0 ± 0.5 mLになる。動作線流速は156 cm/時である。このカラムを10CVのWFIで洗浄し、次いで、5CVの20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.2 ± 0.1 緩衝液中1 Mの塩化ナトリウムで洗浄し、10CVの20 mM リン酸ナトリウム、90 mM塩化ナトリウム、pH 7.2 ± 0.1 緩衝液(2-セファロース平衡緩衝液)で平衡化する。キレート化セファロースカラムからの溶出を、 10 ± 1 ミリ秒の導電率になるまで20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.2 ± 0.1 緩衝液で希釈する。エンドトキシレベルおよびDNAをさらに減少させるために、部分精製したVB4-845を5.2 ml/分の流速でQセファロースカラム上に添加する。生成物が結合した後、陰イオン交換カラムを、15CVのQセファロース平衡緩衝液で洗浄する。汚染物質がフロースルーおよび洗浄工程に見られる。生成物を、20 mM リン酸ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2 ± 0.1 緩衝液で3 mL画分として溶出する。

30

【0229】

実施例8：肝細胞癌(HCC)の治療のためおよび癌幹細胞を死滅させるためのVB4-845

40

対象および組織試料

2008年11月~2010年3月に、90人のHCC患者に東京医科歯科大学病院で治療的肝切除術を施行した。全形態の種類の決定およびEp-CAM発現の分析に使用する実験法を、以前に報告されたように行った。患者を、 α -フェトプロテインおよびビタミンK欠乏により誘導されるタンパク質またはアンタゴニスト-I Iの血清レベルのアクセシビリティで毎月経過観察し、超音波検査、コンピュータ断層撮影、および磁気共鳴断層撮影を3ヶ月ごとに行った。観察時間の中央値は25.2ヶ月(95%信頼区間[CI]、10.4~37.7ヶ月)であった。書面によるインフォームドコンセントを各対象から取得し、施設内倫理委員会が試験手順を承認した。

50

【0230】

細胞培養

ヒトHCC細胞株Hep3B、PLC/PRF/5、およびSK-Hep1を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（米国バージニア州マナッサス）から入手した。他のヒトHCC細胞株のHuH-7、HuH-1、HepG2、HLE、およびHLFは、ヒューマンサイエンス研究資源バンク（大阪、日本）から入手した。HuH-7、HepG2細胞、Hep3B、およびSK-Hep1細胞は、1640 RPMI（Invitrogen社、カリフォルニア州カールズバッド）で対数増殖培養し、HuH-1、HLE、HLF、およびPLC/PRF/5細胞はダルベッコ改変イーグル培地（Invitrogen社）で培養し、その際、HLF細胞については5%ウシ胎児血清（Sigma社、ミズーリ州セントルイス）または残りの細胞株については10%FBSを培養した。全ての培地に1%PenStrep（Sigma社）を補充した。ルシフェラーゼ発現プラスミドpGL4.50[luc2/CMV/ハイグロ]ベクター（#E131A；Promega社、ウィスコンシン州マディソン）を、製造業者の取扱説明書に従ってHuH-7細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ発現HuH-7細胞（HuH-7-Luc）を作製した。全ての細胞株は、5%二酸化炭素中、37℃の加湿インキュベーター中で培養し、0.05%トリプシン-0.03%EDTA（Invitrogen社）を用いて収集した。

10

【0231】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーについては、FACSCantoTMII（BD Biosciences社、カリフォルニア州サンノゼ）を用いた。癌細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、次いで、0.05%トリプシン-EDTA（Invitrogen社）で酵素的に分離した。トリプシン処理細胞をFACS緩衝液に懸濁し、FACSDivaソフトウェア（BD Biosciences社）を用いてFACSCantoTMIIで分析した。肝幹/前駆細胞マーカーの分析については、EpcAMに対する一次抗体（#324206；Biolegend社、カリフォルニア州サンディエゴ）、CD13（#555394；BD Pharmingen社）、CD44（#555479；BD Pharmingen社）、CD90（#328110；Biolegend社）、CD133（#130-080-801；Miltenyi Biotec社、グラートバハ、ドイツ）、マウスIgG1 κタイプ（#555749；Biolegend社）、およびマウスIgG2b κタイプ（#400314；Biolegend社）を用いた。全ての抗体を、フィコエリトリン（PE）に直接結合させた。免疫染色および分析は、製造業者の取扱説明書に従って行った。

20

30

【0232】

細胞の増殖および生存率の分析

HCC細胞株を、総体積50 μlの培地中1ウェル当たり 3×10^3 細胞で96ウェルプレートに播種した。24時間後、0.001~10 pMの濃度範囲のVB4-845を総体積100 μlに添加し、さらに72時間インキュベートするか、または0.01~100 μg/mlの濃度範囲の5-FUを添加し、標準細胞培養条件下で48時間インキュベートした。細胞生存率をCellTiter 96水性1溶液細胞増殖アッセイキット（CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit（プロメガ社））を用いて監視し、半最大阻害濃度（IC₅₀）値を算出した。IC₅₀の平均値および標準偏差を、各細胞株について3つ組で計算した。細胞生存率を調べるために、HCC細胞株を、総容量2 mlの培地1ウェルあたり 1×10^5 細胞で6ウェルプレートに播種した。24時間後、VB4-845（1~10 pM）および5-FU（1~5 μg/ml）を添加し、48時間インキュベートした。死細胞を排除するために、残りの生細胞をトリパンブルーで染色した後Cytocon（GE Healthcare社）を用いて計数した。各分析を3つ組で行い、データを平均±標準偏差として表した。

40

50

【0233】

球形形成アッセイ

簡単に説明すると、HuH-7、HepG2、Hep3BおよびHuH-1の 1×10^6 細胞を、4枚の10cm皿に播種した。24時間後、PBS、VB4-845（ $1 \sim 10 \mu\text{M}$ ）、5-FU（ $1 \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）、およびVB4-845+5-FUの組み合わせを各皿に投与した。48時間後、この培地を薬物を含まない培地と交換し、24時間インキュベートした。細胞生存率をトリパンブルー排除によって確認した後、残りの生細胞を収集し、低接着プレート（96ウェル超低クラスタープレート；Costar社、ニューヨーク州コーニング）に 1×10^2 細胞で別々に播種し、血清を含まないダルベッコ改変イーグル培地／F12培地（Invitrogen社）中でインキュベートした。球形形成をAxioObserver（Carl Zeiss社、オーバーコッヘン、ドイツ）を用いて観察し、AxioVisionソフトウェア（Carl Zeiss社）を用いてデジタル画像を得た。

10

【0234】

免疫組織化学的分析

Ep-CAMの免疫組織化学的分析を、PBSで1:160希釈した抗Ep-CAM抗体（#ab71916；Abcam社、ケンブリッジ、英国）を用いて腫瘍の組織切片上で実施し、その後、熱誘導エпитープ検索および標準DAB検出キット（Ventana社）を用いて自動免疫染色装置（Ventana社；米国アリゾナ州ツーソン）中で反応させた。腫瘍細胞は、強く染色された腫瘍細胞として定義される通常の胆管上皮と等しい膜染色を示した。免疫染色を、2人の独立した研究者が光学顕微鏡下で少なくとも3つの異なるランダムフィールド（100倍の拡大）で計数することによって定量的に評価した。データを平均±標準偏差として表す。

20

【0235】

皮下異種移植片モデルにおけるインビボ研究

皮下腫瘍モデルを用いて、VB4-845のインビボ活性を分析した。チャールズリバー研究所（神奈川県、日本）から購入した25週齢の雌NOD.CB17-PRKDC^{scid}/Jマウスに、同量のマトリゲル（BD Biosciences社）と混合した 1×10^6 HuH-7細胞を麻酔下でマウスの両脇腹に皮下注射した。接種後2週間の時点で、全部で40個の注射部位に触知可能な腫瘍が確認され、マウスを4群（ $n=5$ ）：対照、VB4-845（ $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）、5-FU（ $30 \text{mg}/\text{kg}$ ）、およびVB4-845と5-FUの組み合わせに無作為化した。生理食塩水または生理食塩水 $100 \mu\text{l}$ で希釈したVB4-845を尾静脈注射により注入し、生理食塩水または生理食塩水 $100 \mu\text{l}$ で希釈した5-FUを全6用量について2週間、週に3回腹腔内注射した。腫瘍サイズを、キャリパーを用いて週3回測定し、次式：

30

体積 = (長さ) × (幅) 2×0.5

を用いて腫瘍体積を計算した。マウスを治療開始後3週目に屠殺した。

【0236】

同所性肝異種移植モデルにおけるインビボ研究

同所性異種移植モデルをHuH-7-Luc細胞の直接肝内接種によって作製した。10匹の5週齢の雌NOD.CB17-PRKDC^{scid}/Jマウスに完全麻酔を行い、 $20 \mu\text{l}$ のマトリゲル（BD Biosciences社）に懸濁した 5×10^5 細胞をゆっくりと肝臓の左上葉に注入した。接種後3週目に、IVISシステム（Xenogen社、カリフォルニア州アラメダ）を用いるルシフェラーゼルシフェリンベースのイメージングを用いて、肝臓における正しい移植を監視した。全てのマウスは肝腫瘍を示し、対照群およびVB4-845と5-FUの組み合わせ群（各5匹）の2群に無作為化した。投与法は皮下モデルと同じであった。治療の開始後2週目に、マウスを屠殺し、肝腫瘍のサイズを測定した。

40

【0237】

結果

50

融合性多結節（CM）型HCCにおけるE p-CAM発現のプロスペクティブ研究および患者の予後

90人のHCC患者のうち、18症例を、日本肝癌研究会による原発性肝癌の臨床および病理学研究のための一般規則に従って、「原発巣を示唆する任意の識別可能な大腫瘍結節のない、単焦点であるが多結節性の境界明瞭な腫瘍」であるCM型として診断した。図3Aに示すように、HCC細胞におけるE p-CAM発現が10症例で観察され、残りの8症例では観察されなかった。その後、E p-CAM発現の予後的意義を前向きに評価した。有意な関係が、E p-CAM発現と患者の予後（図3B； $p = 0.0447$ ）ならびに再発（図3C； $p = 0.0171$ ）の間で観察されたことは注目すべきである。

【0238】

ヒトHCC細胞におけるE p-CAMの発現

図4Aに示すように、8種類のヒトHCC細胞株におけるE p-CAM発現を、FACS解析を用いて評価した。これらの細胞株を以下の2群に分けた：95%を上回る細胞がE p-CAM陽性であるHuH-7（ $98.0 \pm 0.3\%$ ）、HepG2（ $98.0 \pm 0.9\%$ ）、Hep3B（ $99.8 \pm 0.1\%$ ）、およびHuH-1（ $97.7 \pm 0.2\%$ ）を含むE p-CAM高発現（E p-CAM^高）HCC細胞株、ならびに5%未満の細胞がE p-CAM陽性であるHLE（ $0.4 \pm 0.1\%$ ）、HLF（ $0.4 \pm 0.2\%$ ）、PLC/PRF/5（ $4.0 \pm 0.3\%$ ）、およびSK-Hep1（ $0.7 \pm 0.2\%$ ）を含むE p-CAM低発現（E p-CAM^低）HCC細胞株。これらの2群間で増殖活性および形態学的特徴に差はなかった。

【0239】

ヒトHCC細胞におけるVB4-845+5-FUのインビトロ効果

VB4-845の効果を、ヒトHCC細胞株において分析した。図4Bに示すように、VB4-845は、E p-CAM^高細胞株では効果的であるが、E p-CAM^低細胞株では効果的ではなかった。VB4-845のIC₅₀値は、HuH-7では $4.6 \pm 0.1 \times 10^{-2}$ pM、HepG2では $1.0 \pm 0.1 \times 10^{-2}$ pM、Hep3Bでは $0.9 \pm 0.1 \times 10^{-2}$ pM、およびHuH-1では $7.3 \pm 0.2 \times 10^{-2}$ pMであった。一方、VB4-845は、E p-CAM^低細胞株に対しては全く効果がなく、これらの細胞株ではIC₅₀値を決定できなかった。図4Cに示すように、5-FUは、全てのHCC細胞型において強力な抗増殖活性を示し、IC₅₀値は、HuH-7細胞については 0.8 ± 0.1 μg/ml、HepG2細胞については 39.5 ± 9.6 μg/ml、Hep3B細胞については 5.9 ± 1.8 μg/ml、HuH-1細胞については 11.3 ± 6.3 μg/ml、HLE細胞については 16.5 ± 6.6 μg/ml、HLF細胞については 33.5 ± 17.2 μg/ml、PLC/PRF/5細胞については 55.6 ± 11.2 μg/ml、SK-Hep1細胞については 4.3 ± 0.5 μg/mlであった。各細胞株における5-FUの有効性とE p-CAM発現の間に有意な相関は認められなかった（ $R = 0.16$ 、 $p = 0.38$ ）。

【0240】

図4Dに示すように、VB4-845と5-FUの併用効果を8種類のヒトHCC細胞株で評価した。VB4-845と5-FUの組み合わせは、E p-CAM^高細胞株の全てにおいて細胞増殖を有意に抑制した（ $p < 0.05$ ）。しかし、E p-CAM^低細胞株では、5-FUは、VB4-845と5-FUの組み合わせと同程度に細胞増殖を抑制し（ $P > 0.05$ ）、したがって、これらの細胞株は、両方の薬物の組み合わせ効果を示さなかった。したがって、E p-CAM^高細胞株をさらなる分析のために選択した。

【0241】

VB4-845、5-FU、およびVB4-845+5-FUの組み合わせ処理後の球形形成アッセイ

E p-CAM^高細胞株におけるVB4-845、5-FU、およびVB4-845+5-FUの組み合わせで処理した後に、生細胞を収集し、再培養における球形形成能について分析した（図5）。5-FU処理した生細胞は、培養7日後に4種類の細胞株の全てにお

10

20

30

40

50

いて球形成したが、VB4-845を単独でまたは5-FUと組み合わせて暴露した後に残っている生細胞は、培養7日後にこのような球を形成しなかった(図5)。このアッセイで使用したVB4-845および5-FUの用量は類似の抗増殖活性を示したが、球形成能に及ぼす影響は互いに正反対であった。球形成細胞は、幹細胞性の本質的な特徴の1つである自己複製が可能であると考えられているため、Ep-CAM^高細胞株に対するVB4-845の効果は、それらの幹細胞性と密接に関連することが見出された。

【0242】

VB4-845、5-FU、およびVB4-845+5-FUの組み合わせ処理後の幹細胞／前駆細胞マーカーの改変

図6Aに示すように、Ep-CAM^高細胞株では、CD133、CD13、CD44、およびCD90などいくつかの幹／前駆細胞マーカーの発現を、VB4-845、5-FU、およびVB4-845+5-FUの組み合わせ処理後にFACS分析を用いて分析した。これらのマーカーは、予後不良のHCCのバイオマーカーとして報告されたために選択した。図6Bに示すように、HuH-7細胞、HepG2細胞およびHep3B細胞におけるCD133の陽性率は、対照と比較してVB4-845の投与後に有意に減少した。 $(p < 0.0005)$ 。興味深いことに、HepG2細胞は、CD133の発現についてユニークな二峰性のパターンを示し(図6A、矢印)、VB4-845の投与が、HepG2細胞のこのCD133陽性亜集団を統計的に有意に著しく減少させた。一方で、図6Cに示すように、5-FUの投与は、対照と比較してHuH-7細胞、HepG2細胞およびHep3B細胞におけるCD133の陽性率を有意に増加させた $(p < 0.05)$ 。HuH-7およびHep3B細胞におけるCD13の陽性率は、VB4-845処理で有意に減少し(図6D、 $p < 0.01$)、5-FU処理で有意に増加した(図6E、 $p < 0.05$)。各細胞株の処理後のCD44およびCD90の陽性率には一貫した傾向はなかった。これらの結果は、VB4-845の効果がヒトHCC細胞の幹細胞性に密接に関連する可能性があることを示す。

【0243】

VB4-845、5-FU、およびVB4-845+5-FUの組み合わせのインビボ効果

インビボ抗腫瘍活性を調べるために、樹立したHuH-7皮下異種移植片を有するNOD.CB17-PRKdc^{Sclid}/Jマウスを利用した。治療開始後3週目にマウスを屠殺し、腫瘍の体積を測定した(対照群では $865 \pm 238 \text{ mm}^3$ 、VB4-845治療群では $476 \pm 134 \text{ mm}^3$ 、5-FU治療群では $555 \pm 147 \text{ mm}^3$ 、VB4-845+5-FUの組み合わせ治療群では $43 \pm 8.4 \text{ mm}^3$)。図7Aおよび7Bに示すように、対照群と比較した場合、VB4-845および5-FU単独療法群の腫瘍体積はより小さく見えた(それぞれ、 $p = 0.078$ および 0.31)。対照群、VB4-845治療群、および5-FU治療群と比較して、VB4-845+5-FU治療群において有意な腫瘍退縮が観察された $(p < 0.05)$ 。治療したマウスのいずれも、対照マウスと比較して消耗または他の毒性の徴候を示さなかった。データは、VB4-845および5-FUが、球形成能および肝幹／前駆細胞マーカー発現集団に対して異なる効果をもたらしたことを示している。腫瘍細胞の幹細胞性に関連するこれらの異なる効果は、併用群における腫瘍の有意な退縮と密接に関連し得る。

【0244】

同所移植モデルの図8Aおよび8Bに示すように、VB4-845と5-FUの併用療法は、対照($1964 \pm 367 \text{ mm}^3$)と比較して全てのマウス($141 \pm 34 \text{ mm}^3$)の肝腫瘍を有意に抑制した $(p = 0.011)$ 。Ep-CAM免疫組織学的発現(図8C)は、強く染色された腫瘍細胞の集団が対照群($76.7 \pm 6.0\%$)と比較してVB4-845+5-FU群($47.4 \pm 19.4\%$)において減少したことを実証した(図8D、 $p = 0.012$)。治療マウスのいずれも、対照マウスと比較して消耗または他の毒性の徴候を示さなかった。肝臓、骨髄、腎臓、腸および肺を含む試験した全ての宿主組織は、全ての実験で組織学的に正常であった。

10

20

30

40

50

【0245】

考察

この試験で、E p - C A M 発現の F A C S 分析により、8 種類のヒト H C C 細胞株が 4 種類の E p - C A M^高 (> 95%) および 4 種類の E p - C A M^低 (< 5%) H C C の 2 群に分類されたことが明らかになった (図 4 A)。H C C 細胞において E p - C A M の発現と球形成の間の密接な相関関係が報告されたので、球形成能に対する V B 4 - 8 4 5 の効果を分析した。図 5 に示すように、5 - F U 処理は球形成に影響を及ぼさなかったが、V B 4 - 8 4 5 ならびに V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U の組み合わせ処理は、全 4 種類の H C C 細胞株における球形成を明らかに抑制した。球形成能は、幹細胞の自己再生能力によって調節されることが知られているため、V B 4 - 8 4 5 の効果は、E p - C A M^高 H C C 細胞の幹細胞性に密接に関連する可能性がある。

10

【0246】

幹細胞性に対する V B 4 - 8 4 5 の効果のさらなる調査のために、V B 4 - 8 4 5、5 - F U、および V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U の組み合わせ処理後に、C D 1 3 3、C D 1 3、C D 4 4、および C D 9 0 などのいくつかの幹／前駆マーカーの発現を分析した。図 6 C に示すように、5 - F U 処理が、3 種類の H C C 細胞株において C D 1 3 3 の陽性率を有意に増加させた ($p < 0.05$)。さらに、V B 4 - 8 4 5 は、これらの H C C 細胞における C D 1 3 3 + 亜集団を劇的に減少させた (図 6 B、 $p < 0.0005$)。同様の結果が、別の幹細胞マーカーの C D 1 3 の分析から得られた。C D 1 3 の陽性率は、V B 4 - 8 4 5 処理では有意に減少したが (図 6 D)、5 - F U 処理では増加した (図 6 E)。これらの結果は、標的化亜集団が V B 4 - 8 4 5 処理と 5 - F U 処理間で異なることを示した。幹細胞／前駆細胞マーカーに関して、V B 4 - 8 4 5 の効果はまた、ヒト H C C 細胞の幹細胞性と密接に関連することが見出された。

20

【0247】

さらに、V B 4 - 8 4 5 および／または 5 - F U のインビボ抗腫瘍効果を、皮下異種移植モデルならびに肝臓同所性異種移植片モデルを用いて分析した。皮下異種移植モデルにおいて (図 7)、抗腫瘍作用は、V B 4 - 8 4 5 または 5 - F U 単剤療法のいずれかによって検出され、V B 4 - 8 4 5 と 5 - F U の併用療法は腫瘍体積をさらに減少させた。癌における臓器微小環境は、特に、H C C の臓器親和性癌に対する薬剤感受性において重要な役割を果たす可能性があるため、臨床症状との類似性を有する肝同所移植モデルを利用して、腫瘍増殖阻害も探索した。皮下異種移植片モデルで観察されたように、腫瘍の著しい退縮が、対照群と比較して V B 4 - 8 4 5 + 5 - F U 治療群において観察された (図 8、 $p = 0.0011$)。

30

【0248】

理論に拘束されることを望まないが、これらの研究は、E p - C A M 標的療法が従来の細胞傷害剤 5 - F U とは潜在的に異なる機構 (例えば、幹細胞性) を介して抗癌効果を示すように思われる。実際には、前臨床試験は、従来の細胞毒性剤と E p - C A M を標的にする免疫複合体の併用療法がヒト H C C の治療のための有望な新規アプローチであることを示している。E p - C A M 標的剤のさらなる研究および臨床試験は、H C C 管理におけるその治療的役割を確認する。

40

【0249】

実施例 9：乳癌幹細胞に対する V B 4 - 8 4 5 の効果

M C F - 7 乳癌細胞を低密度で単一細胞懸濁液中に入れ、細胞接着を防ぐために 6 ウェルのポリ H E M A コーティングプレート中の無血清培地中で 7 日間培養した。V B 4 - 8 4 5 および対照を、複数の濃度で (濃度あたり $n = 3$ ウェル) プレーティング時に培地に添加した。ビヒクル対照および γ セクレターゼ阻害剤 D A P T ($50 \mu M$) も含めた (図 9)。非幹様細胞が死滅し、幹様細胞は存続および増殖して、マンモスフェアを形成した。7 日後に、サイズが $50 \mu m$ を超える 1 ウェルあたりのマンモスフェアの数を計数し、試験薬剤および対照に対するマンモスフェア形成効率 (M F E) を計算した。

【0250】

50

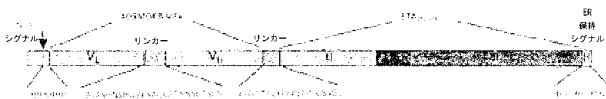
マンモスフェアの減少が、増殖の阻止によるものではなく、幹細胞の死滅によるものであるか否かを評価するために、VB4-845で処理した培養物を収集し、6ウェルのポリHEMAコーティングプレートに再播種し、7日間、VB4-845の存在／非存在下で培養して、トリパンブルー排除によって細胞毒性を測定した（図10）。VB4-845は、最初の球アッセイにおいて球形形成を完全に阻害する能力を示した。この効果は、試験品が培養培地から除去されたときに球を形成しなかったことにより、再播種アッセイで試験した濃度でも観察された。再播種後10日目に細胞培地にトリパンブルーを添加して、細胞毒性を確認した。

【0251】

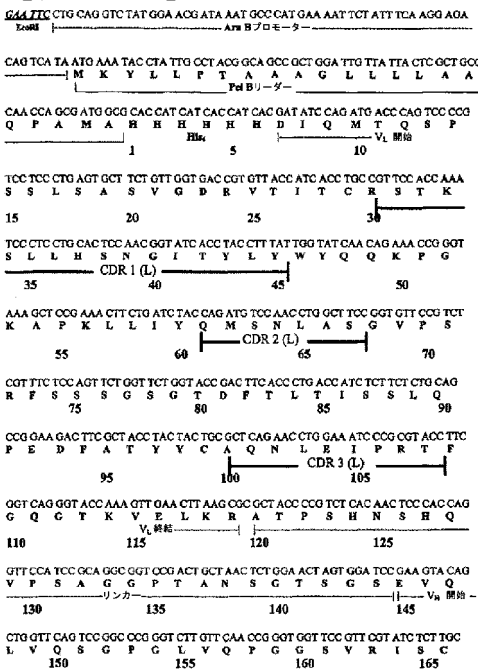
これらの研究は、pM範囲で球形形成を完全に阻害するVB4-845の能力を実証した。VB4-845で処理した細胞の再播種は、いかなる球も生成せず、細胞毒性効果を示した。

10

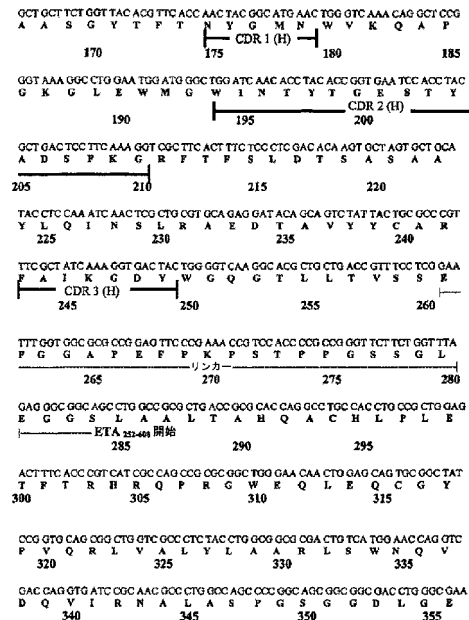
【図1】



【図2-1】



【図2-2】



【図 2-3】

GCG ATC CGC GAG CAG CGG GAG CAG GGC CGT CTG GCC CTG ACC CTG GGC GGC GGC GAG
A I R E Q P F Q A R L A L T L A A A X
360 365 370 375

AGC GAG GGC TTC CTG CGG CAG GGC ACC GGC AAG GAG GAG GGC GGC GGC GGC ACC GGC
S E R F V R Q G T S S L N D E A R A A S A
380 385 390

GAC GTG GTG AGC CTG ACC TGC CCG CTC GGC GGC GGT GAA TGC GGC GGC GGC GGC GAG
D V Y S L T C P V A A G E C A G P A D
395 400 405 410

AGC GGC GAC GGC CTG CTG GAG GGC AAC TAT CCC ACT GGC GGC GAG TTC CTC GGC GAC
S G D A L L E R N Y P T G A E F L G D
415 420 425 430

GGT GGC GAC GTC AGC TTC AGC ACC GGC GGC ACC CAG AAC TGG ACC GTG GAG CGG CTG
G G D V S F S T R G T Q N W T Y E R L
435 440 445 450

CTC CAG GGC CAC GGC CAA CTG GAG GAG GGC GGC TAT GTG TTC GGC TAC CAC GGC
L Q A H R Q L E P R G Y V F V G Y H C
455 460 465 470

ACC TTC CTC GAA GGC GGC CAA AGC ATC TTC TTC GGC GGC GTG GGC GGC GGC AGC CAG
T F L E A A Q S I V F G G V R A A R S Q
475 480 485

GAT CTC GAC GGC ACC TGG CGG GGT TTC TAT ATC GGC GGC GAT CCG CGG CTG GGC TAC
D L D A I W R G F Y I A G D P A L A Y
490 495 500 505

GGC TAC GGC CAG GAC CAG GAA CGC GAC GGC GGC GGC CGG ATC CAC AAC GGT CGG CTC
G Y A Q D Q E P D A R G R I R N G A L
510 515 520 525

CTG CGG GTC TAT GTG CGG GGC TGC AGC CTC CGG GGC TTC TAC GGC ACC GGC CTC ACC
L R V Y Y F R S L F G P Y R T G L T
530 535 540 545

CTG GGC GGC CGG GAG GGC GGC GGC GAG GTC GAA CGG CTG ATC GGC CAT CCG CTC CGG
L A A F E A A G E V E R L I G H P L F
550 555 560 565

【図 2-4】

CTG CGC CTG GAC GGC ATC ACC GGC CCC GAG GAG GAA GGC GGC CGC CTG GAG ACC ATT
L R L D A I T G P E E E G G R L E T I
570 575 580

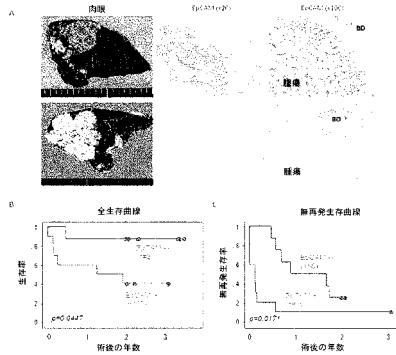
CTC GGC TGG CGG CTG GGC GGC ACC GTG ATT CCC TGG GGC ATC CCC ACC GAC
L G W P L A E R T V Y I F S A I P T D
585 590 595 600

CCG GGC AAC GTC GGT GGC GAC CTC GAC CCG TCC AGC ATC CCG CAG AAG GAA CAG GGC
P R N V G G D L D F S S I P D K E Q A
605 610 615 620

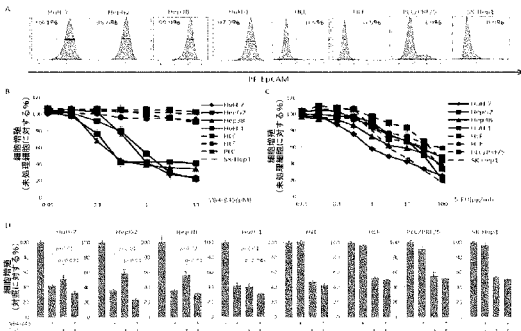
ATC AGC GGC CTG CGG GAC TAC GGC AGC CAG CGC GGC AAA CGG CGG CAT CAC CAC CAT
I S A L P D Y A S Q P G K P P H H H H
625 630 635 640

CAC CAT AAA GAC GAA CTG TAG TGA CTC GAG
H H K D E L . . L E
645 651

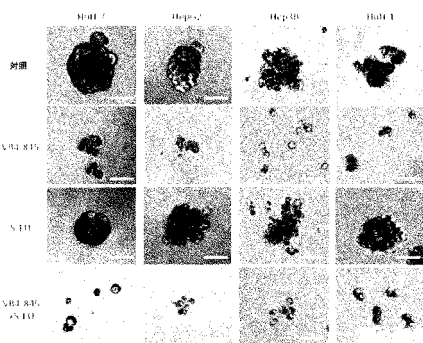
【図 3】



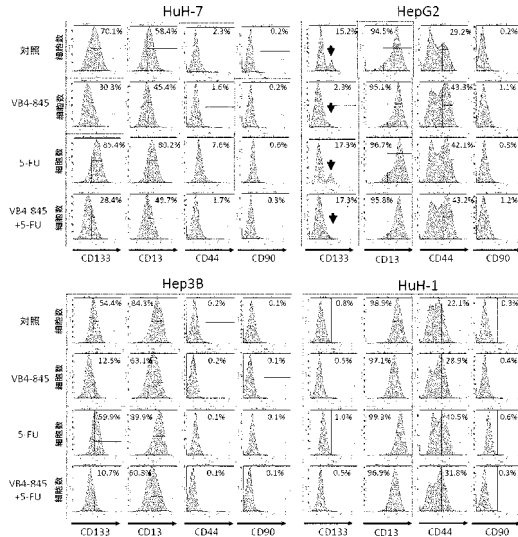
【図 4】



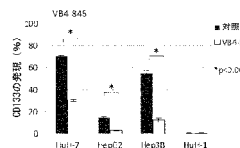
【図 5】



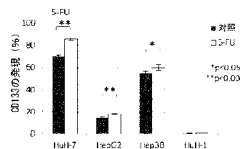
【図 6 A】



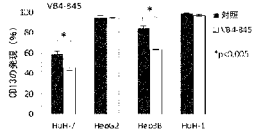
【図 6 B】



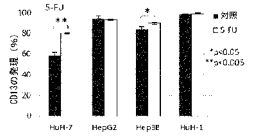
【図 6 C】



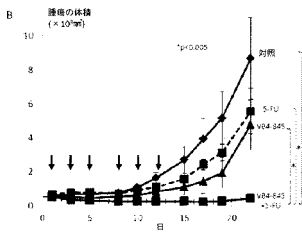
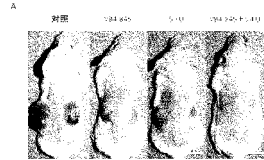
【図 6 D】



【図 6 E】



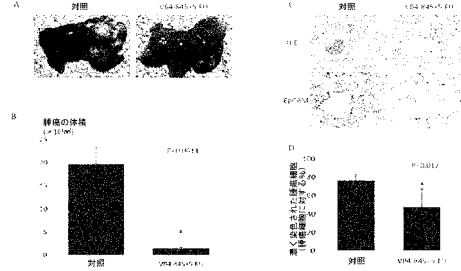
【図 7】



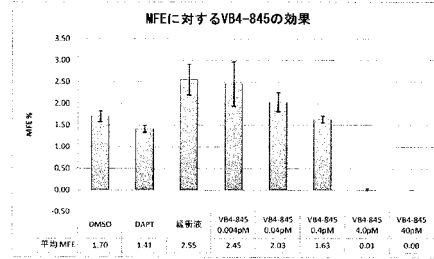
【配列表】

2016526009000001.app

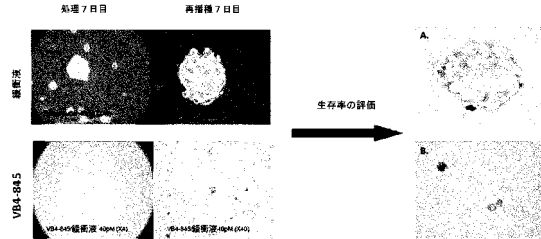
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2014/050373
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 47/48 (2006.01), A61K 35/74 (2006.01), A61K 38/16 (2006.01), A61K 51/10 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), G01N 33/574 (2006.01)		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K 47/48 (2006.01), A61K 35/74 (2006.01), A61K 38/16 (2006.01), A61K 51/10 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), G01N 33/574 (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent database, United States Patent database, EPOQUE (English Full Text), GenomeQuest, PubMed, Scopus, Google (Keywords: Ep-CAM, immunoconjugate, hepatocellular, antibody fragment and related terms)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	OGAWA et al., "EpCAM-targeted therapy for human hepatocellular carcinoma", <i>Annals of Surgical Oncology</i> , 2014, 21, 1314-1322 (published online 27 December 2013).	1-5 and 8-34
Y	WO2004096271 (ZANGEMEISTER-WITTKE et al.) 11 November 2004 (11-11-2004)	1-5 and 8-34
Y	SIMON et al., "Epithelial cell adhesion molecule-targeted drug delivery for cancer therapy", <i>Expert Opinion on Drug Delivery</i> , April 2013, 10(4), 451-468 (published online 14 January 2013).	1-5 and 8-34
Y	CA2560278 (MACDONALD et al.) 29 September 2005 (29-09-2005)	1-5 and 8-34
Y	CA2424255 (DI PAOLO et al.) 26 September 2004 (26-09-2004)	1-5 and 8-34
Y	WO2010115630 (FAULSTICH et al.) 14 October 2010 (14-10-2010)	1-5 and 8-34
Y	PANG et al., "Cancer stem cell as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma", <i>Current Cancer Drug Targets</i> , 2012, 12, 1081-1094.	1-5 and 8-34
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		☒ See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 03 July 2014 (03-07-2014)		Date of mailing of the international search report 11 July 2014 (11-07-2014)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Wesley Sharnan (819) 934-2326

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/CA2014/050373

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OISHI et al., "Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells", International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(5), 517-535.	1-5 and 8-34
Y	KIMURA et al., "Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines", Cancer Science, 2010, 101(10), 2145-2155.	1-5 and 8-34
Y	YAMASHITA et al., "EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor initiating cells with stem/progenitor cell features", Gastroenterology, 2009, 136(3), 1012-1024.	1-5 and 8-34
Y	BREUHAHN et al., "Expression of epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma", Hepatology Research, 2006, 34, 50-56.	1-5 and 8-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/CA2014/050373
Box No. II**Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

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

1. ☒ Claim Nos.: 8-34
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 8-34 are directed to methods of medical treatment of the human or animal body (Rule 39.1(iv) of the PCT), a search has been carried out on the alleged effects of an immunoconjugate comprising an effector molecule conjugated to an antibody fragment that binds to epithelial cell adhesion molecule on hepatocellular carcinoma.
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(see extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.: 1-5 and 8-34

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2014/050373

(continuation of Box III)

The present international application does not comply with Rule 13.1 and 13.2 of the PCT as the claims are directed to a plurality of inventive concepts that do not share a linking technical feature. The present International Searching Authority has identified the following:

Group A – Claims 1-5 and 8-34 are directed to the use of an immunoconjugate comprising an antibody fragment conjugated to an effector molecule wherein the antibody fragment binds to epithelial cell adhesion (Ep-CAM) in the treatment or prevention of hepatocellular carcinoma;

Group B – Claims 6 and 7 are directed to a method of detecting or monitoring hepatocellular carcinoma comprising the steps of contacting a test sample with an antibody to form an antibody-antigen complex wherein the antibody comprising light chain complementarity determining regions comprising the amino acid sequences defined by SEQ ID NOS: 4, 5 and 6 and heavy chain complementarity determining regions comprising the amino acid sequences defined by SEQ ID NOS: 7, 8 and 9, measuring the amount of the antibody-antigen complex and normalizing the results against a control; along with kits comprising said antibody and instructions for its use in diagnosing hepatocellular carcinoma.

The subject matter of Group A and Group B do not share a single linking inventive concept. Both conjugates of antibodies targeting Ep-CAM and effector molecules and the presence of Ep-CAM on hepatocellular carcinoma form part of the common general knowledge. The alleged inventive concept in Group A rest on the use of conjugates comprising antibody fragments targeting Ep-CAM to treat hepatocellular carcinoma (i.e. the use of conjugates targeting Ep-CAM to treat a specific disease or condition). In the meanwhile, the alleged inventive concept in Group B rest on the use of a specific antibody (one with light chain complementarity determining regions comprising the amino acid sequences defined by SEQ ID NOS: 4, 5 and 6 and heavy chain complementarity determining regions comprising the amino acid sequences defined by SEQ ID NOS: 7, 8 and 9) to detect and monitor hepatocellular carcinoma (i.e. the use of a specific antibody to detect or monitor a condition). As a result, the present claims lack unity of invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International application No.
PCT/CA2014/050373

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2004096271A1	11 November 2004 (11-11-2004)	WO2004096271A1	11 November 2004 (11-11-2004)
		AU2004234191A1	11 November 2004 (11-11-2004)
		CA2524124A1	11 November 2004 (11-11-2004)
		CA2524124C	25 March 2014 (25-03-2014)
		CA2826735A1	11 November 2004 (11-11-2004)
		CN1816352A	09 August 2006 (09-08-2006)
		CN100417414C	10 September 2008 (10-09-2008)
		EP1635868A1	22 March 2006 (22-03-2006)
		EP2382990A1	02 November 2011 (02-11-2011)
		IL171643A	31 August 2011 (31-08-2011)
		IL213621D0	31 July 2011 (31-07-2011)
		IL213621A	31 December 2013 (31-12-2013)
		JP2006526576A	24 November 2006 (24-11-2006)
		JP4988333B2	01 August 2012 (01-08-2012)
		US2010249039A1	30 September 2010 (30-09-2010)
		US8545840B2	01 October 2013 (01-10-2013)
		US2007196366A1	23 August 2007 (23-08-2007)
		US2014178417A1	26 June 2014 (26-06-2014)
CA2560278A1	29 September 2005 (29-09-2005)	CA2560278A1	29 September 2005 (29-09-2005)
		CA2560278C	20 November 2012 (20-11-2012)
		AU2005224942A1	29 September 2005 (29-09-2005)
		AU2005224942B2	11 August 2011 (11-08-2011)
		BRPI0508670A	14 August 2007 (14-08-2007)
		CN1954073A	25 April 2007 (25-04-2007)
		CN1954073B	16 January 2013 (16-01-2013)
		DK1737961T3	05 August 2013 (05-08-2013)
		EA200601738A1	27 April 2007 (27-04-2007)
		EA010803B1	30 December 2008 (30-12-2008)
		EP1737961A1	03 January 2007 (03-01-2007)
		EP1737961A4	17 December 2008 (17-12-2008)
		EP1737961B1	08 May 2013 (08-05-2013)
		ES2424643T3	07 October 2013 (07-10-2013)
		HK1102306A1	14 June 2013 (14-06-2013)
		IL177922D0	31 December 2006 (31-12-2006)
		IL177922A	30 June 2011 (30-06-2011)
		JP2008500811A	17 January 2008 (17-01-2008)
		JP5025460B2	12 September 2012 (12-09-2012)
		KR20070000494A	02 January 2007 (02-01-2007)
		KR101165867B1	13 July 2012 (13-07-2012)
		MXPA06010716A	21 February 2007 (21-02-2007)
		NO20064134A	08 November 2006 (08-11-2006)
		NZ550339A	27 November 2009 (27-11-2009)
		PT1737961E	26 August 2013 (26-08-2013)
		US2005238642A1	27 October 2005 (27-10-2005)
		US7339031B2	04 March 2008 (04-03-2008)
		US2008219994A1	11 September 2008 (11-09-2008)
		US7750136B2	06 July 2010 (06-07-2010)
		US2010254964A1	07 October 2010 (07-10-2010)
		US8716234B2	06 May 2014 (06-05-2014)
		WO2005090579A1	29 September 2005 (29-09-2005)
		ZA200608696A	28 May 2008 (28-05-2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2014/050373

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
CA2424255A1	26 September 2004 (26-09-2004)		None
WO2010115630A1	14 October 2010 (14-10-2010)		WO2010115630A1 14 October 2010 (14-10-2010)
		AU2010234334A1	10 November 2011 (10-11-2011)
		AU2010234335A1	13 October 2011 (13-10-2011)
		CA2756246A1	14 October 2010 (14-10-2010)
		CA2758201A1	14 October 2010 (14-10-2010)
		CN102387815A	21 March 2012 (21-03-2012)
		EP2416804A2	15 February 2012 (15-02-2012)
		EP2416805A1	15 February 2012 (15-02-2012)
		EP2416805B1	24 July 2013 (24-07-2013)
		IL215108D0	29 December 2011 (29-12-2011)
		JP2012523383A	04 October 2012 (04-10-2012)
		KR20110140124A	30 December 2011 (30-12-2011)
		MX2011010469A	14 March 2012 (14-03-2012)
		RU2011145038A	20 May 2013 (20-05-2013)
		SG174328A1	28 October 2011 (28-10-2011)
		US2012100161A1	26 April 2012 (26-04-2012)
		US2012213805A1	23 August 2012 (23-08-2012)
		WO2010115629A2	14 October 2010 (14-10-2010)
		WO2010115629A3	23 December 2010 (23-12-2010)

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 31/513	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
	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,TM),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,RS,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,HR,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

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 田中 真二
東京都文京区湯島 1-5-45 国立大学法人東京医科歯科大学 肝胆膵外科内

(72)発明者 マクドナルド グレン
カナダ国 マニトバ州 ウィニペグ ラグラン ロード 475

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA41 BA61 CA01 CA20 DA06 EA04 GA11
4C084 AA19 MA16 MA66 NA05 NA10 ZA75 ZB26 ZC75
4C085 AA26 AA27 BB41 BB43 DD62 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 BC43 MA02 MA03 MA16 MA66 NA05 NA10
ZA75 ZB26 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 BA72 CA40 DA75 DA76 DA83 EA20
EA51 FA10 FA74