

(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2006-526576

(P2006-526576A)

(43) 公表日 平成18年11月24日(2006.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-504127 (P2006-504127)
 (86) (22) 出願日 平成16年4月30日 (2004. 4. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年12月20日 (2005. 12. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2004/000637
 (87) 国際公開番号 W02004/096271
 (87) 国際公開日 平成16年11月11日 (2004. 11. 11)
 (31) 優先権主張番号 60/466, 608
 (32) 優先日 平成15年4月30日 (2003. 4. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

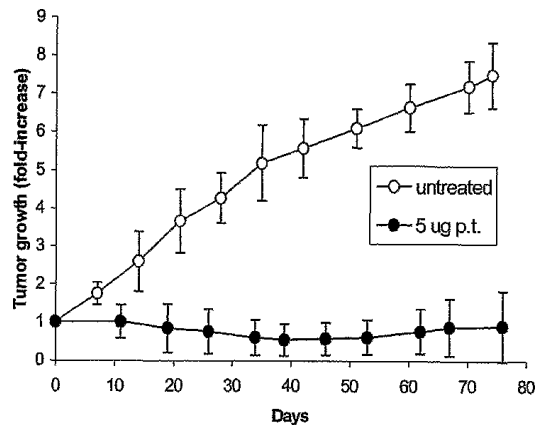
(71) 出願人 504022504
 ユニバーシティ オブ チューリッヒ
 スイス国 チューリッヒ ツェーハー 8
 O O 6, レイミストラッセ 7 1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 ツァングマイスター ウィトケ ウーヴェ
 スイス連邦 エンブラッハ ハルドシュト
 ラッセ 5 3
 (72) 発明者 パオロ クラウディオ ディ
 スイス連邦 チューリッヒ アンケンワイ
 ド 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫毒素を用いる癌を処置するための方法

(57) 【要約】

本発明は、頭頸部扁平上皮癌および膀胱癌を予防または処置するための方法であって、(a) (b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素を含む免疫毒素を用いる方法に関する。特定の態様において、本発明は、シュードモナス外毒素Aの切断型に融合するヒト化MOC31由来一本鎖抗体断片を含む組換え免疫毒素である、VB4-845を用いる頭頸部扁平上皮癌もしくは膀胱癌の予防または処置に向けられている。また、本発明により、癌の予防または処置のための低減された用量の化学療法剤の使用を含む併用療法方法も含まれる。また、本発明により、癌の予防または処置のための、癌腫への組換え免疫毒素の直接的投与のための製剤および方法も含まれる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下を含む、頭頸部扁平上皮癌または膀胱癌を処置または予防するための薬物の製造のための有効量の免疫毒素の使用：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；

(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

【請求項2】

リガンドが癌細胞上のEp-CAMに結合する、請求項1記載の使用。

【請求項3】

リガンドが抗体または抗体断片である、請求項1または2記載の使用。

10

【請求項4】

抗体または抗体断片が、マウス、ヒトもしくはキメラの抗体または抗体断片である、請求項3記載の使用。

【請求項5】

リガンドがヒト化抗体または抗体断片である、請求項1～4のいずれか一項記載の使用。

【請求項6】

ヒト化抗体または抗体断片が、ヒトEp-CAMの細胞外ドメインに結合し、かつMOC-31抗体由来の相補性決定領域(CDR)配列を含む、請求項5記載の使用。

【請求項7】

CDR配列がSEQ ID NO:4～9に示されている、請求項6記載の使用。

20

【請求項8】

抗体断片がFab、Fab'、(Fab')₂、scFvまたはdsFv断片である、請求項3～7のいずれか一項記載の使用。

【請求項9】

抗体または抗体断片が4D5MOC-A由来である、請求項5記載の使用。

【請求項10】

抗体または抗体断片が4D5MOC-B由来である、請求項5記載の使用。

【請求項11】

抗体断片がscFv断片である、請求項7～10のいずれか一項記載の使用。

【請求項12】

抗体断片がSEQ ID NO:3に示された配列またはその変異体を有する、請求項3～11のいずれか一項記載の使用。

30

【請求項13】

抗体または断片が 2.0×10^{-8} 未満の解離定数(K_D)でヒトEp-CAMに結合する、請求項3～11のいずれか一項記載の使用。

【請求項14】

免疫毒素がVB4-845またはその変異体である、請求項1～13のいずれか一項記載の使用。

【請求項15】

免疫毒素がVB4-845である、請求項1～13のいずれか一項記載の使用。

【請求項16】

免疫毒素がSEQ ID NO:2に示された配列を有する、請求項15記載の使用。

40

【請求項17】

頭頸部扁平上皮癌または膀胱癌の同時の、別々のもしくは逐次の処置または予防のための薬物の製造のための1つまたは複数のさらなる癌治療法の使用を追加的に含む、請求項1～16のいずれか一項記載の使用。

【請求項18】

薬物が癌部位に直接的に投与される、請求項1～17のいずれか一項記載の使用。

【請求項19】

直接的投与が腫瘍内、膀胱内または腫瘍周囲である、請求項18記載の使用。

【請求項20】

50

薬物が約10 μg～約3000 μg免疫毒素/腫瘍/日の用量で投与される、請求項1～19のいずれか一項記載の使用。

【請求項21】

薬物がHNSCCの処置のために約20 μg～約1240 μg免疫毒素/腫瘍/日の用量で投与される、請求項1～19のいずれか一項記載の使用。

【請求項22】

薬物が1～7日間、一日量からなるサイクルとして投与される、請求項20または21記載の使用。

【請求項23】

薬物が1～6サイクル投与される、請求項22記載の使用。

10

【請求項24】

薬物が、膀胱癌の処置のために約100 μg～約2000 μg免疫毒素/週の用量で投与される、請求項1～19のいずれか一項記載の使用。

【請求項25】

薬物が1週間につき1用量からなるサイクルとして投与される、請求項24記載の使用。

【請求項26】

薬物が1～6サイクル投与される、請求項25記載の使用。

【請求項27】

毒素がリボソーム不活化ポリペプチドである、請求項1～26のいずれか一項記載の使用

20

【請求項28】

毒素がゲロニン (gelonin)、ブーゲニン (bougainin)、サポリン (saporin)、リシン、リシンA鎖、プリオジン (bryodin)、ジフテリアおよびレストリクトシン (restrictocin) からなる群より選択される、請求項27記載の使用。

【請求項29】

毒素がシュードモナス外毒素Aまたはその変異体である、請求項27記載の使用。

【請求項30】

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合する分子；(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素、および癌を処置するためのその使用説明書を含み、免疫毒素の有効量を含む、頭頸部扁平上皮癌または膀胱癌を処置または予防するためのキット。

30

【請求項31】

リガンドが癌細胞上のEp-CAMに結合する、請求項30記載のキット。

【請求項32】

リガンドが抗体または抗体断片である、請求項30または31記載のキット。

【請求項33】

抗体または抗体断片がマウス、ヒトまたはキメラのものである、請求項32記載のキット

【請求項34】

リガンドがヒト化抗体または抗体断片である、請求項30～33のいずれか一項記載のキット。

40

【請求項35】

ヒト化抗体または抗体断片が、ヒトEp-CAMの細胞外ドメインに結合し、かつMOC-31抗体由来の相補性決定領域(CDR)配列を含む、請求項34記載のキット。

【請求項36】

CDR配列がSEQ ID NO:4～9に示されている、請求項35記載のキット。

【請求項37】

抗体断片がFab、Fab'、(Fab')₂、scFvまたはdsFv断片である、請求項32～36のいずれか一項記載のキット。

【請求項38】

抗体または抗体断片が4D5MOC-A由来である、請求項34記載のキット。

50

- 【請求項 39】
抗体または抗体断片が4D5MOC-B由来である、請求項34記載のキット。
- 【請求項 40】
抗体断片がscFv断片である、請求項37～39のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 41】
抗体断片がSEQ ID NO:3に示された配列またはその変異体を有する、請求項32～40のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 42】
抗体または断片が 2.0×10^{-8} 未満の解離定数(K_D)でヒトEp-CAMに結合する、請求項31～41のいずれか一項記載のキット。 10
- 【請求項 43】
免疫毒素がVB4-845またはその変異体である、請求項31～41のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 44】
免疫毒素がVB4-845である、請求項31～41のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 45】
癌細胞上のタンパク質に結合するリガンドおよび癌を診断するためのその使用説明書を含む、頭頸部扁平上皮癌または膀胱癌を診断するためのキット。
- 【請求項 46】
リガンドが癌細胞上のEp-CAMに結合する、請求項45記載のキット。 20
- 【請求項 47】
リガンドが抗体または抗体断片である、請求項45または46記載のキット。
- 【請求項 48】
抗体または抗体断片がマウス、ヒトまたはキメラのものである、請求項47記載のキット。
- 【請求項 49】
リガンドがヒト化抗体または抗体断片である、請求項45～48のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 50】
ヒト化抗体または抗体断片が、ヒトEp-CAMの細胞外ドメインに結合し、かつMOC-31抗体由来の相補性決定領域(CDR)配列を含む、請求項49記載のキット。 30
- 【請求項 51】
抗体断片がFab、Fab'、(Fab')₂、scFvまたはdsFv断片である、請求項47～50のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 52】
抗体または抗体断片が4D5MOC-A由来である、請求項51記載のキット。
- 【請求項 53】
抗体または抗体断片が4D5MOC-B由来である、請求項51記載のキット。
- 【請求項 54】
抗体断片がscFv断片である、請求項50～53のいずれか一項記載のキット。 40
- 【請求項 55】
抗体断片がSEQ ID NO:3に示された配列またはその変異体を有する、請求項47～54のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 56】
抗体または断片が 2.0×10^{-8} 未満の解離定数(K_D)でヒトEp-CAMに結合する、請求項46～55のいずれか一項記載のキット。
- 【請求項 57】
以下の段階を含む、頭頸部扁平上皮癌または膀胱癌を処置または予防するための方法：
(1)患者由来の腫瘍試料を、頭頸部扁平上皮癌または膀胱癌に関連するのではないかと疑われるタンパク質の発現について試験する段階；および 50

(2)そのタンパク質が対照と比較して腫瘍試料においてより高いレベルで発現されている場合、以下を含む免疫毒素の有効量を患者へ投与する段階：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のそのタンパク質に結合するリガンド；

(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、癌を有するまたは癌を有するリスクがある患者に、癌細胞の表面上に選択的に発現された抗原に結合する免疫毒素を投与することによる癌の予防または処置のための方法に向けられる。 10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

最近、免疫療法が、癌と闘う潜在的に有効な新しいアプローチとして浮上してきた。腫瘍関連抗原(「TAA」)に対して方向づけられた、マウスおよびヒト化/キメラ抗体、ならびにそれらのそれぞれの抗体断片が、特定のヒト癌の診断および治療のために用いられた⁵⁻¹³。これらの抗体の非結合型、毒素結合型および放射性標識型が、そのような治療に用いられた。

【0003】

免疫療法のための対象となる1つの腫瘍関連抗原は、Ep-CAM(上皮細胞接着分子(Epithelial Cell Adhesion Molecule)について、17-1A、KSA、EGP-2、およびGA733-2としても公知である)である。Ep-CAMは、肺、乳房、卵巣、結腸直腸の癌、および頭頸部の扁平上皮細胞癌を含む、多くの固形腫瘍において高く発現されている膜貫通タンパク質であるが、たいていの正常な上皮組織においては弱く発現されている。癌形成におけるEp-CAMの役割ははっきりしないままである；しかしながら、その発現は、細胞増殖の速度に相関している。Ep-CAM特異的抗体は、小細胞肺癌および非小細胞肺癌を有する患者において、原発腫瘍および転移を画像化ならびに検出するために用いられた。抗Ep-CAMモノクローナル抗体の中で、エドレコロマブとしても知られたマウスモノクローナル抗体である、PANOREX(登録商標)は、ドイツで大腸癌の治療用に認可され、米国で臨床試験中である¹⁴⁻¹⁵。しかしながら、注目すべきことには、PANOREX(登録商標)処置は、腹部の痙攣、吐き気、一過性下痢および皮膚膨疹を含む望ましくない副作用を伴った^{39-41,57}。他のEp-CAM標的化抗体での臨床試験は、より成功率が低かった；抗体BIS-1は、末梢血管収縮、呼吸困難および発熱を伴い、抗体3622W94は、急性壊死性膵炎を伴った³⁶⁻³⁸。効果的な、低毒性の抗Ep-CAM抗体についての研究は続いている：抗体依存性細胞障害(「ADCC」)によって作用すると言われている、完全ヒト化抗Ep-CAM抗体、MT201、が報告された⁵⁸。マウスモノクローナル抗体MOC31に由来する、ヒト化の、安定化された、一本鎖抗Ep-CAM抗体、4D5MOC-Bが開発され、2000年4月10日に出願され、2000年10月19日に公開された、国際特許出願番号PCT/EP00/03176、公開番号WO 00/61635、およびWilluda et al.⁵⁹に記載されている。これらの刊行物は、頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)または膀胱癌の処置におけるヒト化抗体の使用を開示していない。 40

【0004】

上記のように、Ep-CAMの発現の増加を伴う癌の1つは、頭頸部の扁平上皮細胞癌(「HNSCC」)である。Ep-CAM発現は、ヒトにおいて、頭頸部の扁平上皮細胞癌の進行と相関している。HNSCCは、現在、世界中で6番目に最も頻度の高い癌である。HNSCCは、重大な病的状態、特に発話および嚥下機能に関して、を引き起こす疾患である。手術、放射線療法、化学療法またはこれらの組み合わせが、一般的に、処置法の選択肢として利用できる。

【0005】

HNSCCに苦しんでいる患者を治すためのあらゆる試みにもかかわらず、再発が、依然として、頭頸部癌治療後の失敗(患者の40%~50%において)の最も多い原因である。サルベ 50

ジ療法は、一次治療に関して同じ処置法の選択肢からなる。しかしながら、症状緩和を目的とした手術は、しばしば、困難であり、美観を損なう。さらに、放射線療法は、まれにしか実行できないまたは有益ではなく、化学療法は、HNSCC患者において生存率を実質的には向上させない。これらの患者についての予後は、再発後の平均生存期間がたったおよそ6ヶ月であるように、依然として悪いままである。

【0006】

HNSCC患者についての悪い予後、生活の質への疾患の影響、および制限された処置法の選択肢のために、新しい腫瘍特異的治療、特にHNSCCに向けられた、の開発における相当な関心およびやむにやまれぬ必要性がある。

【0007】

膀胱癌は、結果として毎年推定260,000人の新患者を生じる、世界中で7番目に最も頻度の高い癌である。ヨーロッパにおいて、この疾患は、毎年約50,000人の死因である。膀胱組織における癌は、移行上皮癌として、移行上皮、膀胱を裏打ちする組織の表面層、内にほとんど全体的に生じる。最初の診断において、膀胱癌を有する患者の70~90%は、非浸潤性で、乳頭状(指状突起)腫瘍を示す、表面の尿路上皮層における癌を含む表在性疾患を有する。現在の処置は、化学療法の膀胱内送達、および結核菌での全身感染のさらなるリスクを含むカルメット-ゲラン桿菌(BCG)ワクチンでの免疫療法を含む。この積極的な処置計画にもかかわらず、これらの表在性乳頭状腫瘍の70%は、長期の臨床経過に渡って再発し、重大な病的状態を引き起こす；約4~8%が浸潤癌へ進行する。

10

【0008】

この医学的必要性に応じて、新しい、腫瘍特異的な治療法の開発にかなりの必要性がある。一つの新規なアプローチは、免疫毒素：毒素と結合した抗体、を用いる標的療法である。抗体は、腫瘍細胞に特異的に結合して、毒素を効率的腫瘍細胞殺害のために送達する。

20

【発明の開示】

【0009】

発明の概要

本発明は、頭頸部扁平上皮細胞癌および膀胱癌を、そのような処置を必要とする患者に、癌細胞の表面上のタンパク質に特異的に結合する(かつ、それゆえに、「標的にされる」)組換え免疫毒素の有効量を投与することにより処置するための新規な方法に関する。望ましい場合には、免疫毒素は、1つもしくは複数の他の抗癌剤と共投与、同時投与、および/もしくは逐次的投与され得、ならびに/または放射線もしくは手術と組み合わせられ得る。

30

【0010】

本発明はまた、発生または再発が疑われる部位へ免疫毒素の有効量を直接的に投与する段階を含む、癌を予防する、癌の再発を予防する、または癌の再発率を低減させるための方法に関する。

【0011】

本発明はまた、癌についての手術前、手術中および/または手術後、免疫毒素の有効量を手術部位へ直接的に投与する段階を含む、術後合併症のリスクを低減させるための方法に関する。

40

【0012】

本発明はまた、免疫毒素の有効量を投与する段階を含む、別の癌療法に対して腫瘍または癌の感受性を増加させるための方法に関する。他の癌療法は、免疫毒素の投与の前、投与と同時に、および/または投与後に、投与され得る。

【0013】

本発明の治療方法に用いられる免疫毒素は、(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素、を含む。癌細胞結合部分(a)は、例えば、化学的連結または遺伝子的連結により毒素部分(b)に連結され得る。

【0014】

50

特定の、非限定的態様において、リガンドはEp-CAMを結合する。特定の非限定的態様において、リガンドは抗体または抗体断片である。

【0015】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになると思われる。しかしながら、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示しているとはいえず、本発明の真意および範囲内の様々な変化および改変がこの詳細な説明から当業者に明らかになると思われるため、例証としてのみ与えられることは、理解されるべきである。

【0016】

定義

本明細書に用いられる場合、用語「動物」は、ヒトを含む、動物界のすべてのメンバーを含む。動物は、好ましくは、HNSCCまたは膀胱癌を有するヒトである。

10

【0017】

本明細書に用いられる場合、句「癌療法」とは、限定するわけではないが、化学剤、他の免疫治療用物質、癌ワクチン、抗血管形成性化合物、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、癌を処置もしくは予防するのに有効である化合物または処置を指す。

【0018】

本明細書に用いられる場合、句「有効量」とは、投薬量において、所望の結果を達成するのに必要な期間における、有効な量を意味する。免疫毒素の有効量は、動物の疾患状態、年齢、性別、体重のような因子に従って変わり得る。投与計画は、最適な治療反応を与えるように調整され得る。例えば、いくつかの分割量が毎日投与され得るか、または用量は治療状況の緊急性により示される場合、比例して低減され得る。

20

【0019】

本明細書に用いられる場合、句「ヒト化抗体または抗体断片」とは、抗体または断片がヒトフレームワーク領域を含むことを意味する。非ヒト種由来の抗体のヒト化は、文献に十分記載されている。例えば、EP-B1 0 239400およびCarter & Merchant 1997 (Curr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997)を参照されたい。

【0020】

本明細書に用いられる場合、句「免疫毒素は癌部位へ直接的に投与される」とは、限定されるわけではないが、直接的に腫瘍または腫瘍周囲への免疫毒素の単回または複数回の注入、腫瘍または腫瘍周囲への連続的または不連続的灌流、腫瘍または腫瘍周囲への貯蔵器の導入、腫瘍または腫瘍周囲への徐放性装置の導入、腫瘍または腫瘍周囲への徐放性製剤の導入、腫瘍上への直接的適用、腫瘍の領域を実質的に直接養う動脈への直接的注入、腫瘍の領域へ実質的に排出するリンパ管への直接的注入、実質的に被包化された腔(例えば、胸腔)または内腔(例えば、膀胱内)における直接的または実質的に直接的導入を含む、直接的または実質的に直接的導入を指す。「腫瘍周囲の」とは、限定されるわけではないが、触知可能な腫瘍境界のような腫瘍境界線としてみなされるものから約10 cm以内、好ましくは5 cm以内、より好ましくは1 cm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予防に関する「直接的投与」とは、癌の発生または再発のリスクがある部位への直接的な投与として定義される。

30

40

【0021】

本明細書に用いられる場合、句「癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド」は、癌細胞上のタンパク質に結合することにより免疫毒素を癌細胞を選択的に標的とし得る任意の分子を含む。癌細胞上の標的とされたタンパク質は、好ましくは、正常細胞と比較して癌細胞においてより高いレベルで発現される腫瘍関連抗原である。

【0022】

本明細書に用いられる場合、用語「MOC-31抗体」とは、当技術分野において公知であるマウス抗Ep-CAMまたは抗EGP-2抗体を意味し、BioGenex、カタログ番号MU316-UC、Zymed Laboratories Inc.、カタログ番号18-0270、またはUnited States Biological、カタログ番号M4165のような市販用供給源から入手できる。

50

【0023】

本明細書に用いられる場合、用語「4D5MOC-A」とは、参照により本明細書に組み入れられているWO 00/61635に記載されているように、scFv 4D5の人工的ヒトコンセンサスフレームワーク上へ移植されたヒト化scFv MOC31抗体を意味する。

【0024】

本明細書に用いられる場合、用語「4D5MOC-B」とは、参照により本明細書に組み入れられているWO 00/61635に記載されているように調製された4D5MOC-Aの安定した変異体を意味する。

【0025】

本明細書に用いられる場合、用語「VB4-845」とは、(b)アミノ酸252～608位からなるシュードモナス外毒素Aの切断型、に融合している(a)scFvヒト化抗体4D5MOC-B、を含む免疫毒素を意味する。

10

【0026】

本明細書に用いられる場合、句「薬学的に許容される」とは、一般的な臨床的使用および/もしくは、United States Pharmacopoeiaに記載されている、連邦政府もしくは州政府の規制当局による認可、または当業者による一般的な容認を指す。

【0027】

本明細書に用いられる場合、抗体結合についての「生理的状态」とは、インビボでEp-CAM結合性ポリペプチドがEp-CAM分子に遭遇する状態を反映するが、必ずしも正確に再現するとは限らない。生理的状态下での結合は、インビボでの結合が起こるであろうことを合理的に予測するはずのものである。

20

【0028】

本明細書に用いられる場合、句「癌を予防すること」とは、癌発生の予防を指す。場合によっては、予防的処置は、癌を発生する患者のリスクを減少させる、または前癌状態(例えば、大腸ポリープ)から実際の悪性腫瘍への進行を抑制する。

【0029】

本明細書に用いられる場合、句「低減された用量」とは、通常投与される用量および/または推奨される用量より少ない用量を指す。癌治療用物質の通常投与される用量は、例えば、Physician's Desk Referenceの最新版のような当技術分野において周知の基準物質に見出され得る。

30

【0030】

本明細書に用いられる場合、句「癌を処置すること」とは、癌細胞複製の抑制、癌拡散(転移)の抑制、腫瘍増殖の抑制、癌細胞数もしくは腫瘍増殖の低下、癌の悪性度の減少(例えば、分化の増加)、または癌関連症状の改善を指す。

【0031】

本明細書に用いられる場合、用語「変異体」とは、免疫毒素、抗体もしくは抗体断片、毒素(例えば、シュードモナス毒素)もしくは本明細書に記載された癌治療用物質の、任意の薬学的に許容される誘導體、類似体または断片を指す。変異体はまた、多量体の1つまたは複数の成分、個々の成分を含む多量体、個々の成分の倍数を含む多量体(例えば、参照分子の多量体)、化学分解生成物、および生物分解生成物を含む。特定の、非限定的態様において、免疫毒素は、参照免疫毒素のEp-CAM結合性部分および/または毒素部分における変化による参照免疫毒素に対する「変異体」であり得る。例えば、変異体免疫毒素は、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、参照毒素の調製物の毒性を測定するために用いられる標準アッセイにおいて、少なくとも10パーセントおよび好ましくは少なくとも30パーセントの毒性を保持する。

40

【0032】

参照免疫毒素のEp-CAM結合性部分の変異を有する変異体免疫毒素は、生理的状态下で、少なくとも10パーセントおよび好ましくは少なくとも30パーセントだけ、抗Ep-CAM参照抗体の結合と競合する(下記を参照されたい)。10パーセントだけの競合とは、飽和濃度の抗Ep-CAM参照抗体がEp-CAMに結合するアッセイにおいて、等価濃度の試験される変異体抗Ep

50

-CAM免疫毒素と平衡に達する時、これらの結合した参照抗体の10パーセントが置き換えられていることを意味する。非限定的例として、抗体間の競合、または抗体と免疫毒素の間の競合は、(1)標識抗Ep-CAM参照抗体を細胞表面上のEp-CAMに、またはEp-CAMコーティングされた固体基質に、事実上、すべてのEp-CAM部位が抗体により結合されるように、結合させる段階；(2)これらの抗体-抗原複合体を非標識試験抗Ep-CAM抗体または非標識試験免疫毒素と接触させる段階；および(3)Ep-CAM結合性部位から置き換えられた標識抗体の量を測定する段階であって、遊離された標識抗体の量が生じた競合の量を示している、段階により、測定される。

【0033】

発明の詳細な説明

本発明者らは、シュードモナス外毒素Aに連結された、ヒトEp-CAM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毒素が、頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)および膀胱癌の両方の処置において有効であることを示した。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(ETA)の切断型に融合された、Ep-CAMに対する一本鎖Fv組換え安定化ヒト化抗体断片を含む免疫毒素がHNSCCおよび膀胱癌の細胞の両方に対して細胞毒性であることを示した。この免疫毒素は、癌細胞上に発現されたEp-CAMに結合する。いったん結合されれば、免疫毒素は内部に取り込まれ、シュードモナス外毒素Aはタンパク質合成を遮断し、その時点で細胞死へと導く。重要なことには、たいていの正常な粘膜細胞および線維芽細胞はEp-CAMを広範には発現させず、それゆえに免疫毒素を内部に取り込むことができないため、それらは外毒素の殺害効果から保護される。

10

20

【0034】

従って、一つの態様において、本発明は、以下のものを含む免疫毒素の有効量をそのような処置を必要とする動物に投与する段階を含む、頭頸部扁平上皮細胞癌を処置または予防するための方法を提供する：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；

(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

本発明はまた、以下のものを含む免疫毒素の有効量の使用を提供する：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；

(b)頭頸部扁平上皮細胞癌を処置または予防するための癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

30

本発明はさらに、以下のものを含む免疫毒素の有効量の使用を提供する：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；

(b)頭頸部扁平上皮細胞癌を処置または予防するための薬物の製造における癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

【0035】

もう一つの態様において、本発明は、以下のものを含む免疫毒素の有効量をそのような処置を必要とする動物に投与する段階を含む、膀胱癌を処置または予防するための方法を提供する：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；

(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

本発明はまた、以下のものを含む免疫毒素の有効量の使用を提供する：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；

(b)膀胱癌を処置または予防するための癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

本発明はさらに、以下のものを含む免疫毒素の有効量の使用を提供する：

(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；

(b)膀胱癌を処置または予防するための薬物の製造における癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

40

【0036】

癌細胞上のタンパク質に結合するリガンドは、免疫毒素を癌細胞に対して選択的に標的とすることができる任意の分子であり得る。一つの態様において、リガンドは腫瘍関連抗

50

原に結合する。HNSCC細胞上に発現されるタンパク質の例は、IL-4受容体、EGF受容体、HER2/neu表面タンパク質およびEp-CAMを含む。膀胱癌細胞上に発現されるタンパク質の例は、EGF受容体、gp54およびEp-CAMを含む。特定の態様において、リガンドはEp-CAMに結合する。

【0037】

好ましい態様において、リガンドは抗体または抗体断片である。用いられ得る抗体断片は、組換え体供給源由来の、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た、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFvならびにdsFvを含む。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であり得る。キメラ抗体誘導體、すなわち、非ヒト動物可変領域およびヒト定常領域を結合する抗体分子もまた、本発明の範囲内で企図される。キメラ抗体分子は、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を含み得る。従来の方が、キメラ抗体を作製するために用いられ得る。(例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851 (1985); Takeda et al., Nature 314, 452 (1985), Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号; Boss et al., 米国特許第4,816,397号; Tanaguchi et al., 欧州特許公開EP171496; 欧州特許公開0173494, 英国特許GB 2177096Bを参照されたい)。ヒト化抗体の調製は、EP-B 10 239400に記載されている。ヒト化抗体はまた、商業的に生産され得る(Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain)。キメラ抗体は、対応する非キメラ抗体より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、WO 00/61635に記載されているように、さらに安定化され得る。

10

20

【0038】

HNSCCもしくは膀胱癌上のタンパク質に反応性の、特異的な抗体または抗体断片はまた、細菌で発現される、免疫グロブリン遺伝子またはそれらの部分をコードする発現ライブラリーを、そのタンパク質をコードする核酸分子から産生されたペプチドでスクリーニングすることにより作製され得る。例えば、完全Fab断片、VH領域およびFV領域は、ファージ発現ライブラリーを用いて細菌で発現され得る(例えば、Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989); Huse et al., Science 246, 1275-1281 (1989); およびMcCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990)参照されたい)。または、例えば、SCID-huマウス、Genpharmにより開発されたモデルは、抗体またはそれらの断片を産生するために用いられ得る。

30

【0039】

免疫毒素のリガンド部分は、免疫グロブリン由来であり得る、すなわち、免疫グロブリン(または抗体)である出発分子までたどることができる。例えば、リガンドは、当技術分野において公知の標準的技術を用いて、免疫グロブリン足場の改変により作製され得る。もう一つの非限定的例において、免疫グロブリンドメイン(例えば、重鎖および/または軽鎖)は、非免疫グロブリン足場に連結され得る。さらに、リガンドは、限定されるわけではないが、化学反応または遺伝的設計により開発され得る。従って、非限定的例において、免疫毒素は、(1)HNSCCもしくは膀胱癌細胞に特異的に結合する免疫グロブリン由来ポリペプチド(例えば、抗体ライブラリーから選択される抗体)またはその変異体、および(2)毒素またはその変異体、を含み得る。そのような免疫グロブリンポリペプチドリガンドは、標的腫瘍関連分子へのそれらの結合特性に影響を及ぼすように、または、例えば、物理的特性を改善するように、再設計され得る。

40

【0040】

免疫毒素のリガンド部分は、免疫グロブリンに基づく必要はない。従って、免疫毒素は、(1)HNSCCもしくは膀胱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、および(2)毒素またはその変異体、を含み得る。そのような非免疫グロブリンポリペプチドリガンドは、標的腫瘍関連分子に結合するように設計され得る。さらに、非免疫グロブリンポリペプチドリガンドは、所望の親和性または結合活性へと操作され得、かつ極度のpH範囲および比較的高い温度を含む様々な物理的状态に耐えるように設計され得る。

50

【0041】

実際に、薬学的組成物の使用について、生理的状态(例えば、ペプチダーゼの存在下において37)において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は有利であり得る。さらに、そのような分子またはそれらの変異体は、高い溶解性、小さなサイズ、適切な折り畳みを示し得り、容易に入手できる低コストの細菌系において発現され、従って商業的に妥当な量で生産され得る。非免疫グロブリンポリペプチドを設計する能力は、当業者の範囲内である。例えば、所望の結合パートナーを設計、生産および選択するように一般的に適応できる技術については、米国特許第5,831,012号および第6,534,628号を参照されたい。

【0042】

エピトープ結合ポリペプチドの例は、限定されるわけではないが、フィブロネクチンII I型ドメインを含むリガンドを含む(例えば、国際公開番号WO 01/64942、WO 00/34784、WO 02/32925を参照されたい)。プロテインAに基づく親和性ライブラリーもまた、エピトープ結合ポリペプチドを同定するために用いられ(例えば、米国特許第5,831,012号および第6,534,628号を参照されたい)、そのようなライブラリーは、本発明によりHNSCCまたは膀胱癌細胞に選択的に結合するポリペプチドを選択するのに有用であり得る。

10

【0043】

結合分子の他の型は当技術分野において公知であり、限定されるわけではないが、反復タンパク質ドメインの組み立てに基づいた結合分子を含む(例えば、Forrer et al., 2003, "A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins." FEBS Lett. 539:2-6; Kohl et al., 2003, "Designed to be stable : crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein." Proc Natl. Acad Sci USA. 100:1700-1705を参照されたい)。ランダムに組み立てられた反復ドメインのライブラリーは、本発明によりHNSCCまたは膀胱癌細胞に選択的に結合するリガンドを選択するのに有用であり得る。

20

【0044】

いくつかの非免疫グロブリンに基づいたエピトープ結合ポリペプチド、ならびにそのようなポリペプチドを作製および使用するための方法は当技術分野において公知である(例えば、

Eklund et al., 2002, "Anti-idiotypic protein domains selected from Protein A-based affibody libraries." *Prot. Struct. Funct. Gen.* 48:454-462; Gunneriusson et al., 1999, "Affinity maturation of a Taq DNA polymerase specific affibody by helix shuffling." *Prot. Eng.* 12:873-878; Hansson et al., 1999, "An in vitro selected binding protein (affibody) shows conformation-dependent recognition of the respiratory syncytial virus (RSV) G protein." *Immunotechnol.* 4: 237-252; Henning et al., 2002, "Genetic modification of adenovirus 5 tropism by a novel class of ligands based on a three-helix bundle scaffold derived from staphylococcal protein A." *Human Gene Therapy* 13:1427-1439; Högbom et al., 2003, "Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(6):3191-3196; Nord et al., 1997, "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain." *Nature Biotechnol.* 15:772-777; Nord et al., 2000, "Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and Taq DNA polymerase." *J. Biotechnol.* 80:45-54; Nord et al., 1995, "A combinatorial library of an alpha-helical bacterial receptor domain." *Prot. Eng.* 8:601-608; Nord et al., 2001, "Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A." *Eur. J. Biochem.* 268:1-10; Nygren et al., 1997, "Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:463-469; Rönmark et al., 2002, "Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of

10

20

protein A.” *Eur. J. Biochem.* 269:2647-2655; Rönmark et al., 2002, “Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*.” *J. Immunol. Meth.* 261:199-211; Wahlberg et al., 2003, “An affibody in complex with a target protein: structure and coupled folding.” *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(6):3185-3190; Gotz et al., 2002, “Ultrafast electron transfer in the complex between fluorescein and a cognate engineered lipocalin protein, a so-called anticalin.” *Biochemistry.* 41:4156-4164; Skerra, 2001, “Anticalins: a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties.” *J Biotechnol.* 2001 74:257-275; Skerra, 2000, “Lipocalins as a scaffold.” *Biochim Biophys Acta.* 1482:337-350; Skerra et al., 2000, “Engineered protein scaffolds for molecular recognition.” *J Mol Recognit.* 13:167-187; Schlehuber et al., 2000, “A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin.” *J Mol Biol.* 297:1105-1120; Beste et al., 1999, “Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold.” *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:1898-1903; PCT国際公開番号 WO97/45538 タイトル “Novel Synthetic Protein Structural Templates For The Generation, Screening And Evolution Of Functional Molecular Surfaces”

10

20

(プレクストリン相同(PH)ドメイン由来の構造的鑄型のフレームワークにおけるペプチド配列のライブラリーの作製に関する)を参照されたい)。

【 0 0 4 5 】

本発明に従って処置され得る癌は、限定されるわけではないが、発症した細胞が、細胞表面において標的とされ得るタンパク質の発現の増加を示すという条件で、HNSCCまたは膀胱癌の任意の型を含む。腫瘍または腫瘍細胞は、例えば、腫瘍組織または細胞の試料を得て、免疫毒素のリガンド部分に結合する試料の能力を測定することにより、本発明の処置方法に対するそれらの感受性を決定するために評価され得る。一つの態様において、癌細胞上のタンパク質はEp-CAMである。Ep-CAMの細胞表面発現は、前癌性または癌性組織において細胞表面Ep-CAMの定常状態レベルを増加させる作用因子により誘導または上昇され得る。

30

【 0 0 4 6 】

従って、本発明は、HNSCCまたは膀胱癌が免疫毒素におけるリガンドにより結合されるタンパク質のレベルを発現させるかどうかを決定するために、本発明の治療方法の前に用いられ得る診断方法およびキットを含む。それゆえに、さらなる態様において、本発明は、以下の段階を含む、頭頸部扁平上皮細胞癌もしくは膀胱癌を処置または予防するための方法を含む：

40

- (1)患者由来の組織試料を、頭頸部扁平上皮細胞癌または膀胱癌に関連しているのはいかと疑われるタンパク質の発現について試験する段階；および
- (2)そのタンパク質が対照と比較して腫瘍試料においてより高いレベルで発現されている場合には、以下を含む免疫毒素の有効量を患者へ投与する段階：
 - (a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；
 - (b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

【 0 0 4 7 】

本発明はさらに、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド、および癌を診断するため

50

のその使用についての使用説明書を含む、頭頸部扁平上皮細胞癌または膀胱癌を診断するためのキットを含む。

【0048】

好ましい非限定的態様において、癌は、免疫毒素の直接的投与による処置を受け入れられる。例えば、標的腫瘍は、皮膚の表面の近くであり得る。もう一つの例において、患部組織は、嚢胞に包まれ得るか、または、限定されるわけではないが、管腔(例えば、膀胱)を含む実質的に封入された腔に見出される。(直接的投与に関するさらなる詳細は開示の後半に提供される。)

【0049】

他の態様において、癌は、免疫毒素の静脈内投与による処置を受け入れられる。

10

【0050】

本発明はまた、手術、および特定の非限定的態様において、癌を処置するための手術の前、手術中または手術後に免疫毒素の有効量を投与する段階を含む、術後合併症のリスクを低減させるための方法を提供する。

【0051】

本発明はまた、HNSCCもしくは膀胱癌の、発生を予防する、再発を予防するもしくは遅らせる、または再発率を低下させるための方法であって、それを必要とする患者に免疫毒素の有効量を直接的に投与する段階を含む方法を提供する。

【0052】

本発明はまた、本発明の免疫毒素を投与する段階を含む、腫瘍または癌を1つまたは複数の他の癌療法に対して感受性を増加させるための方法を提供する。非限定的態様において、他の癌療法は、別のEp-CAM標的化免疫毒素を含む。もう一つの非限定的態様において、他の癌療法は放射線療法を含む。他の癌療法は、免疫毒素の投与の前、投与と同時、および/または投与後に、投与され得る。同時に投与される場合、免疫毒素および他の癌療法は、単一製剤においてまたは別々の製剤において投与され得、かつ別々の場合には、投与の異なる様式によってもよい。従って、1つまたは複数の免疫毒素、および1つまたは複数の他の癌療法の組み合わせは、腫瘍または癌と闘うように相乗的に作用し得る。

20

【0053】

本発明の免疫毒素が、1つまたは複数の他の治療剤に加えて投与される場合、これらの他の癌治療用物質は、限定されるわけではないが、以下を含み得る：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、6-メルカプトプリン、アセグラロン、アクラシノマイシンサ、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、アンシタピン、アンジ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、パチマスタル、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、ピサントレン、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、カルボクオン、カルモフル、カルムスチン、カルピシン、カルジノフィリン、クロラムブシル、クロラファジン、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、クラドリピン、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、ダウノルピシン、デフォスファミド、デメコルシン、デノプテリン、ジアジクオン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルピシン、ドロロキシフェン、ドロモスタノロン、エダトレキセート、エフロミチン、酢酸エリプチニウム、エミテフル、エノシタブ、エピルピシン、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、ホリニン酸、ホルメスタン、ホスフェストロール、フォテムスチン、硝酸ガリウム、ゲムシタピン、ゴセレリン、ヘキセストロール、ヒドロキシウレア、イダルピシン、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、塩酸メクロレタミンオキシド、メドロシキプロゲ

30

40

50

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、メトトレキセート、メツレデパ、ミボプラチン、ミルテフォシン、ミトブロンニール、ミトグアゾン、ミトラクトール、ミトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、モビダモール、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、ノベムピチン、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、フェネスチリン、ピボプロマン、ピボスルファン、ピラルピシン、ピリトレキシム、プリカマイシン、ポドフィリニック酸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、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、ラゾキサソ、ロキニメックス、シゾフィカン、ソブゾキサソ、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、テヌアゾン酸、テストラクトン、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、トリメトトレキセート、トリプトレリン、トロフォスファミド、トロンテカン、ツベルシジン、ウベニメックス、ウラシルマスタード、ウレデパ、ウレタン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ジノスタチン、およびゾルピシン、シトシンアラビノシド、ゲムツツマブ、チオエパ、シクロトスファミド、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキセート、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、ゲムシタピン、ダカルバジン、テモゾアミド)、ヘキサメチルメラミン、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、カンプトセシン、トポテカン、イリノテカン(CAMPTOSAR, CPT-11)、ピンクリスチン、ピンブラスチンのようなピンカアルカロイド)、ポドフィロトキシソ、エピポドフィロトキシソ、VP-16(エトボシド)、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(例えば、ダウノルピシン)、ドキシソルピシンリポソーム、ジヒドロキシアントラシンジオン、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、カペシタピン、カルボプラチン、クロラブシン、シクララビン、ダクリノマイシン、フロクスウリジン、酢酸ラウプロリド、レバミゾール、ロムスリン、メルカプトプリノ、メスナ、ミトランク、ペガスベルガセ、ペントスラチン、ピカマイシン、リウキシルマブ、キャンパス-1、ストラプロゾシン、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、およびビノレルピン。1つまたは複数の癌治療用物質を含む組成物(例えば、FLAG、CHOP)もまた、本発明により企図される。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、ピンクリスチン、ドキシソルピシンおよびプレドニゾンを含む。当技術分野において公知の癌治療用物質の完全リストについては、例えば、The Merck Indexおよびthe Physician's Desk Referenceの最新版を参照されたい。同様に、本発明の免疫毒素は、放射線療法または他の公知の癌治療様式と組み合わせて用いられ得る。

【0054】

併用療法のための薬学的組成物はまた、限定されるわけではないが、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン)、アルパラギナーゼ、バシラスおよびゲラン、ジフテリア毒素、プロカイン、テトラカイン、リポカイン、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、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、抗ヒスタミン剤、制嘔吐剤などを含み得る。

【0055】

実際に、そのような処置を必要とする患者への免疫毒素の有効量の直接的投与は、結果として、臨床的に有意な効力を有する別の癌治療用物質の用量の低減を生じる場合がある。他の癌治療用物質の低減された用量のそのような効力は、免疫毒素を伴う投与なしに、観察されない場合がある。従って、本発明は、1つまたは複数の他の癌治療用物質の低減された用量を投与する段階を含む、腫瘍または癌を処置するための方法を提供する。

【0056】

さらに、そのような処置を必要とする患者への免疫毒素を含む併用療法は、標準的な処置計画のサイクルの期間または数と比較した場合、相対的に短い処置回数を可能にし得る。従って、本発明は、比較的短い期間においておよび/またはより少ない処置サイクルで、1つまたは複数の他の癌療法を施す段階を含む、腫瘍または癌を処置するための方法を提供する。

【0057】

このように、本発明により、免疫毒素および別の癌療法を含む併用療法は、全体的な癌処置の毒性(すなわち、副作用)を低減させ得る。例えば、単独療法または別の併用療法と比較した場合の低減した毒性は、免疫毒素および/もしくは他の癌治療用物質の低減された用量を送達する場合、ならびに/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)を低減させる場合、ならびに/またはサイクルの数を低減させる場合、観察され得る。

【0058】

好ましい態様において、本発明は、HNSCCを患っている患者の臨床状態を処置および/または改善するための方法を提供する。従って、本発明は、(i)HNSCC腫瘍サイズ、増殖速度、浸潤性、悪性度、および/もしくは再発のリスクを減少させる、(ii)処置後の無病期間を長くする、ならびに/または(iii)HNSCCを有する患者において呼吸、嚥下および/もしくは発話の機能を改善させるための方法であって、患者に免疫毒素の有効量を投与する段階を含む方法を提供する。臨床的改善は、例えば、被験者のより少ない困難で呼吸する能力、被験者の液体に対して固体を嚥下する能力、障害の程度、発話の質または量、および臨床分野に公知の他の指標を評価することにより、主観的にまたは客観的に測定され得る。

【0059】

もう一つの好ましい態様において、本発明は、膀胱の表在性移行上皮癌を患っている患者の臨床状態を処置および/または改善するための方法を提供する。従って、本発明は、(i)膀胱癌腫瘍サイズ、増殖速度、浸潤性、悪性度、および/もしくは再発のリスクを減少させる、(ii)他の処置後の無病期間を長くする、ならびに/または(iii)膀胱の移行上皮癌を有する患者において疾患を治すための方法であって、患者に免疫毒素の有効量を投与する段階を含む方法を提供する。臨床的改善は、例えば、臨床分野に公知の様式での、細胞学的評価、細胞検査または生検により測定され得る。

【0060】

先に述べたように、本発明の免疫毒素は、以下のものを含む：
(a)(b)に付着した、癌細胞上のタンパク質に結合するリガンド；
(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

リガンドは、リガンドが毒素と結合または連結され得る任意の手段により、標的に「付着し」得る。例えば、リガンドは、化学的または組換え的手段により毒素に付着し得る。融合体または結合体を調製するための化学的手段は、当技術分野において公知であり、免疫毒素を調製するために用いられ得る。リガンドおよび毒素を結合させるために用いられる方法は、リガンドの癌細胞上の標的分子に結合する能力に干渉することなく、リガンドを毒素と連結することができなければならない。

【0061】

一つの態様において、リガンドおよび毒素は、両方ともタンパク質であり、当技術分野において周知の技術を用いて結合され得る。2つのタンパク質を結合させることができる利用可能な数百個の架橋剤がある(例えば、"Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking". 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arborを参照されたい)。架橋剤は、一般的に、リガンドもしくは毒素上で利用可能か、または挿入される反応性官能基に基づいて選択される。さらに、反応基がない場合には、光活性化可能な架橋剤が用いられ得る。場合によっては、リガンドと毒素の間にスペーサーを含むことが望ましい場合もある。当技術分野において公知の架橋剤は、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)ならびにヘテロ二官能性剤：mマレイミドベン

10

20

30

40

50

ゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドおよびスルフォ-mマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドを含む。

【0062】

リガンドタンパク質-毒素タンパク質融合体はまた、組換えDNA技術を用いて調製され得る。そのような場合、リガンドをコードするDNA配列は、毒素をコードするDNA配列に融合され、結果としてキメラDNA分子を生じる。キメラDNA配列は、リガンド-毒素融合タンパク質を発現させる宿主細胞へトランスフェクションされる。融合タンパク質は、細胞培養物から取り出され、当技術分野において公知の技術を用いて精製され得る。

【0063】

好ましくは、リガンドはEp-CAMに結合する。一つの態様において、免疫毒素は以下を含む： 10

(a)(b)に付着した、癌細胞上のEp-CAMに結合する抗体または抗体断片；

(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素(この免疫毒素は、本明細書では、時々、「Ep-CAM標的化免疫毒素」と呼ばれる)。

特定の態様において、免疫毒素は以下を含む：

(a)(b)に付着した、ヒトEp-CAMの細胞外ドメインに結合し、かつ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体断片；

(b)癌細胞に対して細胞毒性である毒素。

4D5MOC-B抗体由来のCDR配列は、SEQ ID NO:4~9に示されている。

【0064】 20

本発明による適切なEp-CAM標的化免疫毒素は、限定されるわけではないが、VB4-845およびその変異体、MOC31可変領域またはそれらの変異体を含む他の免疫毒素、加えて、Ep-CAMを選択的に結合する他の一本鎖もしくは二本鎖免疫グロブリンまたはそれらの変異体を含む免疫毒素、を含む。

【0065】

一つの態様において、Ep-CAM結合性部分は、完全な免疫グロブリン分子を含む。もう一つの態様において、Ep-CAM結合性部分は、Fab、Fab'、scFv、単一ドメイン抗体断片、またはジスルフィド安定化Fv断片の二量体である。もう一つの態様において、Ep-CAM結合性部分は、可変重鎖、可変軽鎖、Fab、Fab'、scFv、単一ドメイン抗体断片、またはジスルフィド安定化Fv断片を含む。Ep-CAM結合性分子の部分は、1つまたは複数の種由来であり 30
得、より好ましくはヒト種由来の部分を含み、および最も好ましくは、完全にヒトであるかまたはヒト化されている。精製を容易にするように設計された、または毒素への結合のための領域もまた、Ep-CAM結合性部分に、含まれ得るかまたは付加され得る。

【0066】

特定の、非限定的態様において、免疫毒素は、SEQ ID NO:2に示されているVB4-845を含む。他の非限定的態様において、免疫毒素は、VB4-845の変異体を含む。VB4-845変異体は、同じEp-CAMエピトープか、またはVB4-845により結合される実質的に類似したEp-CAMエピトープに結合し、変異体は、生理的狀態下で、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%、Ep-CAMへのVB 4-845の結合を競合的に阻害し得る。VB4-845変異体は、VB4-845と同じシュードモナス外 40
毒素A断片を含み得るか、または同じ外毒素の異なる部分もしくは異なる毒素を含み得る。

【0067】

もう一つの非限定的態様において、免疫毒素は、MOC31の可変領域またはその変異体を含むEp-CAM結合性部分を含む。さらにもう一つの態様において、免疫毒素は、4D5MOCBまたはその変異体を含むEp-CAM結合性部分を含む。Ep-CAMへのこれらの免疫毒素のいずれの結合も、生理的狀態下で、参照MOC31または4D5MOCB抗体との競合により、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%低減され得る。VB4-845の親和力は、生細胞上での間接的フローサイトメトリーを用いて、 $K_D=1.6 \times 10^{-8}$ である。ラインウィーバー-バーク解析(date Notebook: 0935, pa 50

ge 50)は、Benedict et al (1997) J. Immunol. Methods, 201:223-231の方法を用いて行われた。Willuda et al (Cancer Research 59, 5758-5767, 1999)に記載されているように、MOC31Bの親和力は、方法に記載されているRIAおよびBiacoreを用いて測定された、 $K_D = 3.9 \times 10^{-9}$ である。従って、本発明は、 2.0×10^{-8} 未満の解離定数(K_D)を有する免疫毒素を含む。

【0068】

または、免疫毒素は、前節で考察されたもの以外の、ただし、Ep-CAMに選択的に結合する、Ep-CAM結合性部分を含む。好ましい態様において、そのEp-CAM結合性部分の結合親和力は、標準的実験技術により測定される場合、VB4-845、PANOREX(登録商標)、またはMT-201の結合親和力の、少なくとも4桁、好ましくは少なくとも3桁、より好ましくは2桁未満である。非限定的態様において、Ep-CAM結合性部分は、限定されるわけではないが、PANOREX(登録商標)またはMT201のような公知の抗Ep-CAM抗体のEp-CAMへの結合を、生理的状态下で、少なくとも0.1%、1%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%競合的に妨害し得る。

10

【0069】

当業者は、特異性決定残基が同定され得ることを認識しているものと思われる。用語「特異性決定残基」とは、「SDR」としても公知であるが、抗体のパラトープの部分形成する残基、特にCDR残基を指し、任意の他の突然変異とは無関係に、アラニンによるその個々の置換が、エピトープに対する抗体の親和力を、少なくとも10分の1、好ましくは少なくとも100分の1、より好ましくは少なくとも1000分の1に減少させる。親和性におけるこの損失が、エピトープを結合する抗体の能力におけるその残基の重要性を強調する。例えば、Tamura et al., 2000, "Structural correlates of an anticarcinoma antibody: identification of specificity-determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only," J. Immunol. 164(3):1432-1441を参照されたい。

20

【0070】

単一または複数の突然変異の結合活性への、特に結合親和力への効果は、特定の一連のアミノ酸の結合相互作用における重要性(例えば、軽鎖または重鎖CDR2の結合への寄与)を判定するために、同時に評価され得る。アミノ酸突然変異の効果はまた、個々に判定される場合、単一のアミノ酸の寄与を判定するために引き続いて評価され得る。そのような評価は、例えば、インピトロの飽和スキニング(例えば、米国特許第6,180,341号; Hilton et al., 1996, "Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor," J Biol. Chem. 271:4699-4708を参照されたい)、および部位特異的突然変異誘発(例えば、Cunningham and Wells, 1989, "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis," Science 244:1081-1085; Bass et al., 1991, "A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor," Proc Natl Acad Sci. USA 88:4498-4502を参照されたい)により行われ得る。アラニンスキニング突然変異誘発技術において、単一アラニン突然変異が分子における複数の残基に導入され、結果として生じる突然変異体分子が、分子の活性にとって重大な意味を有するアミノ酸残基を同定するために生物活性について試験される。

30

40

【0071】

リガンド-受容体または他の生物学的相互作用の部位はまた、例えば、推定上の接触部位アミノ酸の突然変異と組み合わせでの、核磁気共鳴、結晶学、電子回折、または光親和性標識により測定されるような構造の物理学的分析により同定され得る(例えば、de Vos et al., 1992, "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex," Science 255:306-312; Smith et al., 1992, "Human interleukin 4. The solution structure of a four-helix bundle protein," J Mol. Biol. 224:899-904; Wlodaver et al., 1992, "Crystal structure of human recombinant interleukin-4 at 2.25 Å resolution," FEBS Lett. 309:59-64を参照されたい)。さら

50

に、特定の個々のアミノ酸または一連のアミノ酸の重要性は、関連したポリペプチドまたは類似の結合部位のアミノ酸配列との比較により評価され得る。

【0072】

さらに、当業者は、結合活性の増加がより低い結合親和性を補償し得ることを認識しているものと思われる。Ep-CAMに対する免疫毒素の結合活性は、複数の結合部位を有するEp-CAMの、Ep-CAM結合性部分の結合の強さの測度である。Ep-CAMとEp-CAM結合性部分の間の機能性結合強度は、すべての親和性結合の合計強度を表し、従って、個々の成分が比較的低い親和力で結合する場合もあるが、そのような成分の多量体は、強力な生物学的作用を示し得る。実際、Ep-CAM結合性部位とEp-CAMエピトープの間の複数の相互作用は、相加的な生物学的作用よりずっと高く示し得る、すなわち、多価性の利点は、平衡定数に関して多数桁であり得る。

10

【0073】

一つの非限定的態様において、Ep-CAM結合性部分は、4D5M0CBの結合部分と実質的に類似した構造を有する。実質的に類似した構造は、Ep-CAM分子への免疫毒素のEp-CAM結合性部分の結合点を反映するエピトープマップを参照することにより特徴づけられ得る。

【0074】

同様に、様々な毒素が、本発明によるEp-CAM標的化免疫毒素を設計するために用いられ得る。好ましい態様において、毒素は、限定されるわけではないが、ゲロニン、ブーゲニン、サボリン、リシンA鎖、プリオジン、ジフテリア毒素、レストリクトシンおよびそれらの変異体を含む、リボソーム不活化活性を有するポリペプチドを含む。タンパク質がリボソーム不活化タンパク質である場合、免疫毒素は、癌細胞への結合において、毒素がその細胞に対して細胞毒性であるために、内部に取り込まなければならない。

20

【0075】

特定の好ましい態様において、毒素部分は、シュードモナス外毒素A(「ETA」)またはその変異体の少なくとも毒性部分を含む。特定の態様において、細胞毒性部分は、単独で投与される場合、実質的に細胞に結合することができないETA変異体を含む。さらなる特定の態様において、細胞毒性部分はETA²⁵²⁻⁶⁰⁸を含む。細胞毒性部分は、当技術分野において公知のシュードモナス外毒素もしくはそれらの変異体の1つまたは複数を含む(例えば、Kreitman, 1995, "Targeting pseudomonas exotoxin to hematologic malignancies," Seminars in Cancer Biology 6:297-306; Pastan, 2003, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin A: a short history," Cancer Immunol. Immunother. 52:338-341を参照されたい)。

30

【0076】

シュードモナス外毒素のいくつかの変異体、加えてシュードモナス外毒素変異体を含む構築物を作製および使用方法は、当技術分野において公知である(例えば、米国特許出願第US2003054012号; 米国特許第6531133号; 米国特許第6426075号; 米国特許第6423513号; 米国特許第6074644号; 米国特許第5980895号; 米国特許第5912322号; 米国特許第5854044号; 米国特許第5821238号; 米国特許第5705163号; 米国特許第5705156号; 米国特許第5621078号; 米国特許第5602095号; 米国特許第5512658号; 米国特許第5458878号; 米国特許第5082927号; 米国特許第4933288号; 米国特許第4892827号; 米国特許第4677070号; 米国特許第4545985号; 国際公開公報第W098/20135号, 第W093/25690号; 第W091/18100号; 第W091/18099号; 第W091/09949号; および第W088/02401号;

40

Kondo et al., 1988, "Activity of immunotoxins constructed with modified pseudomonas exotoxin a lacking the cell recognition domain." *J Biol Chem.* 263:9470-9475; Batra et al., 1989, "Antitumor activity in mice of an immunotoxin made with anti-transferring receptor and a recombinant form of pseudomonas exotoxin." *Proc Natl.Acad.Sci.USA* 86:8545-8549; Puri et al., 1991, "Expression of high-affinity interleukin 4 receptors on murine sarcoma cells and receptor-mediated cytotoxicity of tumor cells to chimeric protein between interleukin 4 and Pseudomonas exotoxin." *Cancer Res* 51:3011-3017; Siegall et al., 1992, "Cytotoxicity of chimeric (human murine) monoclonal antibody BR96 IgG, F(ab')₂, and Fab' conjugated to Pseudomonas exotoxin." *Bioconjug-Chem* 3:302-307; Hall et al., 1994, "In vivo efficacy of intrathecal transferrin-Pseudomonas exotoxin A immunotoxin against LOX melanoma." *Neurosurgery* 34:649-655; Kuan and Pai, 1995, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin that target Le y damage

human endothelial cells in an antibody-specific mode: relevance to vascular leak syndrome." Clin Cancer Res 1:1589-1594; Kreitman, 1995, "Targeting pseudomonas exotoxin to hematologic malignancies." Sem Cancer Biol 6:297-306; Kawooya et al., "The expression, affinity purification and characterization of recombinant pseudomonas exotoxin 40 (PE40) secreted from Escherichia coli." J Biotechnol 42:9-22; Kaun and Pai, 1995, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin that target LeY damage human endothelial cells in an antibody-specific mode: Relevance to vascular leak syndrome." Clin Cancer Res 1:1589-1594; Puri et al., 1996, "Preclinical development of a recombinant toxin containing circularly permuted interleukin 4 and truncated Pseudomonas exotoxin for therapy of malignant astrocytoma." Cancer Res 56:5631-5637; Pai et al., 1996, "Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: An antibody linked to Pseudomonas exotoxin." Nature Med. 3:350-353; Pai et al., 1998, "Clinical Trials with pseudomonas exotoxin immunotoxins." Curr Top. Microbiol. Immunol. 234: 83-96; Klimka et al., 1999, "An anti-CD30 single chain Fv selected by phage display and fused to pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA') is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line." British J Cancer 80:1214-1222; Rand et al., 2000, "Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-Pseudomonas exotoxin in patients with high-grade glioma." Clin Cancer Res 6:2157-2165; Leland et al., 2000, "Human breast carcinoma cells express type II IL-4 receptors and are sensitive to antitumor activity of chimeric IL-4-pseudomonas exotoxin fusion protein in vitro and in vivo." Molecular Medicine Today 6:165-178; Tur et al., 2001, "An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines." Int J Mol.Med 8:579-584; Onda et al., 2001, "Cytotoxicity of antiosteosarcoma recombinant immunotoxins composed of TP-3 Fv fragments and a truncated pseudomonas exotoxin A." J Immunother 24:144-150; 18."Synergistic interaction between an anti-p185her-2 pseudomonas exotoxin fusion protein [scfv(frp5)-eta] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2." Schmidt et al., 2001, "Synergistic interaction between an anti-p185HER-2 pseudomonas exotoxin fusion protein [scFv(FRP5)-ETA] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2."Gynecol Oncol

10

20

30

40

80:145-155; Pastan, 2003, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin A: a short history." *Cancer Immunol Immunother* 52:338-341; Li et al., 1996, "Crystal structure of the catalytic domain of Pseudomonas exotoxin A complexed with a nicotinamide adenine dinucleotide analog: implications for the activation process and for ADP ribosylation." *Proc Natl Acad Sci USA*. 9:6902-6906; Kreitman and Pastan, 2003, "Immunobiological treatments of hairy-cell leukaemia." *Best Pract Res Clin Haematol*. 16:117-33.

10

を参照されたい)。

【 0 0 7 7 】

他の非限定的態様において、毒素は、DNAを乱すように働く作用物質を含む。従って、毒素は、限定されるわけではないが、エンジン(例えば、カリケアミシンおよびエスペラミシン)および非エンジン低分子剤(例えば、プレオマイシン、メチジウムプロピル-EDTA-Fe(II))を含み得る。本発明により有用な他の毒素は、限定されるわけではないが、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ジスタマイシンA、シスプラチン、ミトマイシンC、エクテイナシジン、ズオカルマイシン/CC-1065およびプレオマイシン/ペプレオマイシンを含む。

20

【 0 0 7 8 】

他の非限定的態様において、毒素は、チューブリンを乱すように働く作用物質を含む。そのような毒素は、限定されるわけではないが、リゾキシシン/マイタンシン、パクリタキセル、ピンクリスチンおよびピンブラスチン、コルチシン、オーリスタチン ドラスタチン10 MMAE、ならびにペロルシドAを含み得る。

【 0 0 7 9 】

他の非限定的態様において、本発明の免疫毒素の毒素部分は、限定されるわけではないが、Asaley NSC 167780、AZQ NSC 182986、BCNU NSC 409962、Busulfan NSC 750、カルボキシフタラトプラチナ NSC 271674、CBDCA NSC 241240、CCNU NSC 79037、CHIP NSC 256927、クロラムブシル NSC 3088、クロロゾトシン NSC 178248、シス-プラチナ NSC 119875、クロメゾン NSC 338947、シアノモルホリノドキシソルピシン NSC 357704、シクロジソン NSC 348948、ジアンヒドロガラクチオール NSC 132313、フルオロドパン NSC 73754、ヘプスルファミン NSC 329680、ヒカントン NSC 142982、メルファラン NSC 8806、メチルCCNU NSC 95441、ミトマイシンC NSC 26980、ミトゾラミド NSC 353451、ナイトロジェンマスタード NSC 762、PCNU NSC 95466、ピペラジン NSC 344007、ピペラジネジオン NSC 135758、ピボプロマン NSC 25154、ポルフィロマイシン NSC 56410、スピロヒダントインマスタード NSC 172112、テロキシロン NSC 296934、テトラプラチン NSC 363812、チオ-テバ NSC 6396、トリエチレンメラミン NSC 9706、ウラシルナイトロジェンマスタード NSC 34462、およびYoshi-864 NSC 102627を含む、アルキル化剤を含み得る。

30

【 0 0 8 0 】

他の非限定的態様において、本発明の免疫毒素の毒素部分は、限定されるわけではないが、アロコルチシン NSC 406042、ハリコンドリンB NSC 609395、コルチシン NSC 757、コルチシン誘導体 NSC 33410、ドラスタチン10 NSC 376128(NG - オーリスタチン由来)、マイタンシン NSC 153858、リゾキシシン NSC 332598、タキソール NSC 125973、タキソール誘導体 NSC 608832、チオコルチシン NSC 361792、トリチルシステイン NSC 83265、硫酸ピンブラスチン NSC 49842、および硫酸ピンクリスチン NSC 67574を含む、抗有糸分裂剤を含み得る。

40

【 0 0 8 1 】

他の非限定的態様において、本発明の免疫毒素の毒素部分は、限定されるわけではないが、カンプトセシン NSC 94600、カンプトセシンNa塩 NSC 100880、アミノカンプトセシ

50

ン NSC 603071、カンプトセシン誘導体 NSC 95382、カンプトセシン誘導体 NSC 107124、カンプトセシン誘導体 NSC 643833、カンプトセシン誘導体 NSC 629971、カンプトセシン誘導体 NSC 295500、カンプトセシン誘導体 NSC 249910、カンプトセシン誘導体 NSC 606985、カンプトセシン誘導体 NSC 374028、カンプトセシン誘導体 NSC 176323、カンプトセシン誘導体 NSC 295501、カンプトセシン誘導体 NSC 606172、カンプトセシン誘導体 NSC 606173、カンプトセシン誘導体 NSC 610458、カンプトセシン誘導体 NSC 618939、カンプトセシン誘導体 NSC 610457、カンプトセシン誘導体 NSC 610459、カンプトセシン誘導体 NSC 606499、カンプトセシン誘導体 NSC 610456、カンプトセシン誘導体 NSC 364830、カンプトセシン誘導体 NSC 606497、およびモルホリノドキシソルピシン NSC 354646を含む、トポイソメラーゼI阻害剤を含み得る。

10

【0082】

他の非限定的態様において、本発明の免疫毒素の毒素部分は、限定されるわけではないが、ドキシソルピシン 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、ダウノルピシン NSC 82151、デオキシドキシソルピシン 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。

【0083】

他の非限定的態様において、本発明の免疫毒素の毒素部分は、限定されるわけではないが、L-アラノシン NSC 153353、5-アザシチジン NSC 102816、5-フルオロウラシル NSC 19893、アシピシン 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、アンチフォル NSC 633713、アンチフォル NSC 623017、ベーカーの可溶性アンチフォル NSC 139105、ジクロラルルローソン NSC 126771、プレクイナール 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、メトトレキセート NSC 740、メトトレキセート誘導体 NSC 174121、N-(ホスホノアセチル)-L-アスパルテート(PALA) NSC 224131、ピラゾプリン NSC 143095、トリメトトレキセート 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、-TGDR NSC 71851、アフジコリングリシネート NSC 303812、アラ-C NSC 63878、5-アザ-2'-デオキシシチジン NSC 127716、-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、ピラゾロイミダゾール 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代謝拮抗剤を含み得る。

20

30

【0084】

さらに、細胞毒素は、免疫毒素の関連以外の結合を減少させるもしくは抑制するように、または毒性の特異的型を低減させるように、改変され得る。例えば、細胞毒素は、肝臓毒性が低減されるように、等電点を約7.0へ調整するように改変され得る。

【0085】

本発明の免疫毒素を用いる癌処置の臨床的結果は、医者のような当業者により容易に識別できる。例えば、癌の臨床的マーカーを測定する標準的医学検査は、処置の効力の有能な指標であり得る。そのような検査は、限定されるわけではないが、理学的検査、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、腫瘍計算の最長直径、X線写真術、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、感染性発症の評価、併用薬の評価、痛みの評価、血液または血清化学検査、尿検査、CTスキャン、および薬物動態学的分析を含み得る。さらに、免疫毒素および別の癌療法を含む併用療法の相乗効果は、単独療法を受けた患者との比較研究により測定され得る。

40

【0086】

特にHNSCCの場合、呼吸、嚥下、発話、および特定の生活の質の測定における改善は、容易に確かめられる。さらに、HNSCCの寛解は、当業者により認められた基準を用いて評

50

価され得る。例えば、Therasse et al., 2000, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," J Natl Cancer Inst. Feb 2;92(3)205-16を参照されたい。

【 0 0 8 7 】

サイクル中に投与されるべき免疫毒素の有効量は、投与の様式により変わる。直接的投与(例えば、腫瘍内注入)は、免疫毒素の全身性静脈内投与と比較して、免疫毒素のずっと少ない総身体用量を必要とする。局所的投与が結果として、より低い身体用量、およびそれらの状況を生じ得、結果として生じる免疫毒素の低い循環血漿レベルが期待かつ所望されることは、当業者にとって明らかであると思われる。

10

【 0 0 8 8 】

さらに、特定の免疫毒素構築物の有効量は、癌の型、HNSCCの場合における腫瘍のサイズ、癌の病期、患者に対する免疫毒素の毒性、癌細胞を標的とする特異性、加えて、患者の年齢、体重および健康状態を含む、追加的な因子に依存し得る。

【 0 0 8 9 】

一つの態様において、免疫毒素の直接的投与による有効量は、約10~3000、20~900、30~800、40~700、50~600、60~500、70~400、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。他の態様において、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/日の範囲の範囲であり得る。

20

【 0 0 9 0 】

もう一つの態様において、免疫毒素の有効量は、約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。他の態様において、用量は、約100~199、200~399、400~649、650~999、1000~1799、1800~2499、2500~3499、3500~4999、5000~7499、7500~10000、10001~20000マイクログラム/腫瘍/月の範囲であり得る。特定の態様において、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。

30

【 0 0 9 1 】

もう一つの態様において、免疫毒素の有効量は、結果として、免疫毒素の少なくとも約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/cm³の腫瘍内濃度を生じる。他の態様において、結果として生じる免疫毒素の腫瘍内濃度は、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/cm³である。他の態様において、結果として生じる免疫毒素の腫瘍内濃度は、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/cm³である。

【 0 0 9 2 】

もう一つの態様において、免疫毒素の有効量は、結果として、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生じる。他の態様において、結果として生じる免疫毒素の循環濃度は、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。他の態様において、結果として生じる免疫毒素の循環濃度は、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。

40

【 0 0 9 3 】

特定の非限定的態様において、免疫毒素の有効量は、約100マイクログラム/腫瘍/月と3000マイクログラム/腫瘍/月の間、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日あたり単一用量を投与される。単一用量は、約1、

50

2、3、4、5または6ヶ月間連続で、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ヶ月後に開始し得る。処置計画は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ヶ月間の間隔をあけられ得る。

【0094】

特定の非限定的態様において、免疫毒素の有効量は、約20マイクログラム/腫瘍/日と1240マイクログラム/腫瘍/日の間、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、1240マイクログラム/腫瘍/日であり、患者は、1日あたり単一用量を投与される。単一用量は、約1、2、3、4、5、6または7日間連続で、ほぼ毎日(1日または複数日間が任意で飛ばされ得る)、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または6週間後に開始し得る。処置計画は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週間離して間隔をあけられ得る。

10

【0095】

注入容量は好ましくは、腫瘍の型および/または位置に適切である、少なくとも有効量である。単一用量における最大注入容量は、腫瘍容積の約25%と75%の間、例えば、推定される標的腫瘍容積の約4分の1、3分の1、または4分の3であり得る。特定の非限定的態様において、単一用量における最大注入容量は、腫瘍容積の約30%である。

【0096】

もう一つの態様において、免疫毒素は、安全性試験で確立された最大耐量と等価またはより低い、サイクルあたりの総量で腫瘍内に投与されるが、用量は、腫瘍容積に関して標準化される。例えば、被験者は、1マイクログラム/cm³腫瘍と500マイクログラム/cm³腫瘍の間、または約14ピコモル/cm³腫瘍組織と7ナノモル/cm³腫瘍組織の間に達するのに十分な用量を受ける。用量は、腫瘍容積の約20~50%を超えない容量で投与される。免疫毒素は、適した塩溶液に希釈される。例えば、3 cm³の推定容積の腫瘍、14ピコモルの標的用量(1マイクログラム/cm³)、および腫瘍の約1/3の最大注入相対容量について、免疫毒素の3マイクログラムが希釈剤約1 mlで希釈される。

20

【0097】

もう一つの特定の態様において、免疫毒素の有効量は、約20マイクログラム/腫瘍/日と300マイクログラム/腫瘍/日の間、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日あたり単一用量を投与される。単一用量における最大注入容量は、腫瘍容積の約25%と75%の間、例えば、推定される標的腫瘍容積の約4分の1、3分の1または4分の3、であり得る。単一用量は、約5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29または31日間連続で、1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週間後に開始し得る。処置計画は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週間の間隔をあけられ得る。

30

【0098】

一つの特定の非限定的態様において、VB4-845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日あたり単一用量を投与される。単一用量における最大注入容量は、推定された標的腫瘍容積の約3分の1である。単一用量は、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、好ましくは第一サイクルの第一日目から1ヶ月後に、開始し得る。処置計画は、3サイクルを含み、各サイクルは、処置無しの1週間の間隔をあけられ得る。

40

【0099】

もう一つの特定の非限定的態様において、VB4-845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日あたり単一用量を投与される。単一用量における最大注入容量は、推定された標的腫瘍容積の約3分の1である。単一用量は、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週間後に開始し得る。処置計画は、3サイクルを含み、各サイクルは、約1週間の間隔をあけられ得る。

【0100】

50

さらにもう一つの特定の態様において、VB4-845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日あたり単一用量を投与される。単一用量における最大注入容量は、推定された標的腫瘍容積の約3分の1である。単一用量は、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週間後に開始し得る。処置計画は、3サイクルを含み、各サイクルは、約1週間の間隔をあけられ得る。

【0101】

膀胱のような腔への投与について、免疫毒素の有効量は、1週間あたり50 mlにおいて約100マイクログラムと2000マイクログラムの間(約29ナノモル～580ナノモルの濃度と等価)、例えば、1週間あたり50 mlにおいて約100、200、335、500、700、930、1240マイクログラムであり、患者は1週間あたり単一用量を投与され、腫瘍組織は、少なくとも約30分間、免疫毒素に暴露される。例えば、溶液は、約30分間～約3時間、腔へと保持される。特定の非限定的態様において、腫瘍組織は、約1時間、またはより好ましくは約2時間、免疫毒素に暴露される。このサイクル後、次のサイクルは、前回の投与から約1、2、4、6または12週間後、開始し得る。処置計画は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ヶ月間の間隔をあけられ得る。

10

【0102】

実質的に標準より小さいかもしくは大きい嚢胞または膀胱のような、より小さいかまたはより大きい腔について、容量は、腔を拡大しすぎることなしに組織の適切な曝露を保証するように調整され得る。容量が調整される必要がある場合、免疫毒素の有効量は、分子あたり1つの結合部位を有する毒素についての濃度において約20ナノモルと600ナノモルの間であるべきである。

20

【0103】

免疫毒素についての投与量はまた、癌細胞上のタンパク質に対する結合部位のモル濃度として表され得る。例えば、免疫毒素VB4-845は、約69.7 kDaの分子量およびEp-CAMに対する1つの結合部位を有する。二価型式、Fab、Fab'または(Fab')₂断片のような他の免疫毒素型式がポリペプチド鎖におけるアミノ酸の数によって異なる分子量をもち得ることは公知である。類似した型式について、糖部分またはポリエチレングリコールのような追加の群をポリペプチドへ付着させることにより分子量を変え得ることも公知である。異なる毒素または異なる毒素の変異体の使用はまた、結果として、実施例に用いられたVB4-845とは異なる分子量を有する免疫毒素を生じ得る。さらに、結果としてより長いまたはより短い断片を生じるポリペプチド鎖への変化もまたなされ得、およびなお、癌細胞上の選択されたタンパク質への免疫毒素の結合を失うことなくなされ得る。それらすべての変異は、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に対する結合部位のモル数によって免疫毒素の投与量を表すことは有用であり得る。実施例および様々な態様において、投与量は、マイクログラムで表され、VB4-845の分子量に基づいている。以下の式は、マイクログラムを結合部位のモル等価へ変換するための簡単な方法を提供する；
(1×10^{-6} g/1モル免疫毒素あたりのgの数) \times 免疫毒素分子あたりの結合部位の数 = 与えられたITのマイクログラム (1×10^{-6} g) から結合部位のモルへ変えるための換算係数。
分子あたり唯一の結合部位を有する免疫毒素である、VB4-845について、換算は以下の通りになされる：

30

40

マイクログラムの数 $\times 14.3 \times 10^{-12}$ モル/マイクログラム = モル数。

【0104】

例えば、3000マイクログラムが所定の日に腫瘍に注入されることになっている場合、3000マイクログラム $\times 14.3 \times 10^{-12}$ モル/マイクログラム = 42.9×10^{-9} モル結合部位(または42.9ナノモルまたは42,900ピコモル)。用量が、希釈剤におけるかまたは腫瘍組織容積による濃度によって表される場合、免疫毒素の重量をモルへ変換し、次いでこのモル数を希釈剤の容量で割り、結果がモル濃度によって表され得るか、または腫瘍組織の容積で割り、結果が組織の1 cm³(もしくは他の容積単位)あたりのモルとして表され得る。

【0105】

例えば、1240マイクログラムが、50 mlの容量において膀胱へ投与されることになって

50

いる場合：1240マイクログラム x 14.3×10^{-12} モル/マイクログラム = 約 18×10^{-12} モル結合部位、および 18×10^{-12} モル/50 ml (または0.05リットル) = 約 355×10^{-9} M (または355ナノモル)。

【0106】

サイクル中に免疫毒素と共に投与される別の癌治療用物質の有効量もまた、投与の様式によって変わる。1つまたは複数の癌治療用物質は、腫瘍内に、または他の投与様式により、送達され得る。典型的には、化学療法剤は、全身性に投与される。標準的投与量および処置計画は、当技術分野において公知である(例えば、the Merck Indexおよびthe Physician's Desk Referenceの最新版を参照されたい)。

【0107】

例えば、一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約200~4000 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのダカルバジンを含む。好ましい態様において、用量は、700~1000 mg/m²/サイクルの範囲である。

10

【0108】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約25~50 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのフルダリンを含む。

【0109】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約200~2000 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのシトシンアラビノシド(Ara-C)を含む。

【0110】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約1.5~7.5 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのドセタキセルを含む。

20

【0111】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約5~15 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのパクリタキセルを含む。

【0112】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約5~20 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのシスプラチンを含む。

【0113】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約5~20 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのフルオロウラシルを含む。

30

【0114】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約2~8 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのドキソルピシンを含む。

【0115】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約40~160 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのエピドフィロトキシンを含む。

【0116】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約50~200 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのシクロホスファミドを含む。

40

【0117】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約50~75、75~100、100~125、または125~150 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのイリノテカンを含む。

【0118】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約3.7~5.4、5.5~7.4、7.5~11、または11~18.5 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのピンプラスチックを含む。

【0119】

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.7~1.4または1.5~2 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのピンクリスチンを含む。

【0120】

50

さらにもう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約3.3~5、5~10、10~100、または100~1000 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのメトトレキセートを含む。

【0121】

免疫毒素との併用療法は、追加の癌治療用物質の投与に対して癌または腫瘍の感受性を増加させ得る。従って、本発明は、低減された用量の癌治療用物質の前に、引き続いて、もしくは同時に、免疫毒素の有効量を投与する段階を含む、癌を予防する、処置する、および/または癌の再発を予防するための併用療法を企図する。例えば、免疫毒素での最初の処置は、癌治療用物質の用量での引き続く抗原投与に対する癌または腫瘍の感受性を増加させ得る。この用量は、癌治療用物質が単独または免疫毒素の非存在下において投与される場合の標準投与量の低い範囲に、近いかまたはより下である。同時に投与される場合、免疫毒素は、癌治療用物質とは別々に、および任意で、異なる投与様式によって、投与され得る。

10

【0122】

従って、一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約5~10、11~20、21~40、または41~75 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのシスプラチン、例えば、PLATINOLまたはPLATINOL-AQ(Bristol Myers)を含む。

【0123】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約2~3、4~8、9~16、17~35または36~75 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのカルボプラチン、例えば、PARAPLATIN(Bristol Myers)を含む。

20

【0124】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.25~0.5、0.6~0.9、1~2、3~5、6~10、11~20、または21~40 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのシクロホスファミド、例えば、CYTOXAN(Bristol Myers Squibb)を含む。

【0125】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.5~1、2~4、5~10、11~25、26~50または51~100 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのシタラビン、例えば、CYTOSAR-U(Pharmacia & Upjohn)を含む。もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約5~50 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのシタラビンリポソーム、例えば、DEPOCYT(Chiron Corp.)を含む。

30

【0126】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約15~250 mg/m²/サイクルの範囲であるか、または約0.2~2 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのダカルバジン、例えば、DTICまたはDTICDOME(Bayer Corp.)を含む。

【0127】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.1~0.2、0.3~0.4、0.5~0.8、または0.9~1.5 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのトポテカン、例えば、HYCAMTIN(SmithKline Beecham)を含む。もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約5~9、10~25、または26~50 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのイリノテカン、例えば、CAMP TOSAR(Pharmacia & Upjohn)を含む。

40

【0128】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約2.5~5、6~10、11~15、または16~25 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのフルダラビン、例えば、FLUDARA(Berlex Laboratories)を含む。

【0129】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約200~2000 mg/m²/サイクル、300~1000 mg/m²/サイクル、400~800 mg/m²/サイクル、または500~700 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのシトシンアラビノシド(Ara-C)を含む。

【0130】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約6~10、11~30または31~60 mg/m

50

²/サイクルの範囲である用量でのドセタキセル、例えば、TAXOTERE(Rhone Poulenc Rorer)を含む。

【0131】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約10~20、21~40、41~70、または71~135 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのパクリタキセル、例えば、TAXOL(Bristol Myers Squibb)を含む。

【0132】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.5~5 mg/kg/サイクル、1~4 mg/kg/サイクル、または2~3 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのフルオロウラシルを含む。

【0133】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約2~4、5~8、9~15、16~30、または31~60 mg/kg/サイクルの範囲である用量でのドキシソルピシン、例えば、ADRIAMYCIN(Pharmacia & Upjohn)、DOXIL(Alza)、RUBEX(Bristol Myers Squibb)を含む。

【0134】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約3.5~7、8~15、16~25、または26~50 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのエトポシド、例えば、VEPESID(Pharmacia & Upjohn)を含む。

【0135】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.3~0.5、0.6~0.9、1~2、または3~3.6 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのビンブラスチン、例えば、VELBAN(Eli Lilly)を含む。

【0136】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6または0.7 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのピンクリスチン、例えば、ONCOVIN(Eli Lilly)を含む。

【0137】

もう一つの態様において、追加の癌治療用物質は、約0.2~0.9、1~5、6~10、または11~20 mg/m²/サイクルの範囲である用量でのメトトレキセートを含む。

【0138】

もう一つの態様において、免疫毒素は、限定されるわけではないが、リツキサン、リツキシマブ、キャンパス-1、ゲムツツマブおよびトラストツマブを含む、少なくとも1つの他の免疫治療用物質と組み合わせて投与される。

【0139】

もう一つの態様において、免疫毒素は、限定されるわけではないが、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)、アンチトロンピン、フィブロネクチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端のタンパク分解性断片、プロラクチンの16 kDa タンパク分解性断片、血小板因子-4の7.8 kDa タンパク分解性断片、血小板因子-4の断片に対応する13アミノ酸ペプチド(Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083)、コラーゲンIの断片に対応する14-アミノ酸ペプチド(Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511)、トロンボスポンジンIの断片に対応する19アミノ酸ペプチド(Tolsma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511)、SPARCの断片に対応する20-アミノ酸ペプチド(Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334)、および薬学的に許容されるそれらの塩を含む、それらの変異体を含む1つまたは複数の抗血管形成剤と組み合わせて投与される。

【0140】

もう一つの態様において、免疫毒素は、放射線療法と組み合わせて投与される。治療はまた、手術および/または化学療法を含み得る。例えば、免疫毒素は、放射線療法ならびにシスプラチン(Platinol)、フルオロウラシル(5-FU、Aducil)、カルボプラチン(Paraplatin)、および/またはパクリタキセル(Taxol)と組み合わせて投与され得る。免疫毒素で

10

20

30

40

50

の処置は、より低い線量の放射線の使用および/またはより頻度の少ない放射線処置を可能にし、例えば、結果として望ましくない体重減少または脱水症を生じる可能性のある嚥下機能を妨げる重度の咽喉炎の発生を低減させ得る。

【0141】

もう一つの態様において、免疫毒素は、限定されるわけではないが、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、リンフォトキシン、インターフェロン、マクロファージ炎症タンパク、顆粒球単球コロニー刺激因子、インターロイキン(限定されるわけではないが、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)、および薬学的に許容されるそれらの塩を含む、それらの変異体を含む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

【0142】

さらにもう一つの態様において、免疫毒素は、限定されるわけではないが、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、 α -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、および突然変異した腫瘍特異性抗原を含む癌ワクチンと組み合わせて投与される。

【0143】

さらにもう一つの態様において、免疫毒素は、ホルモン療法と合わせて投与される。ホルモン治療用物質は、限定されるわけではないが、ホルモンのアゴニスト、ホルモンのアンタゴニスト(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)を含む。

20

【0144】

さらにもう一つの態様において、免疫毒素は、癌を処置または予防する遺伝子治療プログラムと合わせて投与される。

【0145】

さらにもう一つの態様において、Ep-CAM標的化免疫毒素は、対象となる腫瘍細胞においてEp-CAMの発現を増加させる1つまたは複数の作用物質と組み合わせて投与される。Ep-CAM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されるように増加する。例えば、作用物質は、Ep-CAM抗原エンドサイトーシスの正常なサイクルを阻害し得る。そのような併用療法は、単独または他の癌治療用物質もしくは放射線療法と共にEp-CAM標的化免疫毒素の臨床的効力を向上させ得る。特定の非限定的態様において、腫瘍細胞においてEp-CAM発現を増加させる作用物質は、酒石酸ピノレルピン(Navelbine)および/またはパクリタックス(Taxol)である。例えば、Thurmond et al., 2003, "Adenocarcinoma cells exposed in vitro to Navelbine or Taxol increase Ep-CAM expression through a novel mechanism." *Cancer Immunol Immunother.* Jul;52(7):429-37を参照されたい。

30

【0146】

併用療法は、このように、投与される免疫毒素および/または追加の癌療法に対する癌または腫瘍の感受性を増加させ得る。この様式において、より短い処置サイクルがそれにより毒性事象を低減させている可能性がある。従って、本発明は、癌を処置または予防するための方法であって、それを必要とする患者に、短い処置サイクルのために、免疫毒素および少なくとも1つの他の癌治療用物質の有効量を投与する段階を含む方法を提供する。サイクル期間は、約1~30、2~27、3~15、4~12、5~9、または6~8日間の範囲であり得る。サイクル期間は、使用されている特定の癌治療用物質によって変わり得る。本発明はまた、連続的もしくは不連続的投与、またはいくつかの部分投与へ分割された一日量を企図する。特定の癌治療用物質についての適切なサイクル期間は、当業者によって認識されているものと思われ、本発明は、各癌療法についての最適な処置スケジュールの継続的な評価を企図する。当業者のための特定のガイドラインは当技術分野において公知である。例えば、Therasse et al., 2000, "New guidelines to evaluate the response to tre

40

50

atment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," J Natl Cancer Inst. Feb 2;92(3):205-16を参照されたい。

【0147】

または、より長い処置サイクルが望ましい場合もある。従って、サイクル期間は、約10~56、12~48、14~28、16~24、または18~20日間の範囲であり得る。サイクル期間は、使用されている特定の癌療法によって変わり得る。

【0148】

本発明は、単一の癌療法または一連の癌療法が投与される、少なくとも1つのサイクル、好ましくは複数のサイクルを企図する。サイクルの適切な総数およびサイクル間の間隔は、当業者に認識されているものと思われる。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日間であり得る。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日間であり得る。本発明は、各免疫毒素および追加の癌療法についての最適な処置スケジュールの継続的な評価を企図する。

10

【0149】

本発明の一つの非限定的態様において、免疫毒素は、より短い期間、高用量(例えば、結果として約100、200、300、400、500または1000マイクログラム/cm³より高くなる用量)で直接的に投与される。従って、一つの子非限定的な特定の態様において、免疫毒素は、2週間、週に1回、結果として少なくとも約200、300、400または500マイクログラム/cm³の免疫毒素の腫瘍内濃度を生じる用量で腫瘍内に投与される。

20

【0150】

本発明による免疫毒素は、薬学的組成物または薬物に含まれ得る。直接的投与に適合した薬学的組成物は、限定されるわけではないが、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および組成物を、対象とするレシピエントの血液と実質的に等張にする溶質をさらに含み得る、凍結乾燥された粉末または水性もしくは非水性の滅菌した注射可能溶液もしくは懸濁液を含む。そのような組成物に存在し得る他の成分は、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油を含む。即時的注射溶液および懸濁液は、滅菌した粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。免疫毒素は、限定されるわけではないが、患者への投与の前に滅菌した水または食塩水で元に戻される凍結乾燥された粉末として供給され得る。

30

【0151】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。適した薬学的に許容される担体は、薬学的組成物の生物活性の実効性に干渉しない、本質的に化学的不活性かつ無毒性の組成物を含む。適した薬学的担体の例は、限定されるわけではないが、水、食塩水、グリセロール溶液、エタノール、塩化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(DOTMA)、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンおよびリポソームを含む。そのような組成物は、患者への直接的投与のための形状を供給するために、成分の治療的有効量を担体の適切な量と共に含むべきである。

【0152】

もう一つの態様において、薬学的組成物は、免疫毒素および1つまたは複数の追加の癌治療用物質を、任意で薬学的に許容される担体中に含む。

40

【0153】

組成物は、限定されるわけではないが、塩酸、リン酸、酢酸、蔞酸、酒石酸などに由来するもののような遊離アミノ基で形成されたもの、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のような遊離カルボキシル基で形成されたものを含む、薬学的に許容される塩の形であり得る。

【0154】

本発明の様々な態様において、薬学的組成物は、例えば、手術中の局所的注入、局所適用(例えば、手術後の創傷被覆材と共に)、注射、カテーテル法、坐剤法、またはインプラ

50

ント法により、腫瘍の領域へ直接的に投与される。インプラントは、シラスティック膜のような膜または繊維を含む、有孔の、無孔のまたはゼラチン状の材料からなり得る。坐剤は、一般的に、0.5%重～10%重の範囲で活性成分を含む。

【0155】

他の態様において、放出制御システムが標的腫瘍に近接して配置され得る。例えば、マイクロポンプは、腫瘍の領域へ直接的に制御された用量を送達し、それにより、薬学的組成物のタイミングおよび濃度を緻密に制御し得る(例えば、Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138を参照されたい)。

【0156】

本発明はまた、免疫毒素の有効量を、任意で、1つまたは複数の他の癌治療用物質と組み合わせて、HNSCCまたは膀胱癌を処置するためのその使用についての使用説明書と共に含むキットを提供する。

10

【0157】

本発明の一つの局面に従って、免疫毒素および/または他の癌治療用物質は、直接的投与により患者へ送達される。従って、免疫毒素および/または他の癌治療用物質は、限定されるわけではないが、腫瘍への1回もしくは複数回の直接的注入により、腫瘍への連続的もしくは不連続的灌流により、免疫毒素の貯蔵器の導入により、腫瘍への徐放性装置の導入により、腫瘍への徐放性製剤の導入により、および/または腫瘍上への直接的適用により、投与され得る。「腫瘍へ」の投与様式によって、腫瘍の領域へ、または腫瘍の領域へ実質的に直接流入する血管もしくはリンパ管への、免疫毒素および/または他の癌治療用物質の導入もまた企図される。それぞれの場合、薬学的組成物は、少なくとも終点に達するのに十分な量で投与され、必要な場合には、薬学的に許容された担体を含む。

20

【0158】

免疫毒素は腫瘍内に投与され得るが、それに対して任意の他の癌治療用物質も他の投与様式により(例えば、静脈内に)、患者へ送達されることが企図される。さらに、複数の癌治療用物質が患者へ送達されることが意図される場合、免疫毒素、および他の癌治療用物質のうちの1つまたは複数は、腫瘍内に送達され得るが、それに対して他の治療用物質は、他の投与様式により(例えば、静脈内および経口で)送達され得る。

【0159】

特定の非限定的態様において、免疫毒素および/または他の癌治療用物質は、例えば図1に示されたテンプレートに従う、腫瘍内注入により投与され得る(Khuri et al., 2000, "A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer," Nature Med. 6:879-885を参照されたい)。免疫毒素および/または他の癌治療用物質は、緩衝水溶液、例えば、リン酸緩衝食塩水(「PBS」)を含んで懸濁され得る。免疫毒素を含む懸濁液の容量は、注入されるべき腫瘍の推定容積の約5、15、25、35、45、55、65、75、85、または95%未満であり得る。特定の態様において、免疫毒素を含む懸濁液の容量は、標的腫瘍の推定容積の約30、40または50%未満である。

30

【0160】

免疫毒素および/または他の癌治療用物質のそれぞれの投与について、皮膚または口腔粘膜の少なくとも1回の穿刺は、推定される腫瘍中心から腫瘍周囲までの距離の約10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%の部位になされる。直接的注入による免疫毒素の投与は、結果として、腫瘍の中心から放射状に広がる1つまたは複数の針跡を生じ得る。特定の非限定的態様において、針跡は、実質的に図1に描かれているように配向され得る。

40

【0161】

膀胱癌について、免疫毒素は、実施例15に記載されているようにカテーテルにより導入され得る。

【0162】

本発明の非限定的態様において、医学的画像技術は、腫瘍へ直接的な免疫毒素の投与を

50

先導するために用いられる。これは、特に、頭頸部の何かの腫瘍に、およびアクセスするのが困難である他の型の腫瘍に有用である。これらの場合、投与道具(針、カテーテル、徐放性装置など)の画像ガイダンスは、血管、神経路などのような重要な解剖学的構造への損傷または投与を防ぐために、および免疫毒素が3次元腫瘍中に十分に分布することを保証するために用いられる。医学的画像ガイダンス技術は、医学分野で周知であり、超音波、CTスキャン、X線およびPETスキャンガイダンスを含む。

【0163】

本発明は、以下の例示的教示により、より理解されるものと思われる。本明細書に示された実施例は、本発明を限定することを意図しない。

【0164】

実施例

実施例1. VB4-845免疫毒素

VB4-845は、シュードモナス外毒素Aの切断型(ETA 252-608)に融合される一本鎖Fv組換えヒト抗体断片からなる免疫毒素である。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、4D5MOCB、由来である¹⁶⁻¹⁸。

【0165】

外毒素Aは、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の病原性株により放出される毒性タンパク質の一つである¹⁹。それは、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²⁰。外毒素Aは、感受性のある哺乳動物細胞へ転位置され、分子の共有結合性変化がそれを酵素的活性にする。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ニリン酸リボシル化することにより、細胞におけるタンパク質合成を不可逆性に遮断し、アポトーシスを誘導する⁴。この構築に用いられるETAの切断型は、細胞死を誘導するためのドメインをまだ含むが、細胞結合ドメインを欠損し、それにより、ETA部分が、免疫毒素の抗体部分によるターゲティングなしに細胞に入るのを防ぐ。

【0166】

ETAの切断型(ETA₂₅₂₋₆₀₈)をコードする遺伝子配列、およびEp-CAM結合性4D5MOCB scFv配列は、VB4-845を構築するために用いられた。分子は、図2に描かれているように、精製のためにN末端およびC末端の両方のHis₅テールを含む。VB4-845のDNAおよびアミノ酸配列は、図3A~DならびにSEQ ID NO:1および2に描かれている。Ep-CAM結合性部分は、SEQ ID NO:3に示されている。CDR配列は、SEQ ID NO:4~9に示されている。

【0167】

結果として生じるタンパク質は、Ep-CAMに対する親4D5MOCBの特異性を保持する。そのタンパク質のための発現ベクター、pING3302(Xoma Ireland LtdからのプラスミドpING3302は発現ベクターの構築のために用いられた)は、E104大腸菌(*E. coli*)宿主株により保有かつ発現される。タンパク質は長さが648個のアミノ酸であり、69.7キロダルトン(kDa)の推定の分子量を有する。SDS-PAGE(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)分析において、VB4-845は、約70 kDaの単一のタンパク質バンドとして観察される。タンパク質は、約5.9の等電点(pI)を有し、透明な溶液を形成する水溶性である。VB4-845の調製に関するさらなる詳細は、下記の実施例9に提供されている。

【0168】

VB4-845は、インビトロで、タンパク質合成を特異的に阻害し、Ep-CAM陽性癌細胞の生存度を低下させることが示された。マウスへの全身性投与に関して下の実施例5に実証されているように、VB4-845は、肺癌、大腸癌または扁平上皮癌由来の腫瘍異種移植片の増殖を抑制し、かつ退行を誘導した。VB4-845は、親の一本鎖断片(scFv)と類似した器官分布を示し、5.4の腫瘍：血液の比率で、Ep-CAM陽性腫瘍異種移植片へ優先的に局在化した。

【0169】

実施例6に実証されているように、マウスにおける腫瘍周囲モデルは、VB4-845処置された動物において腫瘍増殖の有意な抑制を示した。実際、このモデルにおいて、処置の開始

10

20

30

40

50

時点においてより小さい腫瘍容積(90 mm³)を有する2匹のマウスは、完全な腫瘍退行を示し、実験期間中、腫瘍無しのみであった(下記参照)。すべての効力研究において、マウスは処置に十分耐え、薬物関連の死亡、および毒性を示唆する有意な臨床的観察はなかった。これらのデータは、固形腫瘍の標的化治療としてのVB4-845の直接的投与を支持している。

【0170】

ヒトにおけるVB4-845のサイクルあたりの用量範囲は、4マイクログラム/キログラム、すなわち、効力研究で、静脈内および腫瘍周囲のモデルの両方において、マウスに与えられた用量の113分の1、であり得る(表7の脚注1参照)。ヒトにおける1ヶ月間の曝露量は、5日間のコースに渡って微量用量として投与されうり、全腫瘍領域中で1週間につき1用量の累積的効果となる。

【0171】

実施例2. 剤形および組成物

VB4-845は、新生薬物として研究され、腫瘍細胞系に結合すること、およびいくつかのモデル系において腫瘍増殖を防ぐことにおいて有効であることが見出された。VB4-845は、20 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl、pH 7.2に1 mg/mlで調合され、22-ゲージ針で腫瘍内経路により投与され得る。それを、1 mlのホウ珪酸ガラスのバイアルに、灰色のブチルゴム栓およびアルミニウムのオーバーシールで閉じて、パッケージする。2つの充填サイズが現在利用できる: 0.1 mLおよび0.2 mL(それぞれ、0.1 mgおよび0.2 mgのVB4-845)。薬物は、-70 で保存される。最終製品は残しておかず、単回使用のみである。

【0172】

製品サンプルは、書面の認可された標準的操作手順に従って、ラベルを貼られ、保存され、輸送される。製品は、冷凍条件下で(例えば、ドライアイス上で)輸送され、例えば、研究現場において、温度について定期的にモニターされる、制限付きで利用できる管理された-70 フリーザー内に維持され得る。製品は、使用の時までこの状態で維持され得る。

【0173】

実施例3. VB4-845の安定性

-70 で保存された場合の製品の貯蔵寿命は、少なくとも6ヶ月である。生理的状態(例えば、PBS中で37、4時間の製剤のインキュベーション)において、免疫毒素分子の大部分(少なくとも91%)は、なお、適正な分子量(約70 kDa)の単量体として溶出される。VB4-845の量は、時間と共にゆっくり減少し、最初のタンパク質の約47%も、37 での20時間後に単量体型で存在している。同様の結果は、ヒト血清における^{99m}Tc標識されたVB4-845のインキュベーションにおいて得られ、インビボ適用としての免疫毒素の適合性をさらに確認する。

【0174】

短期安定性研究は、臨床的現場における日常的操作下で調査の製品の固有安定性を評価するために行われた。VB4-845は、室温および2~8 で、その標準的製剤において評価された。さらに、VB4-845は、800 mM 尿素を含むおよび含まないリン酸緩衝食塩水の注入緩衝液に調製され、室温で6時間まで試験された。短期安定性研究はまた、VB4-845への繰り返される凍結-解凍サイクルの影響を評価した。

【0175】

VB4-845は、すべての短期安定性研究に渡って、その生物活性を保持することが見出された。VB4-845を、投与の日に-70 フリーザーから引き出し、室温で解凍させ得る。VB4-845は、-70 保存状態からのその取り出しから4~6時間すると、注入緩衝液へ調製され得る。いったん、製品がリン酸緩衝食塩水の注入緩衝液へ調合されたならば、製品は、調製の6時間以内に患者へ注入され得る。製品が適切なタイムコース内に用いられないことができない場合には、投与用の在庫から新しいバイアルを入手する。

【0176】

VB4-845は、室温で少なくとも20時間、および冷蔵された状態(例えば、2~8)にして

おく場合には、少なくとも24時間、その最初のパッケージングにおいて安定している。製品が用いられない場合には、特に、最初の容器/密封方式が損なわれないままであるならば、後での使用のために再凍結され得る。

【0177】

ヒト血漿、血清および尿を含む体液における短期安定性研究は、VB4-845が少なくとも16時間、その結合性質および細胞毒性を保持することを実証した。

【0178】

実施例4. インビトロ薬理学

研究は、腫瘍細胞培養物および動物におけるインビボ有効性モデルへのVB4-845のインビトロ細胞毒性を測定するために行われた。

【0179】

Ep-CAM陽性腫瘍細胞の増殖を特異的に抑制するVB4-845の能力を測定するために、MTT(3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド)アッセイが行われた⁵³。MTTアッセイは、肝細胞においてのみ含まれる酵素によるテトラゾリウム塩のホルマザンへの還元をモニターすることにより、細胞の生存度を測定する。様々な濃度のVB4-845が細胞培養物へ加えられ、細胞増殖が72時間に渡ってモニターされた。

【0180】

VB4-845は、Ep-CAM陽性細胞系(例えば、HT29-結腸直腸癌、MCF7-乳腺癌、CAL27-扁平上皮癌、SW2-小細胞肺癌)に対して特異的な細胞毒性であり、Ep-CAM陰性細胞系RL(例えば、非ホジキンリンパ腫)およびCOL0320(結腸直腸癌)の増殖に影響を及ぼさない。SW2、CAL27およびMCF7細胞は、VB4-845の細胞毒性効果に対して同じ程度で感受性があることが見出され、それらの増殖は、たった0.005 pMのIC₅₀で抑制された。HT29細胞は、最も感受性が低いことが見出された(0.2 pMのIC₅₀)。

【0181】

シュードモナス外毒素は、伸長因子2のADP-リボシル化により哺乳動物細胞においてタンパク質合成を不可逆的に阻害する²¹⁻²²。VB4-845の細胞毒性活性がEp-CAM陽性腫瘍細胞系においてタンパク質合成を阻害するその能力と相関することを実証するために、放射性標識された代謝産物、³Hロイシン、のEp-CAM陽性SW2細胞への取り込みをモニターした⁵³。

【0182】

SW2細胞のVB4-845での合計30時間の処置において、タンパク質合成が0.01 pMのIC₅₀で阻害された。この効果は、細胞毒性アッセイにおいて以前に測定されたものと類似した用量反応関係を示した。Ep-CAM陰性対照細胞系、RL、におけるタンパク質合成は影響を及ぼされなかった。

【0183】

実施例5. VB4-845の全身投与のインビボ研究

大きな確立されたEp-CAM陽性SW2(小細胞肺癌)、HT29(結腸直腸癌)またはCAL27(HNSCC)腫瘍異種移植片を有するマウスを、2つの異なる投与計画: 5 μgが3週間隔日に与えられる(45 μg合計); または10 μgが1週間隔日に与えられる(30 μg合計)、のうちの1つを用いてVB4-845で静脈内(i.v.)に処置した。Ep-CAM陰性COL0320腫瘍異種移植片を有するマウスを対照として用いた。腫瘍サイズを、研究のコース(処置の開始後33~51日間)に渡ってモニターした⁵³。

【0184】

結果は、表4に要約されている。マウスは処置に十分耐え、薬物関連の死亡、および毒性を示唆する有意な臨床的観察はなかった。図4に示されているように、すべてのEp-CAM陽性腫瘍の増殖の有意な抑制は、どちらの投与計画でマウスを処置しても達成された。SW2異種移植片を有するマウスの処置は、結果として、最初のサイズの最高20%までの腫瘍容積の縮小、およびモニターされた期間の終わりにおいて最終的な2.6倍サイズ増加への増殖のわずかな再開を生じた。同様の効果は、CAL27腫瘍の処置において達成され、最初の容積の最高60%まで縮小した。処置の開始後50日目、中央値腫瘍容積は、最初のサイズの1

10

20

30

40

50

.4倍を超えなかった。5 μ g投与計画で処置された7匹のマウスのうちの2匹は、完全な腫瘍退行を示し、腫瘍なしのままであった。CAL27およびSW2のどちらも、2つの処置計画に対するそれらの腫瘍反応において有意な差を示さなかった。

【0185】

HT29腫瘍について、強い増殖抑制(最初の容積の0.7倍)が5 μ g投与計画で達成された。CAL27腫瘍についてすでに観察されたように、7匹のうちの3匹は、それらのHT29腫瘍の完全な退行を示した。10 μ g計画の効力は、比較上、より低く、これらの腫瘍について長期処置がより効果的であることを示した。VB4-845の抗腫瘍効果は、Ep-CAM陰性COL0320対照腫瘍を有するマウスにおいて見られなかった。

【0186】

実施例6. VB4-845の直接的投与のインビボ研究

胸腺欠損マウスに、 10^7 個のCAL27 HNSCC扁平上皮癌細胞を側方の横腹へ皮下に(s.c.)注射した⁵⁴。腫瘍が確立した4週間後、マウスを、それぞれ150 mm³の平均腫瘍容積を有する2つの群へ無作為に分けた。8匹のマウスを、3週間隔日(月曜日/水曜日/金曜日)に与えられる5 μ gの用量で(総量45 μ g)のVB4-845の腫瘍周囲の注入により処置した。注入ごとに、免疫毒素の5 μ gが2~3個の注入箇所へ分布した。対照マウス(n=5)は未処置のままであった。

【0187】

表5に要約されているように、腫瘍増殖の有意な抑制は、処置された動物に観察された(図5)。処置の開始時点においてより小さな腫瘍容積(90 mm³)を有する2匹のマウスは、完全な腫瘍退行を示し、実験期間中、腫瘍なしのままであった。免疫毒素処置の間および後において、毒性は観察されなかった。

【0188】

実施例7. 体内分布

一般的に、文献は、scFvが、動物モデルにおいて、循環から迅速に除去され、初期時点で高い腫瘍対バックグラウンド比(腫瘍における特異的な保持)を与えることを示している²³⁻²⁵。平均の $T_{1/2}$ は、2~4時間であるが²⁶⁻²⁷、分子の構成²⁸および投与経路に依存してより長くあり得る(>8時間)。最高の取り込みは、分子に依存するが、全身注入後、腎臓および肝臓に起こる傾向がある。

【0189】

VB4-845の体内分布は、対側性横腹に確立されたEp-CAM陽性SW2およびEp-CAM陰性COL0320の異種移植片を有するマウスにおいて評価された⁵³。SW2腫瘍に検出された放射性標識VB4-845の最大用量は、4時間後の2.93%ID/gであり、その後、24時間後および48時間後、それぞれ、1.95%ID/gおよび1.13%ID/gへ徐々に減少した。対照的に、COL0320対照腫瘍におけるVB4-845は、30分後、1.65%ID/gの最大用量で局在し、その後、4時間後、1.06%ID/gまで急速に減少し、48時間後、バックグラウンドレベルだけを示した。

【0190】

VB4-845は、親のscFvより遅い血液クリアランスを示した。24時間後、血液中のVB4-845の総量は、0.42%ID/gであり、親scFv(0.28%ID/g)より1.5倍大きかった。さらに、SW2腫瘍における免疫毒素の局在化もまた、親scFvと比較して遅れ、VB4-845の分布により、48時間後、5.38の腫瘍：血液比率が明らかにされ、24時間後のscFvで得られる比率に匹敵した。各時点において、VB4-845は、COL0320対照腫瘍と比較してEp-CAM陽性SW2腫瘍において優先的に集積し、SW2：COL0320比率は1.28と2.95の間を変動した。これは、VB4-845が、特異的な抗体-抗原相互作用および細胞取り込みによりEp-CAM陽性腫瘍に保持されたことを示している。COL0320対照細胞における辺縁の集積は、腫瘍においてしばしば見出される血管透過性における増加による可能性がある。これらの動物における正常組織の分析により、VB4-845がまた、腎臓、脾臓、肝臓において、およびより低い程度に、骨において、局在することが明らかにされた。

【0191】

マウスにおける薬物動態学および有効性モデルの実施中になされた臨床的観察は、そ

10

20

30

40

50

の製品が、毒性を示す何の臨床的徴候もなく、耐受性が良かったことを示している。すべての動物が研究のコースの全期間に渡って生き、薬物関連の死亡はなかった。

【0192】

実施例8. 毒性研究

非GLP研究が、薬物動態学的的研究中に放射性標識VB4-845の局在化の最高レベルを有することが見られた3つの組織、肝臓、脾臓および骨における、VB4-845の段階的に増加する用量の可能性のある毒性を評価するために行われた。

【0193】

結果は表6に示されている。

【0194】

VB4-845は、前の有効性モデルに用いられた胸腺欠損マウスより野生型ETA媒介性肝臓損傷に対して感受性が高い、免疫適格性C57BL/6マウスへ投与された。VB4-845を、5 μ g(250 μ g/kg)または10 μ g(500 μ g/kg)のいずれかで一日おきに3回の投与として、または20 μ g(1000 μ g/kg)で一日おきに2回の投与として、静脈内でマウスに投与した。最後の投与から24時間後、血漿トランスアミナーゼの活性を測定し、PBSで(従って、0 μ g/kg VB4-845)処置されたマウスと比較した。5 μ gおよび10 μ gの投与計画の完了から24時間後、マウスの血漿において、ALT/ASTレベルの上昇は観察されなかった(図6)。トランスアミナーゼ活性の上昇は、20 μ g用量の投与において観察されただけであった。投与時点後24時間目において、動物を屠殺し、肝臓および脾臓由来の組織検体をヘマトキシリン/エオシンにより染色し、光学顕微鏡観察法により分析した。

【0195】

見られたトランスアミナーゼ活性と一致して、壊死肝細胞を有するほんのわずかの部位だけが20 μ g(1000 μ g/kg)免疫毒素投与計画、総曝露量40 μ g(2000 μ g)での処置において見出された(図7)。組織病理学的変化または骨髄抑制の徴候は、脾臓および全血試料の細胞成分において、いずれの用量においても観察されなかった。

【0196】

ヒトにおけるVB4-845の低い開始用量は、5日間、日ごとに腫瘍の異なる区画への微量投与により毎日与えられる20 μ g(70 kg成人について0.29 μ g/kg)であり、100 μ g/腫瘍(70 kg成人について1.43 μ g/kg)の単一サイクルの累積的曝露量となる。より高い用量は、1400 μ g/腫瘍(70 kg成人について20 μ g/kg)の単一サイクルの累積的曝露量として同じ様式で与えられる280 μ g(70 kg成人について4.0 μ g/kg)であり得る。体重ベースでは、開始用量は、上記のマウス研究に用いられた静脈内投与による1ヶ月間の曝露量より約1585分の1、高い方の用量は、113分の1である(表7)。この安全域に基づいて、そのような用量範囲は、結果として毒性を示す臨床的観察を生じなかったマウスにおいて繰り返しして用いられた用量に関して安全であるとみなされ、開始用量は、マウスにおいてトランスアミナーゼレベルの上昇または組織病理学的変化を示さなかったVB4-845への1ヶ月間の曝露量の1056分の1である。

【0197】

齧歯類における一本鎖Fvは、循環から迅速に除去され、初期時点で高い腫瘍対バックグラウンド比(腫瘍における特異的な保持)を与え²³⁻²⁵、 $T_{1/2}$ は平均して2~4時間であるが、この時間はより長くあり得る²⁶⁻²⁷。

【0198】

動物において得られた結果と同様に、¹²³I-標識抗CEA scFvは、ヒト患者において、比較的短い半減期、例えば、0.42($t_{1/2}$)時間および5($t_{1/2}$)時間、を示した²⁹。腫瘍対血液比は、時間と共に増加した(IgG抗CEA抗体全体についての1~1.5:1と比較して、24時間において5.6:1)。投与された放射能の約15~41%は、最初の24時間内に尿に排泄され、腎臓が排泄の主要な器官であることを示唆した。活性は、1時間後、肝臓に見られ、その活性は、その後21時間に渡って急速に減少し、そして、抗体の肝臓異化作用後の放射性ヌクレオチドの胆汁中排泄と一致して、胆嚢で観察された²⁹。第二の研究は、それぞれ、0.32($t_{1/2}$)および10.59($t_{1/2}$)の類似した半減期を示した³⁰。scFv-ETA免疫毒素である、LMB-2に

10

20

30

40

50

(XbaI 5':

CTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGT
GGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGT (SEQ ID NO:12); XbaI 3':
GCCACTGCAATCGCGATAGCTGTCTTTTTCATTTT TTGCCCTCGTTAT (SEQ
ID NO:13); and EcoRV 5': AGCGCAGGCCGACCACCATCATCACCATCACGAT
(SEQ ID NO:14); EcoRV 3':
ATCGTGATGGTGATGATGGTGGTTCGGCCTGCGCTACGGTAGCGAAACCAG
CCAGT (SEQ ID NO:15))

10

の2つの対を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ルするようにさせ、その後、pIG6-4D5MOCBETAH6KDELのXbaI部位とEcoRV部位の間に連結した。配列は実験で確認された。

【0203】

VB4-845の周辺質発現について、ベクターpIG6が用いられ、それは、SB536、周辺質プロテアーゼHhoAおよびHhoB.63を欠く大腸菌(*E. coli*)株、においてlacプロモーター制御下にその遺伝子を置く。アンピシリン(100 mg/ml)含有5 ml 2YT培地に、VB4-845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。細菌を、0.5%グルコースおよびアンピシリン(100 mg/ml)を追加した2YT培地の1リットルに、0.1と0.2の間のA550 nmに達するように希釈し、3リットルのバッフル付き振盪フラスコへ移した。培養物をさらに25℃で0.5のA550 nmまで増殖させ、最終濃度の1 mM イソプロピル-b-D-チオガラクトピラノシド(IPTG、Sigma)を添加することにより4時間、免疫毒素産生を誘導した。6の最終A550 nmを有する細菌培養物由来の収集されたペレットを-80℃で保存した。

20

【0204】

精製について、1リットル培養物から得られたペレットを、50 mM トリス-HCl(pH 7.5)、300 mM NaCl、2 mM MgSO₄を含みかつEDTAを含まないプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)およびDNアーゼIを追加した25 ml 溶解緩衝液に再懸濁した。細菌懸濁液を、French Pressure Cellプレスにおける2サイクルで溶解させ、SS-34ローターにおいて48,000 gで、4℃で30分間、遠心分離し、続いて濾過滅菌した(0.22 μm)。透明懸濁液に存在する免疫毒素を、Pluckthun et al.⁶⁴に記載されているように、直列形に結合されたNi²⁺-イミノ二酢酸(IDA)カラムおよびHQ/M-陰イオン交換カラムを有するBIOCAD-System(Perseptive BioSystems)を用いるクロマトグラフィーにより精製した。溶解物を添加する前に、Ni²⁺-IDAカラムを20 mM トリス(pH 7.5)、300 mM NaClで平衡化させた。添加後、カラムを、すべて20 mM トリス(pH 7.5)で緩衝化した異なる塩溶液で、300 mM、510 mMおよび90 mM NaClの順に3回、洗浄した。引き続き、カラムを、20 mM トリス(pH 7.5)、10 mM イミダゾール、90 mM NaClで洗浄してから、結合した免疫毒素を200 mM イミダゾールを含む同じ溶液(pH 7.5)で溶出した。

30

【0205】

溶出物をHQ/M-陰イオン交換カラム上へ直接的に添加し、結合した免疫毒素を、20 mM トリス(pH 7.5)で緩衝化した、90~1000 mM NaClの塩勾配で溶出した。4D5MOCB-ETAを含む画分を収集し、2000 gおよび4℃での遠心分離により10 kDa カットオフフィルター(Ultrafree-MC低タンパク質結合、Millipore)を用いて濃縮した。精製されたVB4-845(4D5MOCB-ETA)の質は、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル、および製造会社の推奨により1:5000に希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合型抗テトラヒスチジン抗体(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いるウェスタンブロットングにより分析された。

40

【0206】

分析ゲル濾過および熱的安定性の測定

精製されたVB4-845(4D5MOCB-ETA)の10マイクログラムを、0.005%Tween20を含む50 ml

50

PBS pH 7.4に希釈し、引き続いて、37 でインキュベートした。試料を、Superose-12 P C3.2/30カラムを有するSmart system(Pharmacia, Uppsala)を用いるゲル濾過により異なる時点(0 h、2 h、4 h、8 h、10 hおよび20 h後)において分析した。カラムを、3つのタンパク質基準：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)、で同じ緩衝液において校正した。同じ分析設定を用いて、ヒト血清における37 での20 hのインキュベーション後の99mTc標識免疫毒素の熱的安定性を評価した。免疫毒素単量体の量は、溶出された画分のg-シンチレーション計数により測定された。

【0207】

放射性標識および抗原結合親和性の測定

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的な部位特異的配位により放射性標識した⁶⁵。この自然反応は、30 mlの免疫毒素溶液(1 mg/ml)を3分の1の容量の1 M 2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸(MES)pH 6.8および3分の1の容量の新しく合成された99m Tc-トリカルボニル化合物と混合することにより引き起こされた。混合物を、37 で1時間、インキュベートし、製造会社の推奨により0.005%Tween20を含むPBSで平衡化したBiospin-6カラム(BioRad, Hercules, CA)を通じて脱塩することにより反応を停止させた。免疫反応性免疫毒素のパーセンテージは、Lindmo et al.により記載されているように評価された⁶⁶。99mTc標識免疫毒素の結合親和性は、本質的にはscFv 4D5MOCBについて記載されているように、ラジオイムノアッセイ(RIA)においてSW2細胞上で測定された。

10

20

【0208】

実施例10. VB4-845製造過程

VB4-845大腸菌発酵

VB4-845の製造は、研究実験室において、回転式インキュベーター振盪機を用いて2L 振盪フラスコで実施される。回転式振盪機は、温度が摂氏1度内に制御され得る環境制御室内に存在する。種培地、生産培地の接種およびすべての無菌操作は、HEPA濾過および100の空気分級を有する生物学的安全キャビネットII/B型下で行われる。細胞分離、濃縮およびダイアフィルトレーションは研究実験室で行われる。

【0209】

VB4-845は、VB4-845 E104宿主細胞大腸菌Master Cell Bank(MCB)から産生される(Xoma Ireland LtdからのプラスミドpING3302が発現ベクターの構築のために用いられた)。臨床的グレードのVB4-845の製造のための細胞(発酵)増殖の最初のスケールアップは、フラスコあたり1Lの可動範囲を有する、26 x 2L振盪フラスコのレベルまでであり、総容量は26Lである。VB4-845大腸菌MCBは、細胞増殖のための主要な炭素源としてグリセロールを含む複合窒素培地で増殖する。発酵手順は下に記載されている。

30

【0210】

種菌調製

26L振盪フラスコ工程のために、VB4-845大腸菌MCBの1つの500 mL培養物をプレ種菌として調製する。各培養について、MCBのバイアルを-18 貯蔵タンクから引き出し、室温で解凍させておく。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において空気乾燥させておく。MCBの細胞懸濁液(1.5 ml)を、500 mLの滅菌した種培地(改変2YT培地および25 mg/L テトラサイクリン)を含む2Lのエルレンマイヤーフラスコに加える。フラスコを、200 rpmに設定された回転式振盪機へ移し、 3.0 ± 0.2 またはそれ以上の光学濃度に達する(10.5 \pm 1 hr、増殖の対数期の中間部)まで、 25 ± 1 で増殖させる。種菌は、その後、26個の生産振盪フラスコに接種するための種培養物として用いられる。

40

【0211】

26 x 2L振盪フラスコにおける発酵

発酵は、それぞれ1Lの生産培地を含む2L-バッフル無しフラスコで行われる。臨床的グレードのVB4-845のための典型的な生産工程は、フラスコあたり1Lの生産培地(改変Terrific Broth, TB)を含む26 x 2Lフラスコであった。発酵培地に、上記培養物由来の1%種菌を

50

接種し、接種された最後の振盪フラスコにおいて1.2の最適な光学濃度に達するまで(約6~7時間)25±1 で振盪機上で(200 rpm)インキュベートした。惹起での典型的なOD600範囲は、1.2~1.5である。VB4-845発現は、0.1%L-アラビノースの添加により誘導される。細胞は、誘導から約6時間後、収集される。

【0212】

細胞分離

収集時において、すべての振盪フラスコは、接種の順に振盪機室から取り出され、最初に接種されたフラスコが最初に取り出される。1番目の振盪フラスコの内容物は、生物学的フード下で2番目の振盪フラスコへ添加される。すべての後の振盪フラスコは同様に取り出される。プールされた振盪フラスコは、2~8 での冷蔵状態に置かれる。VB4-845 E1 10
04大腸菌細胞は、SorvallおよびBeckman遠心機における2~8 での15分間の6,800 g力での遠心分離により、上記発酵培養物から6個1組として取り出される。細胞は捨てられるが、細胞を含まない培養液は、さらなる処理のために保持される。濃縮された細胞懸濁液は、確立された方法により収集、不活性化されて、捨てられる。その結果生じた上清は、プールされ、5 ml 試料が生産物定量のために取っておかれる。遠心機、ローターおよび遠心ポトルは、発酵培養液を処理する前に入念に洗浄される。

【0213】

濃縮/ダイアフィルトレーション

収集された培養上清の濃縮およびダイアフィルトレーションは、10 kD NMW(見かけの分子量)の分子カットオフおよび3平方フィートの表面積を有するSartorius膜(Hydrosart)を有する十字流Pelliconシステムを用いることにより行われる。Pellicon濾過システムは、使用の前に入念に洗浄される。濃縮は、4 L/minの送り速度および500 mL/minの浸透速度で行われる。5 ml 試料は、最終濃度段階で採取される。ダイアフィルトレーションは、0.02 M リン酸ナトリウム、pH 7.2±0.2に対して行われる。<10 mSの所望の伝導度を達成するために5つの体積変化が必要とされる。ダイアフィルトレーション化された濃縮生産物は、Sorvall遠心機において、2~8 の設定温度で約30分間、6,800 g力で透明にさせる。対象となる生産物を含む透明溶液は、0.22 μmのデッドエンドフィルターを用いる精製の前に濾過される。清澄段階は、ダイアフィルトレーション後、遠心分離、0.2 μmフィルターの通過、トリトンX-100の添加、伝導度の調整、pHの調整を含み、その後、精製に従う。 30

【0214】

VB4-845精製手順

VB4-845の精製は、Viventia Biotechのパイロットプラント、HEPA濾過および10,000の空気分級を有する制御環境を有するcGMP管理区域、において行われる。VB4-845タンパク質は、金属アフィニティーキレートクロマトグラフィーにより単離され、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される。精製過程は、図9における流れ図に要約されており、かつ下に記載されている。

【0215】

キレートセファロース金属相互作用クロマトグラフィー

金属アフィニティーカラムは、約17±1 mLのカラム体積を有するXK26/20ガラスカラム 40
にキレートセファロースHP樹脂を充填することにより調製される。充填は、3バールの逆圧で行われる。作業直線流速(LFR)は90 cm/hである。5カラム体積(CV)の注射用蒸留水(WFI)を、キレートセファロースカラムに通過させる。キレートセファロースカラムを金属イオンで荷電するために、5 CVの0.1 M 塩化ニッケル溶液をカラムに通過させる。結合していない塩化ニッケルの残りを、5 CVのWFIで洗い流す。その後、カラムを、150 mM 塩化ナトリウムおよび0.1%トリトンX-100を含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.2±0.1緩衝液(キレートセファロース平衡緩衝液)の10 CVと平衡化させる。

【0216】

VB4-845を含む濃縮化/ダイアフィルトレーション化溶液の伝導度は、塩化ナトリウムで15±1 mSへ調整され、pHは、1 M 水酸化ナトリウム(NaOH)で7.2±0.1に調整される。VB4- 50

845含有溶液を、90 cm/Hrまたは8 ml/minのLFRでキレートセファロースHPカラムへ添加する。その後、カラムを、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)の20 CVで洗浄する。VB4-845は、500 mM イミダゾールを含む、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(キレートセファロース溶出緩衝液)の6 CVでカラムから溶出される。生産物は、溶出ピークの始まりから開始する3 CV画分において収集される。

【0217】

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樹脂は、5.0±0.5 mLの最終カラム体積でXK16/20ガラスカラムに充填される。作業直線流速は、156 cm/hである。カラムを10 CVのWFIで洗浄し、その後、20 mM リン酸ナトリウムにおける1 M 塩化ナトリウム、pH 7.2±0.1緩衝液の5 CVで洗浄し、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)の10 CVと平衡化させる。キレートセファロースカラムからの溶出は、10±1 mSの伝導度が達成されるまで、20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.2±0.1緩衝液で希釈される。部分的に精製されたVB4-845は、外毒素レベルおよびDNAをさらに低下させるために5.2 ml/minの流速でQ-セファロースカラム上へ添加される。いったん生産物が結合したならば、陰イオン交換カラムを、15 CVのQ-セファロース平衡緩衝液で洗浄する。夾雑物は、流入段階および洗浄段階に見出される。生産物は、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 画分として溶出される。

【0218】

実施例11. VB4-845競合アッセイ

Ep-CAM陽性細胞系CAL-27(0.9×10^6 個)を、ビオチン化VB4-845 scFvの非飽和量(0.5~1.0 μg)と、氷冷PBS-5%FCSにおいて4 で10分間、プレインキュベートする。その後、試験抗体(競合物質)を氷冷PBS-5%FCSに希釈し、ビオチン化VB4-845 scFvの結合を完全に阻害する能力がある非ビオチン化VB4-845 scFvの量と等モルの量で混合物に添加する。4 で1時間のインキュベーション後、細胞を氷冷PBS-5%FCSで洗浄し、洗浄緩衝液で希釈されたCyクロム結合ストレプトアビジン(Pharmingen、1:120)の存在下で4 でさらに30分間、インキュベートする。細胞を、インキュベーション時間の終わりに、洗浄し、フローサイトメトリーにより分析する。陰性対照として、CAL-27腫瘍細胞を、VB4-845 scFvの代わりに、4B5 scFv、GD2特異的抗体14G2aと反応するが、CAL-27とは反応しない抗イディオタイプ特異的scFv、とインキュベートする。または、CAL-27に結合する非競合物質(抗HER-2/neu)を4B5 scFvの代わりに添加する。どちらの場合も、ビオチン化VB4-845 scFv単独について測定されたものから、蛍光中央値における無し~極微の変化が検出される。各抗体について、パーセント阻害は、以下の方程式に従って計算される：

$$PI = [(F_{Max} - F_{Bgd}) - (F_T - F_{Bgd})] / (F_{Max} - F_{Bgd}) \times 100$$

PI = パーセント阻害； F_{Max} = ビオチン化VB4-845 scFvについての最大蛍光中央値； F_T = 試験抗体の存在下におけるビオチン化VB4-845 scFvの蛍光中央値； F_{Bgd} = バックグラウンド蛍光中央値、ビオチン化VB4-845 scFv単独と、陰性対照抗体のどちらかの存在下におけるビオチン化VB4-845 scFvの間の蛍光中央値における差。また、Willuda et al., 1998, "High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments : engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment," Cancer Res. 59:5758-5767も参照されたい。

【0219】

実施例12. HNSCC臨床試験

主として、最大耐量を決定することおよび異なる投与プロトコルを評価することにより定められたHNSCCにおける2つの臨床試験において、進行したHNSCCである被験者は、異なる投与プロトコルに従ってVB4-845の腫瘍内注入を受ける。開始用量(5日間について20マイクログラム/腫瘍/日)は、3週間のマウス研究において見られた最高の単一用量

静脈内曝露の120分の1未満(体表面積に基づいて)、および3週間のマウス研究においての最高の5日間静脈内曝露の17分の1未満(体表面積に基づいて)を示している。

【0220】

第一試験(非盲検で、単一治療群の、安全性および耐容性研究)は進行中であり、少なくとも13被験者の処置を完了または開始している。130マイクログラム/腫瘍/日までの5日間の2サイクル(用量レベル4; 1サイクルにつき腫瘍あたり650マイクログラム、腫瘍あたり1300マイクログラムの総曝露量)が、これらの被験者の大部分において完了した。この試験において、薬物は、腫瘍の部位に、または頭頸部の領域における二次増殖(転移)の一つへ、直接的に注入される。最大のまたは最もアクセスしやすい病変が注入のために選択される(指標または標的病変)。試験は、2サイクルの用量段階的增加スキームを含む。各サイクルは、4週間または28日間の期間からなる。最初のサイクルの連続した5日間において、被験者は、20マイクログラム/腫瘍/日の開始用量で5日間連続して、薬物の腫瘍内注入を毎日受ける、従って、1サイクルにつき腫瘍あたり100マイクログラムを供給する(用量レベル1)。5日の期間の後に、薬物が投与されない23日間の休息期間が続く。しかしながら、被験者は、臨床検査ならびに血液および尿試料の検査を含む経過観察を毎週、受ける。第二の28日間サイクルが、その後、最終評価の前に繰り返される。最小限1人で3人までの被験者が、各用量レベルにおいて投与される。6つの用量レベルは、100、200、400、650、1000および1400マイクログラム/腫瘍/サイクル(または5日間連続して、20、40、80、130、200および280マイクログラム/腫瘍/日)である。投与の朝、各バイアルを900 μ Lまでのリン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈し、VB4-845の必要とされる量を注射器へ吸い込む。希釈率は、注入されるべき腫瘍の推定容積の約30%を超えずに注入される容量に達するように調整される。5日の期間およびそれらの最後の投与後の24時間において、被験者は、集中治療室において処置される。毎日、尿および血液試料が、肝臓および腎臓機能をモニターし、かつ血液中の薬物濃度を測定するために採取される。各投与事象において、皮膚または口腔粘膜の単一穿刺は、その穿刺が前の穿刺とは異なる部位にあることを確保して、腫瘍中心から外へ腫瘍周囲までの距離の約80%の部位になされる。穿刺部位から放射状に外へ広がる6個~8個の針跡が作製され、等量の溶液が各区域へ注入される。適切な鎮痛薬が処置期間中に投与される。コルチコステロイドの局所的または全身的使用は、グレード3または4の症候的皮膚または粘膜毒性に限定される。

10

20

【0221】

第二試験において、薬物はまた、腫瘍の部位に、または頭頸部の領域における二次増殖(転移)の一つへ、直接的に注入される。被験者が1つより多い病変を有する場合には、任意の最大寸法において5 cmに近づく最もアクセスしやすい病変が注入される。小さな病変のみが入手できる場合には、複数の病変が、合わせて5 cmの最大寸法として処置され得る。被験者は、4週間連続して、週に1回、投与される。この4週間の期間の後に、被験者の状態がモニターされる4週間の休息期間が続く。VB4-845の最初の用量レベルは、100 μ g/腫瘍/週であり、残りの用量レベルは、200、330、500、700、930、および1240マイクログラム/腫瘍/週である。投与の朝、バイアルを800 μ LまでのPBSで希釈し、その後、VB4-845の必要とされる量を注射器へ吸い込む。注入される最終容量は、注入されるべき腫瘍の推定容積の約30%を超えないようにリン酸緩衝食塩水(PBS)の懸濁容量を用いて調整される。薬物は、各投与日における腫瘍の全容積を含むことを試みるように投与されるべきである。投与するために、1 ccのルアー注射器に取り付けられている小さな(25~27ゲージ)針が、約45度の角度で腫瘍の基部へ差し込まれる。腫瘍のサイズおよび位置に依存して、注射は、単一の穿刺部位から腫瘍の中を生産物の跡をつけることにより、または約0.5~1.0 cm離れた平行列において1 cmきざみでの複数の部位から腫瘍に注射して、腫瘍中に分配することによりなされ得る。腫瘍反応は、ベースライン通院時における処置前、ならびに各次の投与時点における投与前、4週間目において、および研究の終わりに、評価される。可能であるところにおいては、CTスキャンは、スクリーニング時点、4週間目および8週間目(または最後の通院時)において行われる。完全寛解または部分反応が観察される場合には、CTスキャンが、その結果を確認するために4週間後に行われる。他の評価は、臨床

30

40

50

的観察および触診による腫瘍の直接的測定による。完全寛解(CR)は、注入された腫瘍の完全な消失を示す(4週間目において確認される)；部分反応(PR)は、処置された腫瘍の最大直径において少なくとも30%の低減(4週間目において確認される)を示す；安定した疾患は、30%未満の処置された腫瘍の退行または20%未満の進行により示される、および腫瘍進行(TP)は、CR、PRまたはSDが以前に実証されていない所において、処置された腫瘍の最大直径における20%の増加により示される。痛みは、処置前、ならびに各投与の前、ならびに4週間目および8週間目(または最後の通院時)に、アナログ痛み尺度を用いて評価される。標的腫瘍のランダムな細針吸引による生検が、細胞レベルにおけるVB4-845の効果を探查するために採取される。全身のおよび局所的毒性は、標準手順を用いて評価され、有害事象、実験室的毒性および被験者の痛みの状況についての継続評価は、処置全体を通じて存在する。

10

【0222】

実施例13. 膀胱癌細胞系に対するVB4-845の生物活性

概要

VB4-845[抗Ep-CAM scFvおよび細胞結合ドメインを欠損するシュードモナス外毒素A(ETA 252-608)]は、この可能性のある臨床的適応においてEp-CAM発現の程度および幅の広さを測定するために14個の膀胱癌細胞系を含むヒト腫瘍細胞系のパネルに対して細胞表面反応性についてフローサイトメトリーにより評価された。VB4-845は、14個の膀胱癌細胞系のうちの10個に対して強い反応性を、他の1個に対して弱い反応性を示した。VB4-845は、11個のVB4-845陽性膀胱癌細胞系への強い細胞毒性を示した；IC50値は、72時間曝露について0.001~320 pMを変動した。対照的に、3個のVB4-845陰性細胞系に対して、細胞毒性は検出されなかった。4個の膀胱癌細胞系(T-24、SW-870、UM-UC-10および1A6)は、VB4-845処置に対して最も高い感受性があることが実証された。曝露時間が2時間に制限された、細胞系のサブセットにおけるもう一つの実験において、VB4-845は、扁平上皮膀胱癌細胞系、SCaBER、および移行性膀胱癌細胞系、5637、に対して有効な細胞毒性(>93%)を発揮した。対照的に、対照免疫毒素、4B5-PE、への5637の2時間曝露について、非特異的細胞毒性は、500 pMにおいて極微(<10%)であることが示され、用量を100倍(50000 pM)に増加させた後でさえも同じレベルのままであった。要約すれば、VB4-845の膀胱癌細胞系への強力なインビトロ抗腫瘍活性は、VB4-845が、膀胱癌に対する抗癌治療の前臨床的および臨床的開発のための実用性を有することを示唆している。

20

30

【0223】

実験設計

フローサイトメトリーにより腫瘍細胞系に対するVB4-845の反応性を試験することおよび細胞毒性についての実験設計は、実施例3、4に記載されている。精製されたscFv-ETA融合タンパク質、VB4-845(ロット番号02203、1 mg/mL)および陰性対照4B5scfv-ETA(ロット番号032403、1.5 mg/mL)を記載されているように作製し、-80℃でアリコートにして保存した。研究に用いられた腫瘍細胞系のパネルおよびそれらの特徴は、表9にある。すべての腫瘍細胞は、ATCCまたはECACCプロトコールに従って、10~20%FCSおよび適切なサプリメントを含む培地において増殖させた。腫瘍細胞は、培養物が、90%より大きい生存度を有する50~70%の集密性である時に収集された。細胞系CAL-27は、高レベルのEp-CAM抗原を発現させ、陽性対照として用いられ、一方、Ep-CAM低発現細胞系COLO 320が陰性対照として用いられた。

40

【0224】

フローサイトメトリーによる腫瘍細胞系に対するVB4-845の反応性の試験

精製されたVB4-845は、腫瘍細胞系のパネルに対して、フローサイトメトリーにより細胞表面反応性を測定するように試験された。簡単には、腫瘍細胞(0.9×10^6 個/300 μ L)を、10 μ g/mLでの精製されたVB4-845または陰性対照としての4B5 scFvと、氷上で2時間、インキュベートした。抗EGFRマウスモノクローナル抗体(Oncogene Research、カタログ番号OP15、1 μ g/mLでの)を陽性対照として用いた。インキュベーション後、細胞をPBS-5%FBSで洗浄し、VB4-845に対する抗HIS-Tag抗体(Amersham Pharmaciaカタログ番号27-4710-01

50

、1:800に希釈)または抗EGFRに対するビオチン結合抗マウスIgG(Pierceカタログ番号31174、1:200に希釈)のいずれかと、氷上で1時間、インキュベートした。細胞をPBS-5%FBSで洗浄し、引き続いて、FITC結合ヤギ抗マウスIgG(The binding Siteカタログ番号AF271、抗HIS処理細胞に対して1:100に希釈)またはストレプトアビジン-Cy-クロム(Pharmingenカタログ番号13038A、1:120に希釈)のいずれかと、氷上で30分間、インキュベートした。最後に、細胞を洗浄し、0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でヨウ化プロピジウム(Molecular Probesカタログ番号P-1304)を含む緩衝液0.5 mLに再懸濁した。腫瘍細胞結合は、FACSCaliburを用いて測定された。抗体は、抗体処置された腫瘍細胞が、陰性対照に対して>30%の陽性細胞(対照の1.3倍)を結果として生じている蛍光における正のシフトを示す場合には、陽性とみなされた。

10

【0225】

細胞増殖アッセイによるVB4-845媒介性細胞毒性の評価

VB4-845細胞毒性は、MTSアッセイにより細胞増殖の抑制を測定することにより測定された。簡単には、96穴マイクロタイタープレートを、10%FCSを含む培地に5000細胞/50 μL /ウェルで腫瘍細胞を接種することにより調製した。プレートを、5% CO₂の存在下において37 $^{\circ}\text{C}$ で3時間、インキュベートした。VB4-845の10倍段階希釈をこの時点で作製し、様々な量のVB4-845(0.00005~500 pM)を50 μL 容量で各ウェルへ添加し、最終容量を100 μL にした。陰性対照として、4B5 scFv-ETAを同じ濃度で用いた。対照細胞および対照(空の)ウェルは、4連で培地のみ100 μL とインキュベートされた。プレートは、5% CO₂の存在下において37 $^{\circ}\text{C}$ で72時間、インキュベートされた。各アッセイは、結果における再現性および一貫性を実証するために2回、繰り返された。インキュベーション後、MTSアッセイは、細胞生存度を測定するために行われた。簡単には、75 μL のメソ硫酸フェナジン、PMS(PBS中に0.92 mg/mL)、を1.5 mLのテトラゾリウム化合物、MTS(Promega、カタログ番号G111AおよびG109C、PBS中に2 mg/mL)、に添加し、PMS/MTS混合物の20 μL を各ウェルへ添加した。プレートは、5% CO₂の存在下において37 $^{\circ}\text{C}$ で2時間、インキュベートされた。引き続いて、プレートを、ELISAプレートリーダーを用いて490 nmで読み取った。

20

【0226】

VB4-845媒介性細胞毒性に必要なとされる最小限免疫毒素曝露時間の測定

IC₅₀(培地のみで処置された細胞と比較して細胞の50パーセントを殺すVB4-845濃度)は、VB4-845を各膀胱癌細胞系に72時間、曝すことにより測定された。殺害に対する様々な感受性の5つの感受性のある細胞系(SW-780、UC-MC-10、1A6、UC-MC-14および5637)が、IC₅₀に近い固定された濃度を用いて50%腫瘍細胞の殺害に必要なとされる最小限曝露時間を確立するために選択された。腫瘍細胞を、固定された濃度(0.01、0.6または6 pM)でのVB4-845に、2、4、24、48および72時間、曝した。72時間を除いて、各時点において、VB4-845を含む培地を、免疫毒素(VB4-845)曝露時間を最小限にするために新鮮な培地と交換した。MTSアッセイは、対照(培地のみでの細胞)と比較して細胞毒性(50%腫瘍細胞殺害)を測定するために72時間のインキュベーション後、行われた。感受性がより低い扁平上皮癌細胞系(ScaBER)および感受性のある膀胱移行性癌細胞系(5637)および2つの他の膀胱癌細胞系(UM-UC-10およびUM-UC-14)へのVB4-845の効果をさらに評価するために、細胞を、固定された濃度かまたは様々な用量のいずれかのVB4-845に2時間、曝した。2時間のインキュベーション後、細胞をVB4-845を除去するために洗浄し、新鮮な培地とインキュベートし、MTSアッセイを72時間後に行った。さらに、VB4-845の特異的細胞毒性効果を確立するために、5637細胞を、様々な用量(500、5000、50000 pM)のVB4-845および陰性対照免疫毒素、4B5-PE、に曝し、より高い濃度での殺害の効果を測定した。各時点、2、6、12、24および48時間目、のインキュベーション後、細胞を、VB4-845を除去するために培地で洗浄し、新鮮な培地とインキュベートし、MTSアッセイを、細胞毒性を測定するために72時間後に行った。用量範囲は、最初のIC₅₀結果に基づいて、その最小用量のVB4-845を用いてこの細胞系の最大の殺害を与えるという見込みで、選択された。

30

40

【0227】

結果

50

VB4-845腫瘍細胞反応性

VB4-845の細胞表面反応性は、膀胱腫瘍細胞系のパネルに対して評価された。VB4-845は、14個の膀胱癌細胞系のうちの11個に対して陽性反応性を示した。データは表10に要約されている。

【0228】

インビトロでの膀胱癌細胞系に対するVB4-845の細胞毒性効果

腫瘍細胞を、0.00005~500 pMの範囲である濃度で72時間、VB4-845とインキュベートし、細胞増殖の抑制をMTSアッセイにより評価した。結果は表10に要約されている。VB4-845は、3つのEGP-2陰性細胞系(J-82、UM-UC-3、およびUM-UC-13)における細胞増殖の抑制を示さなかったが、Ep-CAM抗原の非常に高い発現を有する4つの細胞系(T-24、SW-780、UM-U 10 C-10および1A6)において強い抑制(0.001~0.033 pMのIC50)を、他の細胞系において中間の抑制を示した。

【0229】

インビトロで膀胱癌細胞系に対してVB4-845媒介性細胞毒性に達するのに必要とされる最小限曝露時間

標準的細胞増殖アッセイにおいて、膀胱癌細胞をVB4-845に72時間、曝し、その後、細胞増殖の抑制を評価した。膀胱癌について、膀胱内治療の滞留時間は、2時間より長いことはめったにない。それゆえに、細胞増殖アッセイは、IC50(0.01または0.6 pM)でのまたは近くの固定された濃度におけるVB4-845への曝露において、50%腫瘍細胞を殺すために必要とされる最小限曝露時間を測定するために行われた。第一の実験において、2つのVB4 20 -845感受性膀胱癌細胞系(SW-780および1A6)を、0.01 pM濃度でのVB4-845に、2、4、6、24、48または72時間、曝した。VB4-845は、短い曝露時間後でさえも、SW-780および1A6膀胱癌細胞系に強い細胞毒性を示した。感受性がより高い膀胱癌細胞系SW-780(IC50 0.002 pMを有する)について、50%腫瘍細胞は、3時間の曝露後に殺されたが、感受性がより低い細胞系、1A6(IC50 0.033 pM)、については、同じことは、37時間の曝露後に達成された。同様のデータのセットは、0.6 pM濃度でのVB4-845への3つの異なる膀胱癌細胞系の曝露後の第二の実験において得られた。結果は、UM-UC-10、5637またはUM-UC-14細胞の50%が、それぞれ、4時間、16時間および20時間後に殺されたことを示した。これらの3つの系の感受性の順位は、それらのIC50に関するのと同じであった。

【0230】

別の実験において、より高い濃度(6.0 pM)でのVB4-845への2時間の曝露において、UM-U 30 C-10、5637およびUM-UC-14細胞の96%、89%および93%がそれぞれ、殺された。さらなる評価において、様々な用量のVB4-845に2時間、感受性がより低い細胞系(SCaBER)および感受性のある細胞系(5637)を曝した後、SCaBER細胞の>93%殺害を有する強い細胞毒性効果は、3900 pM用量で達成されたが、同じ程度の細胞毒性は、5637細胞についてずっと少ない用量(<498 pM)で達成された。このように、最大細胞毒性効果を達成するために必要とされるVB4-845の最小限量は、細胞系の感受性に依存することが確認された。さらに、別の実験において、500 pM濃度で2時間のVB4-845への5637の曝露は、細胞の有効な殺害(>93%) 40 を示し、最小の非特異的細胞毒性(<10%)が対照免疫毒素(4B5-PE)により示された。実際、2時間の曝露について、4B5-PE濃度を100倍に増加させた後でさえも、非特異的殺害は最小レベルに留められた。

【0231】

実施例14. ヒト臨床的膀胱結合

外科的および検視ヒト膀胱組織検体を得て、VB4-845を用いるEp-CAM結合について試験した。検体をホルマリン固定し、パラフィン包埋した。方法確証は、このアッセイについての固定された検体の妥当性を確認するために、および(非特異的染色を最小限にして)用いられるべき最適な抗体(VB4-845)濃度を決定するために、新鮮凍結試料および固定された試料の両方において行われた。

【0232】

グレードIIIおよびステージIIまたはIIIの17個の膀胱移行上皮癌、ならびに12個の正常 50

な膀胱対照試料を、4マイクログラム/ml (~ 57 nM)での抗体VB4-845で染色した。スライド調製およびブロッキングは、周知の免疫組織化学的手順に従ってなされた。組織に結合したVB4-845の検出は、ウサギ抗シュードモナス外毒素抗体 (Sigma P2318)、続いて、ビオチン化抗ウサギ二次抗体 (Vector抗ウサギBA-1000)、および基質としてVector redを用いるVector ABC-AP検出系を用いて行われた。

【0233】

癌腫は、正常な移行上皮と比較して染色の増加を示し、陽性の場合において観察された最も強い染色は、膜関連であった。癌腫内では、染色は、強度においては変動し、分布においてはまだらであった。また、まあまあの程度の分化(すなわち、移行性または円形状分化)を示す領域内に、より少ない分化または高程度の核退生および多形性を示す同じ腫瘍内の領域と比較して、染色の増加があった。

10

【0234】

染色された17個の移行性癌のうち、8個の試料は、弱から中位の膜染色の領域を示し(0~4の染色強度尺度において2~3(試料2、6、8、11、13、15および16))、1個は、弱い染色の領域を示し(試料9)、残りの試料は、膜染色について陰性であった。染色は、腫瘍内で変動し、試料内の分化の程度に関連しているように思われた。12個の正常な膀胱試料内で、2個の試料が、弱くかつ低頻度の膜染色を示した(試料2および11)。陰性対照免疫毒素(関連性のない抗原に対する抗体由来のscFv-PE)については染色は見られなかった。

【0235】

細胞質および、よりまれに、核の染色が、いくつかの正常および癌検体に見られた。確認研究において、より高い濃度のVB4-845が、結果として、癌細胞のより高いパーセンテージにおけるより強い膜染色のほかに、より「赤い」または細胞質染色を生じた。臨床的設定において(インピボで)、細胞質および核はその生産物に曝されないため、より高い濃度のVB4-845が、より少ない数の受容体を有する細胞への結合を増加させるために用いられ得ると思われる。

20

【0236】

実施例15. 膀胱臨床試験

VB4-845の最大耐量を評価するための臨床試験において、膀胱のBCG抵抗性移行上皮癌(TCC)を有する被験者、薬物は、膀胱内に投与される。処置サイクルは、治療の6週間および経過観察の4~6週間を含む。VB4-845の適切な用量が、6週間連続して1週間につき1回、膀胱(腫瘍)へ直接的にカテーテル法により投与される。VB4-845の7つの用量レベルは、6日の投与日のそれぞれにおいて50 ml中の100、200、335、500、700、930および1240マイクログラムである。

30

【0237】

薬物投与の直前には、膀胱は空にされなければならない。その後、カテーテルが挿入される。男性被験者について、Urojetを有する16 French Coudeカテーテルが用いられ、女性被験者については、滅菌した潤滑剤を含む14 French赤色ゴムカテーテルが用いられる。再構築されたVB4-845溶液は、50 mlの生理食塩水に希釈され、カテーテル法により空の膀胱へ滴下注入され、カテーテルをしかるべき所にクランプで固定して、2時間、膀胱に保持される。2時間の終わりに、膀胱は、カテーテルをクランプからはずすことにより空にされる。

40

【0238】

安全性、すなわち、各用量レベルにおける実験室および有害事象(AE)は、用量の段階的増加の前の3週間の処置の後に評価される。被験者は、6週間の期間、または薬物に関連した用量規定毒性(DLT)があるまで、決定された用量レベルで毎週の治療を続ける。経過観察の通院は、薬物投与の最終週後4~6週間以内に行われる。DLTを経験するが、治療に対する恩恵の臨床的証拠を示す被験者は、いったんすべての毒性が消散したならば、次の最も低い用量レベルで処置のさらなるサイクルを受ける。しかしながら、低減した用量において第二のDLTを経験する被験者については処置を終わらせる。腫瘍の反応は細胞学、細胞検査および生検により評価される。

50

【0239】

本発明は、現在、好ましい実施例であると考えられるものに関して記載されたが、本発明が開示された実施例に限定されないことは理解されるべきである。それとは反対に、本発明は、添付された特許請求の範囲の真意および範囲内に含まれる様々な改変および等価なアレンジを網羅することが意図される。

【0240】

すべての刊行物、特許および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許または特許出願が完全に参照により組み入れられていることを具体的かつ個別に示されているかのような同じ程度に、完全に参照により本明細書に組み入れられている。

【0241】

(表1) サンプルVB4-845製品規格

検査	基準
外観	2-8 °Cにおいて透明溶液
タンパク質(BCA)	1.0 ± 0.2 mg/ml
pH	7.2 ± 0.2
SDS-PAGE (非還元性:クーマシーブルー)	主要なバンド~70 kDa (領域 ≥ 90%)
生物活性(FACS)	対照抗体に対して蛍光における ≥ 50 倍増加
細胞毒性(IC ₅₀)	≤ 0.50 pM
全DNA	≤ 1.0 ng/mg
内毒素(LAL)	≤ 2000 EU/mg
無菌性	増殖なし

10

20

【0242】

(表2) インピボの腫瘍細胞に対するVB4-845の効果の要約

30

試験系情報:	University Hospital of Zürich, Department of Internal Medicine, Division of Medical Oncology, チューリッヒ, スイス 細胞系: SW2 小細胞肺癌 CAL27 扁平上皮癌 HT29 結腸直腸癌 COLO320 結腸直腸癌 MCF7 乳腺癌 RL 非ホジキンリンパ腫	10
剤形:	VB4-845: 0.0001-100 pM	
アッセイ:	MTT (3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) アッセイ	
研究期間:	72 時間	
評価されるパラメーター:	VB4-845による細胞増殖の阻害	
観察された効果および結論:	SW2、CAL27およびMCF7細胞はVB4-845の細胞毒性効果に対して同程度に感受性があることが見出された (IC ₅₀ = 0.005 pM)。HT29細胞は、感受性が最も低いことが見出された (0.2 pMのIC ₅₀)。	20

【 0 2 4 3 】

(表3) インビトロでの腫瘍細胞におけるタンパク質合成に対するVB4-845の効果の要約

試験系情報:	University Hospital of Zürich, Department of Internal Medicine, Division of Medical Oncology, チューリッヒ, スイス 細胞系: SW2 小細胞肺癌 RL 非ホジキンリンパ腫	30
剤形:	VB4-845 - 様々な量	
アッセイ:	[4,5- ³ H]ロイシンの吸収	
研究期間:	30 時間	40
評価されるパラメーター:	[³ H]ロイシンの取り込み (タンパク質合成の測定)	
観察された効果および結論:	タンパク質合成は、0.01 pMのIC ₅₀ を有するEp-CAM陽性SW2においてVB4-845により阻害された。Ep-CAM陰性対照細胞系RLにおけるタンパク質合成は、影響を及ぼされなかった。	

【 0 2 4 4 】

(表4) マウス癌の異種移植片モデルにおける固形癌へのVB4-845の効果の要約

試験動物情報:	<p>マウス、胸腺欠損ヌード</p> <p>University Hospital of Zürich, Department of Internal Medicine, Division of Medical Oncology, チューリッヒ, スイス</p> <p>以下の1つを皮下に移植された動物: SW2 小細胞肺癌 CAL27 扁平上皮癌 HT29 結腸直腸癌 COLO320 結腸直腸癌</p>	10
剤形:	VB4-845: 5 µg および 10 µg (下記参照)	
投与経路:	静脈内	
処置計画:	<p>i) 3週間、隔日に 5 µg (計 45 µg)</p> <p>ii) 1週間、隔日に 10 µg (計 30 µg)</p>	
研究期間:	50 日間	
評価されるパラメーター:	原発腫瘍サイズ	20
観察された効果および結論:	<p>SW2:最初のサイズの最高 20 %までの腫瘍容積の縮小、およびモニターされた期間の終わりにおいて最終的な 2.6倍サイズ増加への増殖のわずかな再開。</p> <p>CAL27:腫瘍は最初の容積の最高 60 %まで減少した。処置開始後50日目において、中央値腫瘍容積は、最初のサイズの1.4倍を超えなかった。5 µg用量で処置された7匹のマウスのうちの2匹は、完全な腫瘍退行を示し、腫瘍なしのままであった。CAL27および SW2腫瘍のどちらも、2つの処置計画に対するそれらの腫瘍反応において有意な差を示さなかった。</p> <p>HT29:腫瘍サイズは 5 µg投与計画で0.7倍に減少した。7匹のマウスのうちの3匹は、それらのHT29腫瘍の完全な退行を示した。10 µg計画の効力は、比較上、より低く、これらの腫瘍について長期処置がより効果的であることを示した。</p> <p>VB4-845の抗腫瘍効果は、Ep-CAM陰性COLO320対照腫瘍を有するマウスにおいて見られなかった。</p>	30

40

【 0 2 4 5 】

(表5) CAL27へのVB4-845の腫瘍周囲注入の効果の要約
マウス癌の異種移植片モデルにおける扁平上皮癌腫瘍

試験動物情報:	マウス、胸腺欠損ヌード University Hospital of Zürich, Department of Internal Medicine, Division of Medical Oncology, チューリッヒ, スイス CAL27扁平上皮癌を皮下に移植された動物
剤形:	VB4-845: 5 µg (下記参照)
投与経路:	腫瘍周囲
処置計画:	3週間、隔日に(月曜日/水曜日/金曜日) 5 µg (計45 µg)
研究期間:	80日間
評価されるパラメーター:	原発腫瘍サイズ
観察された効果および 結論:	処置された動物に腫瘍増殖の有意な阻害が観察され た。2匹のマウスは、完全な腫瘍退行を示し、実験期間 の間、腫瘍なしのままであった。

10

20

【 0 2 4 6 】

(表6) 免疫適格性マウスの肝臓、脾臓および骨へのVB4-845の段階的増加の反復投与の効果の要約

試験動物情報:	マウス、免疫適格性 C57BL/6 University Hospital of Zürich, Department of Internal Medicine, Division of Medical Oncology, チューリッヒ, スイス	
剤形:	VB4-845: 5 µg (下記参照) 10 µg 20 µg	
投与経路:	静脈内	10
処置計画:	3回投与として隔日に5 µgまたは10 µg (それぞれ、計15 µgまたは30 µg) 2回投与として隔日に20 µg (計40 µg)	
研究群:	3動物/群 5群	
研究期間:	7日間	
評価されるパラメーター:	血漿ALT / AST 組織病理学的所見、肝臓、脾臓、および骨	20
観察された効果および結論:	5 µgまたは10 µg投与計画マウスにおいて最終投与後24時間目に肝臓酵素における上昇なし。 20 µg投与動物において最終投与後24時間目に観察されたALT / ASTレベルの上昇。 5 µgおよび10 µg投与群において組織病理学的所見なし。 20 µg処置群において壊死肝細胞のある少数部位が見出された。 脾臓または全血試料の細胞成分においていずれの投与群にも組織病理学的変化または骨髄抑制は観察されなかった。	30

【 0 2 4 7 】

(表7) マウス研究に用いられた用量と、ヒトにおけるVB4-845の低い用量案および高い方の用量案との関係

種	単一用量曝露 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) マウス	複数のヒト用量 (低/高用量) ¹	1ヶ月間の総合 曝露量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) マウス	複数のヒト 1ヶ月間用量 (低/高用量) ²	総曝露量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) マウス	複数の総ヒト用量 (低/高用量) ³
胸腺欠損マウス	250	862 / 63	2250	1585 / 113	2250	523 / 38
胸腺欠損マウス	500	1724 / 125	1500	1056 / 75	1500	349 / 25
胸腺欠損マウス	250	862 / 63	2250	1585 / 113	2250	523 / 38
C57BL/6マウス	250	862 / 63	750	528 / 38	750	174 / 13
C57BL/6マウス	500	1724 / 125	1500	1056 / 75	1500	349 / 25
C57BL/6マウス	1000	3448 / 250	2000	1408 / 100	2000	465 / 33

¹ 0.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が、ヒト投与についての、それぞれ、低い単一用量案および高い方の単一用量案である(すなわち、20 μg および280 μg が70 kgの個体に投与される)。

² 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が、ヒト投与についての、それぞれ、低い1ヶ月間用量案および高い方の1ヶ月間用量案である(すなわち、20 μg および280 μg が、3週間の洗い出し期間をもって、5日間連続して毎日、70 kgの個体に投与される)。

³ 4.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が、ヒト投与についての、それぞれ、低い総用量案および高い方の総用量案である(すなわち、20 μg および280 μg が、3サイクルとして、3週間の洗い出し期間をもって、5日間連続して毎日、70 kgの個体に投与される)。

【0248】

(表8)

試料番号	癌腫グレード	癌腫ステージ	陽性膜染色	%細胞陽性
1	III	II	-	-
2	III	II	はい	40%
3	III	II	-	-
4	III	II	-	-
5	III	II	-	-
6	III	II	はい	10%
7	III	II	-	-
8	III	II	はい	40%
9	III	III	はい	70%
10	III	III	-	-
11	III	III	はい	25%
12	III	III	-	-
13	III	III	はい	30-40%
14	III	III	-	-
15	III	III	はい	10%
16	III	III	はい	30%
17	III	III	-	-

10

20

【0249】

(表9) 膀胱癌細胞系の特徴

参照番号	膀胱癌細胞系	起源の原発腫瘍組織	腫瘍グレード	腫瘍ステージ	分化
1	1A6	膀胱 TCC	高	浸潤	十分
2	T-24	膀胱 TCC	高	浸潤	乏しい
3	SW-780	膀胱 TCC	低	浸潤	データなし
4	HT-1197	膀胱 TCC	高	浸潤	乏しい
5	RT-4	膀胱 TCC	低	表面(非浸潤)	十分
6	SCaBER	膀胱 SqCC	データなし	浸潤	中程度
7	HT-1376	膀胱 TCC	高	浸潤	乏しい
8	TCCSUP	膀胱 TCC	高	浸潤	乏しい
9	J-82	膀胱 SqCC	高	浸潤	乏しい
10	UM-UC-3	膀胱 TCC	高	浸潤	乏しい
10	UM-UC-13	膀胱 TCC	高	浸潤	データなし
11	UM-UC-10	データなし	データなし	データなし	データなし
11	UM-UC-14	データなし	データなし	データなし	データなし
1	5636	膀胱 TCC	高	浸潤	データなし

10

20

30

参照：1：親細胞系、5637のクローン、Immunobiol. 172:175-184 (1986), Urol. Res. 21:27-32 (1993); 2: Int. J. Cancer 11:765-773 (1973), J. Uro 149:1626-1632 (1993); 3: Cancer Res. 44:3997-4005 (1984); 4: J. Natl. Cancer Inst. 58:881-890 (1977); 5: J. Urol. 161:692-698 (1999); 6: Int. J. Cancer 17:707-714 (1976); 7: J. Natl. Cancer Inst. 58:881-890 (1977); 8: Br. J. Cancer 35:142151 (1977); 9: Br. J. Cancer 38:64-76 (1978); 10: J. Urol. 146:227-231 (1991); 11: AntiCancer Inc.、細胞系。

TCC：移行上皮癌。SqCC：扁平上皮癌。

【 0 2 5 0 】

(表 1 0) VB4-845の腫瘍細胞表面反応性

膀胱癌細胞系	反応性 ¹ ： 蛍光における倍数増加	細胞毒性 IC50 (pM)	細胞毒性: CAL27 ² に対する相対的感受性
IA6	154.7 ± 15.2	0.033 ± 0.01	8.8
T-24	134.1 ± 35.9	0.001 ± 0.0	290
UM-UC-10	124.6 ± 5.3	0.024 ± 0.00	12.1
5637	97.0 ± 11.2	0.38 ± 0.13	0.8
SW-780	86.7 ± 3.1	0.002 ± 0.00	145
HT-1197	56.5 ± 2.3	0.23 ± 0.05	1.3
RT-4	55.3 ± 16.4	0.20 ± 0.10	1.4
SCaBER	54.0 ± 2.1	10.1 ± 0.0	0.03
HT-1376	40.7 ± 0.3	3.3 ± 1.2	0.1
UM-UC-14	25.7 ± 1.2	0.17 ± 0.2	1.6
TCCSUP	2.0 ± 0.1	320.0 ± 102.0	0.0009
J-82	1.2 ± 0.1 ²	> 500	n/a
UM-UC-3	1.2 ± 0.1 ²	> 500	n/a
UM-UC-13	1.3 ± 0.1 ²	> 500	n/a
CAL-27 (陽性対照)	87.0 ± 3.0	0.29 ± 0.1	1.0
COLO-320 (陰性対照)	1.1 ± 0.1 ²	>500	n/a

¹ 対照より上の蛍光中央値における倍数増加。値は、平均 ± SEMとして表されている。与えられた適応についての抗体の反応性は、その適応における各細胞系について計算された蛍光中央値における増加の平均倍数の平均をとることにより決定された。

² <30% (1.3倍増加) の蛍光における正シフトを示した細胞系は陰性とみなされた。

【 0 2 5 1 】

参考文献

10

20

30

40

1. Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R (1999) Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res JID* - 8102988 19:2237-2242
2. Salter ER, Tichansky D, Furth EE, Herlyn AM (2001) Tumor-associated antigen expression and growth requirements predict tumorigenesis in squamous cell carcinoma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim JID* - 9418515 37:530-535
3. Takes RP, Baatenburg dJR, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH (1998) Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res JID* - 8102988 18:4793-4800 10
4. Oppenheimer NJ, Bodley JW (1981) Diphtheria toxin. Site and configuration of ADP-ribosylation of diphthamide in elongation factor 2. *J Biol Chem JID* - 2985121R 256:8579-8581
5. Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11:570-578
6. Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. *Expert Opin Pharmacother* 1:1117-1129 20
7. Grossbard ML, Nadler LM (1993) Monoclonal antibody therapy for indolent lymphomas. *Semin Oncol* 20:118-135
8. Wahl RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 73:989-992
9. Grossbard ML, Fidas P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol Immunopathol* 76:107-114
10. Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol* 33:287-314 30
11. Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 14:115-120
12. Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 18:195-201
13. Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345:241-247 40

14. Schwartzberg LS (2001) Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol JID* - 8916049 40:17-24
15. Adkins JC, Spencer CM (1998) Edrecolomab (monoclonal antibody 17-1A). *Drugs JID* - 7600076 56:619-626
16. Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO (1994) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol JID* - 0375356 125:437-446 10
17. Willuda J, Honegger A, Waibel R, Schubiger PA, Stahel R, Zangemeister-Wittke U, Pluckthun A (1999) High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res JID* - 2984705R 59:5758-5767
18. Proca DM, Niemann TH, Porcell AI, DeYoung BR (2000) MOC31 immunoreactivity in primary and metastatic carcinoma of the liver. Report of findings and review of other utilized markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol JID* - 100888796 8:120-125 20
19. Pavlovskis OR, Gordon FB (1972) *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin: effect on cell cultures. *J Infect Dis JID* - 0413675 125:631-636
20. Leppla SH (1976) Large-scale purification and characterization of the exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun JID* - 0246127 14:1077-1086
21. Kreitman RJ, Pastan I (1998) Accumulation of a recombinant immunotoxin in a tumor in vivo: fewer than 1000 molecules per cell are sufficient for complete responses. *Cancer Res JID* - 2984705R 58:968-975 30
22. Perentesis JP, Miller SP, Bodley JW (1992) Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *Biofactors JID* - 8807441 3:173-184
23. Milenic DE, Yokota T, Filpula DR, Finkelman MA, Dodd SW, Wood JF, Whitlow M, Snoy P, Schlom J (1991) Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. *Cancer Res.* 51:6363-6371
24. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 52:3402-3408 40
25. Verhaar MJ, Keep PA, Hawkins RE, Robson L, Casey JL, Pedley B, Boden JA, Begent RH, Chester KA (1996) Technetium-99m radiolabeling using a phage-derived single-chain Fv with a C-terminal cysteine. *J.Nucl.Med.* 37:868-872

26. Adams GP, McCartney JE, Tai MS, Oppermann H, Huston JS, Stafford WF, Bookman MA, Fand I, Houston LL, Weiner LM (1993) Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Res.* 53:4026-4034
27. Deonarain MP, Rowlinson-Busza G, George AJ, Epenetos AA (1997) Redesigned anti-human placental alkaline phosphatase single-chain Fv: soluble expression, characterization and in vivo tumour targeting. *Protein Eng.* 10:89-98
28. Friedman PN, McAndrew SJ, Gawlak SL, Chace D, Trail PA, Brown JP, Siegall CB (1992) BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res.* 53:334-339 10
29. Begent RH, Verhaar MJ, Chester KA, Casey JL, Green AJ, Napier MP, Hope-Stone LD, Cushen N, Keep PA, Johnson CJ, Hawkins RE, Hilson AJ, Robson L (1996) Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nat.Med.* 2:979-984
30. Mayer A, Tsiompanou E, O'Malley D, Boxer GM, Bhatia J, Flynn AA, Chester KA, Davidson BR, Lewis AA, Winslet MC, Dhillon AP, Hilson AJ, Begent RH (2000) Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-CEA single-chain Fv antibody. *Clin Cancer Res* 6:1711-1719 20
31. Kreitman RJ, Wilson WH, Robbins D, Margulies I, Stetler-Stevenson M, Waldmann TA, Pastan I (1999) Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin. *Blood* 94:3340-3348
32. Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, Waldmann TA, Pastan I (2000) Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 18:1622-1636 30
33. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE (1996) Human cancer detection and immunotherapy with conjugated and non- conjugated monoclonal antibodies. *Anticancer Res.* 16:661-674
34. Multani PS, Grossbard ML (1998) Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies. *J.Clin.Oncol.* 16:3691-3710
35. White CA, Larocca A, Grillo-Lopez AJ (1999) Anti-CD20 monoclonal antibodies as novel treatments for non-Hodgkin's lymphoma. *PSTT* 2:95-101
36. Saleh MN, Posey JA, Khazaeli MB, Thurmond LM, Khor SP, Lampkin TA, Wissel PS, LoBuglio AF (1998) Phase I trial testing multiple doses of humanized monoclonal antibody (MAb) 3622W94. *ASCO 1998 meeting #1680 (Abstract)* 40

37. Raum T, Gruber R, Riethmuller G, Kufer P (2001) Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: a novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens. *Cancer Immunol Immunother JID* - 8605732 50:141-150
38. Kroesen BJ, Nieken J, Sleijfer DT, Molema G, de Vries EG, Groen HJ, Helfrich W, The TH, Mulder NH, de Leij L (1997) Approaches to lung cancer treatment using the CD3 x EGP-2-directed bispecific monoclonal antibody BIS-1. *Cancer Immunol Immunother JID* - 8605732 45:203-206
39. Haller DG (2001) Update of clinical trials with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal cancer. *Semin Oncol* 28:25-30 10
40. Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R (1998) Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol JID* - 8309333 16:1788-1794
41. Dencausse Y, Hartung G, Franz A, Strum J, Edler L, Bornbusch D, Gonnermann M, Post S, Hehlmann R, Queisser W (2000) Prospective randomized study of adjuvant therapy with edrecolomab (PANOREX) of stage II colon cancer: Interim analysis. *Ann.Oncol.* 11:47(Abstract) 20
42. de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV (1999) Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol JID* - 0204634 188:201-206
43. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med JID* - 9504370 77:699-712
44. Herlyn D, Sears HF, Ernst CS, Iliopoulos D, Stepkowski Z, Koprowski H (1991) Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma. *Am J Clin Oncol JID* - 8207754 14:371-378 30
45. Begent RH, Chester KA (1997) Single-chain Fv antibodies for targeting cancer therapy. *Biochem.Soc.Trans.* 25:715-717
46. Chester KA, Mayer A, Bhatia J, Robson L, Spencer DI, Cooke SP, Flynn AA, Sharma SK, Boxer G, Pedley RB, Begent RH (2000) Recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibodies for targeting cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl:S8-12 40
47. Chester KA, Bhatia J, Boxer G, Cooke SP, Flynn AA, Huhlov A, Mayer A, Pedley RB, Robson L, Sharma SK, Spencer DI, Begent RH (2000) Clinical

applications of phage-derived sFvs and sFv fusion proteins. *Dis Markers* 16:53-62

48. Grossbard ML, Freedman AS, Ritz J, Coral F, Goldmacher VS, Eliseo L, Spector N, Dear K, Lambert JM, Blattler WA (1992) Serotherapy of B-cell neoplasms with anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of daily bolus infusion. *Blood* 79:576-585
49. Amlot PL, Stone MJ, Cunningham D, Fay J, Newman J, Collins R, May R, McCarthy M, Richardson J, Ghetie V (1993) A phase I study of an anti-CD22-deglycosylated ricin A chain immunotoxin in the treatment of B-cell lymphomas resistant to conventional therapy. *Blood* 82:2624-2633 10
50. Vitetta ES, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D (1991) Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res* 51:4052-4058
51. Stone MJ, Sausville EA, Fay JW, Headlee D, Collins RH, Figg WD, Stetler-Stevenson M, Jain V, Jaffe ES, Solomon D, Lush RM, Senderowicz A, Ghetie V, Schindler J, Uhr JW, Vitetta ES (1996) A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood* 88:1188-1197 20
52. Messmann RA, Vitetta ES, Headlee D, Senderowicz AM, Figg WD, Schindler J, Michiel DF, Creekmore S, Steinberg SM, Kohler D, Jaffe ES, Stetler-Stevenson M, Chen H, Ghetie V, Sausville EA (2000) A phase I study of combination therapy with immunotoxins IgG-HD37-deglycosylated ricin A chain (dgA) and IgG-RFB4-dgA (Combotox) in patients with refractory CD19(+), CD22(+) B cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 6:1302-1313
53. Di Paolo, C., Willuda, J., Kubetzko, S., Lauffer, I., Tschudi, D., Waibel, R., Pluckthun, A., Stahel, R.A., and Zangemeister-Witte, U. A recombinant immunotoxin derived from a humanized Ep-CAM-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. (submitted) 30
54. Di Paolo, C. and Zangemeister-Witte, U., Personal communication, Zurich.
55. Schümann, J., Angermüller, S., Bang, R., Lohoff, M., and Tiegs, G. Acute hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in mice depends on T cells and TNF. *J. Immunol.*, 161: 5745-5754, 1998.
56. Schümann, J., Wolf, D., Pahl, A., Brune, K., Papadopoulos, T., van Rooijen, N., and Tiegs, G. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am. J. Pathol.*, 157: 1671-1683, 2000. 40
57. Sizmann N and Korting HC. Prolonged Urticaria with 17-1A Antibody. *BMJ* 317:1631.

58. Naundorf S, Preithner S, Mayer P, Lippold S, Wolf A, Hanakam F, Fichtner I, Kufer P, Raum T, Riethmuller G, Baeuerle PA, Dreier T. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment. *Int J Cancer* 100(1):101-10, 2002.
59. Willuda J, Honegger A, Waibel R, Schubiger PA, Stahel R, Zangemeister-Wittke U, Pluckthun A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* 59(22):5758-67, 1999 10
60. Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B., and Hynes, N. E. EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int. J. Cancer*, 60: 137-144, 1995.
61. Ge, L., Plückthun, A., Pack, P., Freund, C., and Pluckthun, A. Expressing antibodies in *Escherichia coli*. In C. A. K. Borrebaeck (ed.), *Antibody engineering*, pp. 229-261. Oxford: Oxford University Press, 1995. 20
62. Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P. A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Plückthun, A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res.*, 59: 5758-5767, 1999.
63. Bass, S., Gu, Q., and Christen, A. Multicopy suppressors of *prc* mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated R1pA. *J. Bacteriol.*, 178: 1154-1161, 1996. 30
64. Plückthun, A., Krebber, A., Krebber, C., Horn, U., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Nieba, L., Proba, K., and Riesenberger, D. Producing antibodies in *Escherichia Coli*: from PCR to fermentation. In J. McCafferty, H. R. Hoogenboom, and D. J. Chiswell (eds.), *Antibody engineering*, pp. 203-252. Oxford: IRL Press, 1996. 30
65. Waibel, R., Alberto, R., Willuda, J., Finnern, R., Schibli, R., Stichelberger, A., Egli, A., Abram, U., Mach, J. P., Plückthun, A., and Schubiger, P. A. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nat. Biotechnol.*, 17: 897-901, 1999.
66. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., and Bunn, P. A., Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods*, 72: 77-89, 1984. 40

【 0 2 5 2 】

略語

ADME : 投与、分布、代謝および排泄

ADP : アデノシンリン酸

ALT : アラニンアミノトランスフェラーゼ (SGPT)

AST : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (SGOT) 50

BCA : ピシンコニン酸法	
C _{max} : 最大濃度	
DNA : デオキシリボ核酸	
Ep-CAM : 上皮細胞接着分子	
ETA : シュードモナス外毒素A	
EU : 内毒素単位	
FACS : 蛍光活性化セルソーター法	
GLP : 医薬品安全性試験実施基準	
HNSCC : 頭頸部の扁平上皮癌	
IC ₅₀ : 50%抑制濃度	10
i.t. : 腫瘍内	
i.v. : 静脈内	
kDa : キロダルトン	
LAL : リムルスアメーバ状細胞分解産物	
MAbs : モノクローナル抗体	
mg : ミリグラム	
mL : ミリリットル	
mM : ミリモル	
MTD : 最大耐量	
MTT : 3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド	20
NaCl : 塩化ナトリウム	
ng : ナノグラム	
PBS : リン酸緩衝食塩水	
pI : 等電点	
PK : 薬物動態	
pM : ピコモル	
p.t. : 腫瘍周囲	
s.c. : 皮下	
scFv : 一本鎖抗体断片	
SCLC : 小細胞肺癌	30
SD : 標準偏差	
SDS PAGE : 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	
t _{1/2} : 半減期	
μg : マイクログラム	
VLS : 血管漏出症候群	
WHO : 世界保健機関	
wt : 野生型	

【0253】

本発明は、上記の特定の態様により範囲において限定されるものではない。上で具体的に列挙されているものに加えて、本発明の多くの改変が、本開示に照らせば、当業者にとって明らかであると思われる。これらの改変は、添付された特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。上で引用されたすべての刊行物および特許は、完全に参照により本明細書に組み入れられている。

【図面の簡単な説明】

【0254】

本発明は、今、以下における図面に関して、記載される：

【図1】腫瘍への免疫毒素および/または他の癌治療用物質の腫瘍内投与についてのテンプレートを示す概略図である。

【図2】(A)VB4-845のマップ。マップは、4D5M0CB scFvおよびETA₂₅₂₋₆₀₈部分、加えて、ヒスチジンタグ、PeIBシグナル、リンカー領域、V_LおよびV_H領域、ETA領域II、IbおよびI

II、ならびにER保持シグナルを含む様々なドメインを連結した免疫毒素の構成を描く。(B)4D5MOCB-ETAの予測3次元モデル。scFv(VLおよびVH)、ETA252-608(ドメインII、IbおよびIII)、連結ペプチド、および両方のヒスチジntagの構造が示されている。

【図3】図3A~DならびにSEQ ID NO:1および2は、VB4-845のDNAおよびアミノ酸配列を示す。ヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、以下のものを含むドメインへ分けられ得る：周辺質発現のためのシグナル配列、ヒスチジntag、CDR1、2および3ドメイン、VLドメイン、VHドメイン、リンカー、ETAドメインII、Ib、III、ならびにER保持シグナルKDEL。

【図4】ヒト腫瘍異種移植片へのVB4-845の抗腫瘍効果^{5,3}。Ep-CAM陽性腫瘍異種移植片(HT29、SW2、CAL27)または陰性対照(COLO320())を有する胸腺欠損マウスは、5 μg(9用量())または10 μg(3用量())でのVB4-845で隔日に静脈内に処置された。腫瘍サイズは、160 mm³の最初の腫瘍サイズ中央値に対して与えられている。

10

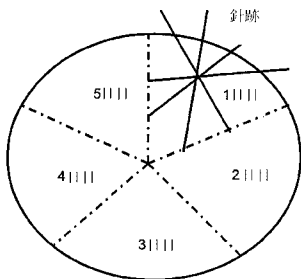
【図5】CAL27腫瘍異種移植片を有する胸腺欠損マウスの腫瘍周囲処置。Ep-CAM陽性CAL27腫瘍異種移植片を有する胸腺欠損マウスは、5 μg(9用量)でのVB4-845で隔日(月曜日/水曜日/金曜日)に腫瘍周囲に処置された。腫瘍サイズは、最初の腫瘍サイズ中央値に対して与えられている。

【図6】VB4-845(4D5MOCB-ETA)での処置における肝臓機能。比較のため、Schumann et al.^{5,5-5,6}に記載されているような野生型ETA(85 μg/kg)の単一致死量で処置されたマウスのトランスアミナーゼ活性も示されている。データは平均±SD(n=3)として表されている。

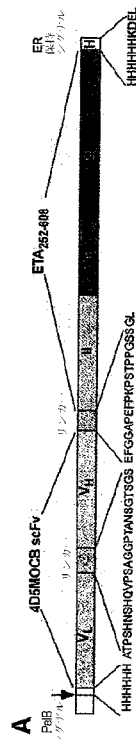
【図7】VB4-845により引き起こされた肝臓および脾臓における組織病理学的結果。円は、20 μg用量群における壊死肝細胞の領域を示している。

20

【図1】



【図2A】



【 図 2 B 】



【 図 3 A 】

*GAA*TTC CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA AGG AGA
EcoRI ----- Ara B -----

CAG TCA TA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC
M K Y L L P T A A A G L L L L A A
Pal B -----

CAA CCA GCG ATG GCG CAC CAT CAT CAC CAT CAC GAT ATC CAG ATG ACC CAG TCC CCG
Q P A M A H H H H H H D I Q M T Q S P
His_c ----- V_L 開始

1 5 10

TCC TCC CTG AGT GCT TCT GTT GGT GAC CGT GTT ACC ATC ACC TGC CGT TCC ACC AAA
S S L S A S V G D R V T I T C R S T K

15 20 25 30

TCC CTC CTG CAC TCC AAC GGT ATC ACC TAC CTT TAT TGG TAT CAA CAG AAA CCG GGT
S L L H S N G I T Y L Y W Y Q Q K P G
CDR 1 (L) -----

35 40 45 50

AAA GCT CCG AAA CTT CTG ATC TAC CAG ATG TCC AAC CTG GCT TCC GGT GGT CCG TCT
K A P K L L I Y Q M S N L A S G V P S
CDR 2 (L) -----

55 60 65 70

CGT TTC TCC AGT TCT GGT TCT GGT ACC GAC TTC ACC CTG ACC ATC TCT TCT CTG CAG
R F S S S G S G T D F T L T I S S L Q
75 80 85 90

CCG GAA GAC TTC GCT ACC TAC TGC GCT CAG AAC CTG GAA ATC CCG GGT ACC TTC
P E D F A T Y Y C A Q N L E I P R T F
95 100 105 110

GGT CAG GGT ACC AAA GTT GAA CTT AAG CGC GCT ACC CCG TCT CAC AAC TCC CAG CAG
G Q G T K V E L K R A T P S H N S H Q
V_L 終わり -----

110 115 120 125

GTT CCA TCC GCA GGC GGT CCG ACT GCT AAC TCT GGA ACT AGT GGA TCC GAA GTA CAG
V P S A G G P F A N S G T S G S E V Q
リンカ ----- V_H 開始

130 135 140 145

CTG GTT CAG TCC GGC CCG GGT CTT GTT CAA CCG GGT GGT TCC GTT CGT ATC TCT TGC
L V Q S G P G L V Q P F G G S V R I S C
150 155 160 165

【 図 3 B 】

GCT TCT GGT TAC ACG TTC ACC AAC TAC GGC ATG AAC TGG GTC AAA CAG GCT CCG
A A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P
170 175 180 185
CDR 1 (H) -----

GGT AAA GGC CTG GAA TGG ATG GGC ATC AAC ACC TAC ACC GGT GAA TCC ACC TAC
G K G L E W M G W I N T Y T G E S T Y
190 195 200
CDR 2 (H) -----

GCT GAC TCC TTC AAA GGT CGC TTC ACT TTC TCC CTC GAC ACA AGT GCT AGT GCT GCA
A D S F K G R F T F S L D T S A S A A
205 210 215 220

TAC CTC CAA ATC AAC TCG CTG CGT GCA GAG GAT ACA GCA GTC TAT TAC TGC GCC CGT
Y L Q I N S L R A E D T A V Y Y C A R
225 230 235 240

TTC GCT ATC AAA GGT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACG CTG CTG ACC GTT TCC TCG GAA
F A I K G D Y W G Q G T L L T V S S E
245 250 255 260
CDR 3 (H) -----

TTT GGT GGC GCG CCG GAG TTC CCG AAA CCG TCC ACC CCG CCG GGT TCT TCT GGT TTA
F G G A P E F P K P S T P P G S S G L
265 270 275 280
リンカ -----

GAG GGC GGC AGC CTG GCC CGC CTG ACC GCG CAC CAG GCC TGC CAC CTG CCG CTG GAG
R G G S L A A L T A H Q A C H L P L E
ETA 252-608 開始 -----
285 290 295

ACT TTC ACC CGT CAT CGC CAG CCG CGC GGC TGG GAA CAA CTG GAG CAG TGC GGC TAT
T F T R H R Q P R G W E Q L E Q C G Y
300 305 310 315

CCG GTG CAG CGC CTG GTC GCC CTC TAC CTG GCG GCG CGA CTG TCA TGG AAC CAG CTG
P V Q R L V A L Y L A A R L S W N Q V
320 325 330 335

GAC CAG GTG ATC CGC AAC GCC CTG GCC AGC CCC GGC AGC GGC GGC GAC CTG GGC GAA
D Q V I R N A L A S P G S G G D L G E
340 345 350 355

【 図 3 C 】

GCG ATC CCG GAG CAG CCG GAG CAG GCC CGT CTG GCC CTG ACC CTG GCC GCC GCG GAG
A I R E Q P E Q A R L A L T L A A A E
360 365 370 375

AGC GAG CGC TTC GTC CCG CAG GGC ACC GGC AAC GAC GAG GCC GGC GCG GCC AGC CCG
S E R F V R Q G T G N D E A G A A S A
380 385 390

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

AGC GGC GAC GCC CTG CTG GAG CGC AAC TAT CCC ACT GGC GCG 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 CCG GGC ACG CAG AAC TGG ACG GTG GAG CCG CTG
G G D V S F S T R G T Q N W T V E R L
435 440 445 450

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

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

GAT CTC GAC GCG ATC TGG CCG GGT TTC TAT ATC GCC GGC GAT CCG CCG CTG GCC 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 GCC CAG GAC CAG GAA CCC GAC GCG CGC GGC ATC CGC AAC GGT GCC CTG
G Y A Q D Q E P D A R G R I R N G A L
510 515 520 525

CTG CCG GTC TAT GTG CCG CGC TCC AGC CTG CCG GGC TTC TAC CGC ACC GGC CTG ACC
L R V Y V P R S S L P G F Y R T G L T
530 535 540 545

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

【 図 3 D 】

```

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

CTC GGC TGG CCG CTG GCC GAG CGC ACC GTG GTG ATT CCC TCG GCG ATC CCC ACC GAC
L G W P L A E R T V V I P S A I P T D
585          590          595          600

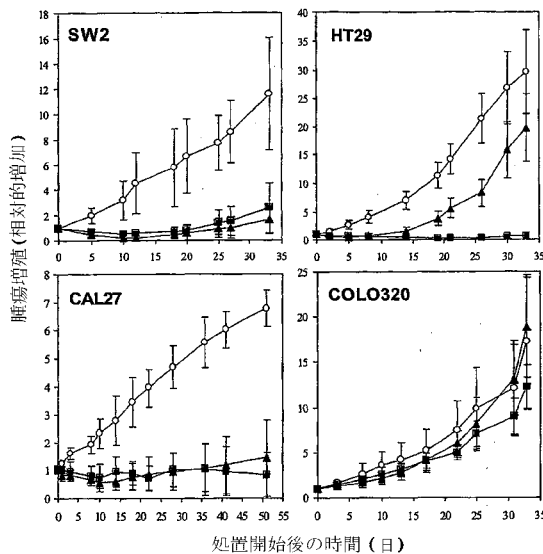
CGC CGC AAC GTC GGT GGC GAC CTC GAC CCG TCC AGC ATC CCC GAC AAG GAA CAG GCG
P R N V G G D L D P S S I P D K E Q A
          605          610          615          620

ATC AGC GCC CTG CCG GAC TAC GCC AGC CAG CCC GGC AAA CCG CCG CAT CAC CAC CAT
I S A L P D Y A S Q P G K P P H H H
          625          630          635          640
          ETA 253-608 終わり-----| His6

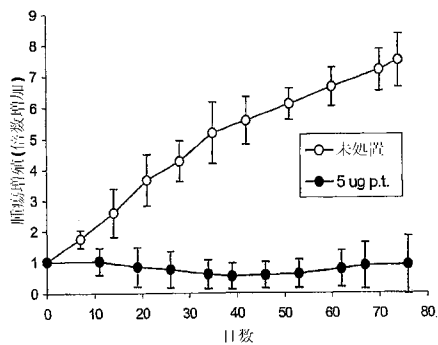
CAC CAT AAA GAC GAA CTG TAG TGA CTC GAG
H H K D E L . . L E
          645          651
          Xho I

```

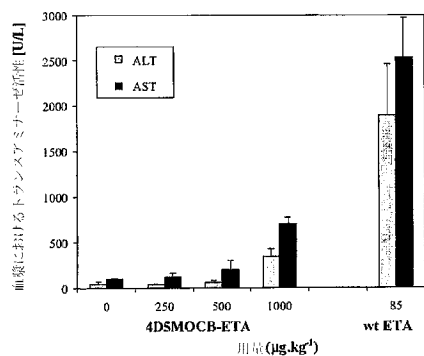
【 図 4 】



【 図 5 】

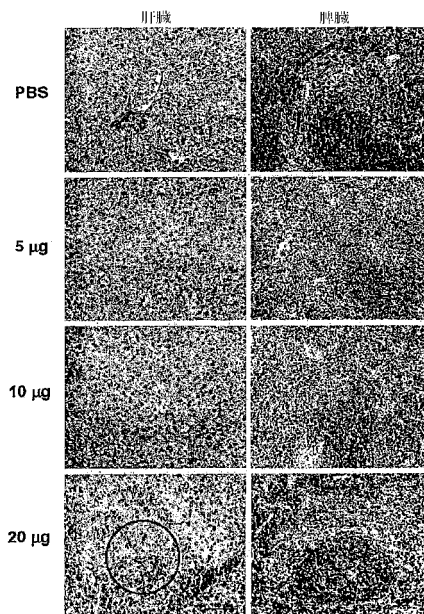


【 図 6 】



【 図 7 】

VB4-845により引き起こされた肝臓および脾臓における組織病理学的結果
 図は 20 μg 用量群における壊死肝細胞の領域を示している



【配列表】

2006526576000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA2004/000637
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/395 C07K16/30 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STROME SCOTT E ET AL: "Interleukin 4 receptor-directed cytotoxin therapy for human head and neck squamous cell carcinoma in animal models." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. JAN 2002, vol. 8, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 281-286, XP009037863 ISSN: 1078-0432	1,3-5,8, 18-23, 25-30, 32-34, 37,40, 45, 47-49, 51,57
Y	abstract; figures 1-6	2,6, 9-17,24, 31,35, 36,38, 39, 41-44, 46,50, 52-56
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 October 2004		Date of mailing of the international search report 28/10/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Favre, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/CA2004/000637

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUBETZKO & ZANGEMEISTER-WITTKÉ: "Engineering of an EGP-2 (Ep-CAM) specific antibody-immunotoxin for targeted therapy of solid tumors" SWISS CANCER BULLETIN, vol. 20, no. 4, 2000, pages 182-187, XP009037930 abstract; figures 1-5 -----	2,6, 9-17,24, 31,35, 36,38, 39, 41-44, 46,50, 52-56
A	BALZAR M ET AL: "The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 77, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 699-712, XP000925817 ISSN: 0946-2716 the whole document -----	1-57
Y	WO 00/61635 A (UNIV ZUERICH ; HONEGGER ANNEMARIE (CH); PLUECKTHUN ANDREAS (CH); WILLU) 19 October 2000 (2000-10-19) cited in the application the whole document -----	1-57
Y	MCLAUGHLIN P M ET AL: "The epithelial glycoprotein 2 (EGP-2) promoter-driven epithelial-specific expression of EGP-2 in transgenic mice: a new model to study carcinoma-directed immunotherapy." CANCER RESEARCH. 15 MAY 2001, vol. 61, no. 10, 15 May 2001 (2001-05-15), pages 4105-4111, XP002300242 ISSN: 0008-5472 the whole document -----	1-57
Y	US 2002/193570 A1 (GILLIES STEPHEN D ET AL) 19 December 2002 (2002-12-19) paragraph 0065! -----	1-57
A	WILLUDA J ET AL: "HIGH THERMAL STABILITY IS ESSENTIAL FOR TUMOR TARGETING OF ANTIBODY FRAGMENTS: ENGINEERING OF A HUMANIZED ANTI-EPITHELIAL GLYCOPROTEIN-2 (EPITHELIAL CELL ADHESION MOLECULE) SINGLE-CHAIN FV FRAGMENT" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, no. 22, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 5758-5767, XP000941616 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document -----	1-57
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/CA2004/000637

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/69914 A (OXFORD BIOMEDICA LTD ; REURS ANNEKE (NL); BEIBOER SIGRID HERMA WILMA B) 23 November 2000 (2000-11-23) the whole document	1-57
A	KREITMAN R J: "Immunotoxins in cancer therapy" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, vol. 11, no. 5, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 570-578, XP004257587 ISSN: 0952-7915 the whole document	1-57
A	SYRIGOS K N ET AL: "Use of monoclonal antibodies for the diagnosis and treatment of bladder cancer." HYBRIDOMA, JUN 1999, vol. 18, no. 3, June 1999 (1999-06), pages 219-224, XP009037869 ISSN: 0272-457X the whole document	1-57
A	ZIMMERMANN S ET AL: "A NOVEL IMMUNOTOXIN RECOGNISING THE EPITHELIAL GLYCOPROTEIN-2 HAS POTENT ANTITUMOR ACTIVITY ON CHEMOTHERAPY-RESISTANT LUNG CANCER" CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, BERLIN, DE, vol. 44, no. 1, 1997, pages 1-9, XP000941617 ISSN: 0340-7004 the whole document	1-57
A	LEMAISTRE C F ET AL: "AN IMMUNOTOXIN CYTOTOXIC FOR BREAST CANCER CELLS IN-VITRO" CANCER RESEARCH, vol. 47, no. 3, 1987, pages 730-734, XP009038045 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-57
P,X	DI PAOLO ET AL: "A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity" CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 9, July 2003 (2003-07), pages 2837-2848, XP0012003425 the whole document	1-57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2004/000637**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 57
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 57 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically;
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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 additional 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/CA2004/000637

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 57 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA2004/000637

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0061635	A	19-10-2000	CA 2369622 A1	19-10-2000
			WO 0061635 A2	19-10-2000
			EP 1171468 A2	16-01-2002
			JP 2002542773 T	17-12-2002
			US 2002146846 A1	10-10-2002
US 2002193570	A1	19-12-2002	AT 267215 T	15-06-2004
			AU 763719 B2	31-07-2003
			AU 1716099 A	28-06-1999
			CA 2312188 A1	17-06-1999
			DE 69824039 D1	24-06-2004
			DK 1037927 T3	06-09-2004
			EP 1037927 A2	27-09-2000
			JP 2001525423 T	11-12-2001
			WO 9929732 A2	17-06-1999
WO 0069914	A	23-11-2000	AU 4935000 A	05-12-2000
			WO 0069914 A2	23-11-2000

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K 16/28
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/46
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K	14/21	(2006.01)	C 0 7 K 14/21

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 チュディ ドミニク クリスティン
 スイス連邦 チューリッヒ ベルリールシュトラッセ 49

(72) 発明者 グラバー ニコラス ロナルド
 カナダ国 オンタリオ州 オークビル ディアー ラン アベニュー 2389

(72) 発明者 フィットシアロス デイミトリ ペーター
 カナダ国 オンタリオ州 トロント キーウェティン アベニュー 323

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA01 BA03 BA08 BA22 BA23 CA04 DA32 MA02
 NA13 ZB26
 4C085 AA13 BB31 EE03
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA11 CA40 DA76 DA83 EA20
 EA28 FA72 FA74 GA10 GA22 GA26

专利名称(译)	使用免疫毒素治疗癌症的方法		
公开(公告)号	JP2006526576A	公开(公告)日	2006-11-24
申请号	JP2006504127	申请日	2004-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
[标]发明人	ツァングマイスター-ウイトケウーヴェ パオロクラウディオディ チュディドミニククリスティン グラバーニコラスロナルド フィットシアロスディミトリペーター		
发明人	ツァングマイスター-ウイトケウーヴェ パオロクラウディオディ チュディドミニククリスティン グラバーニコラスロナルド フィットシアロスディミトリペーター		
IPC分类号	A61K45/00 A61K38/00 A61P35/00 A61K39/395 G01N33/53 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C07K14/21 A61K39/00 A61K47/48 C07K16/30		
CPC分类号	A61K47/6829 A61K47/6861 A61K2039/505 A61P13/10 A61K47/6865 C07K14/21 C07K14/34 C07K16 /30 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/622 C07K2319/30 A61K45/06 C07K16/28 C07K2317/565 C07K2317/92		
FI分类号	A61K45/00 A61K37/02.ZNA A61P35/00 A61K39/395.E G01N33/53.D C07K16/28 C07K16/46 C07K19 /00 C07K14/21		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA03 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084 /CA04 4C084/DA32 4C084/MA02 4C084/NA13 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/BB31 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045 /DA76 4H045/DA83 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA22 4H045/GA26		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/466608 2003-04-30 US		
其他公开文献	JP4988333B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用免疫毒素预防或治疗头颈部鳞状细胞癌和膀胱癌的方法，所述免疫毒素包含 (a) 与附着于癌细胞上的蛋白质结合的配体；(b) 对癌细胞具有细胞毒性的毒素。在一个具体实施方案中，本发明涉及使用VB4-845预防或治疗头颈部鳞状细胞癌或膀胱癌，VB4-845是一种重组免疫毒素，其包含融合的人源化MOC31衍生的单链抗体片段。截短形式的假单胞菌外毒素A。本发明还包括联合治疗方法，包括使用减少剂量的化学治疗剂，用于预防或治疗癌症。本发明还包括用于将重组免疫毒素直接给予癌症，用于预防或治疗癌症的制剂和方法。

