

(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2013-516437**

**(P2013-516437A)**

(43) 公表日 **平成25年5月13日(2013.5.13)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Z N A E	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 35/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 1/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/04	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/00	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 122 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-547492 (P2012-547492)  
 (86) (22) 出願日 平成23年1月7日 (2011.1.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年9月5日 (2012.9.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/000046  
 (87) 国際公開番号 W02011/083088  
 (87) 国際公開日 平成23年7月14日 (2011.7.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/367,855  
 (32) 優先日 平成22年7月26日 (2010.7.26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/293,612  
 (32) 優先日 平成22年1月8日 (2010.1.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512097880  
 ビオレアリテ  
 B I O R E A L I T E S  
 フランス国、エフ-92284 シュレス  
 ネ・セデックス、リュ・ドゥ・ヴェルダン  
 35  
 (71) 出願人 591100596  
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ  
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ  
 ディカル  
 フランス国 75654 パリ セデック  
 ス 13リュ ドゥ トルビアック 10  
 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸直腸癌を処置するための方法

(57) 【要約】

本開示は、抗プロガストリン抗体を含む組成物を用いて結腸直腸癌転移又は結腸直腸癌の再発を処置及び防止する方法に向けられる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

転移性結腸直腸癌のための処置を必要とする患者に、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物の治療的に効果的な量を投与する工程を含む、転移性結腸直腸癌を処置するための方法。

## 【請求項 2】

転移性結腸直腸癌が、肝臓、肺、脳、又はリンパ節に位置する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸腫瘍の外科的切除の前に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸腫瘍の外科的切除の後に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸腫瘍の放射線治療の用量の投与の前に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸腫瘍の放射線治療の用量の投与の後に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸腫瘍を処置するための化学療法剤の投与の前に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸腫瘍を処置するための化学療法剤の投与と同時に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 9】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸腫瘍を処置するための化学療法剤の投与の後に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 10】

化学療法剤が、以下：葉酸拮抗剤、プリン拮抗剤、ピリミジン拮抗剤、DNAアルキル化剤、DNA架橋薬、抗生物質、白金錯体、プロテアソーム阻害剤、有糸分裂紡錘体毒、トポイソメラーゼ阻害剤、及びチロシンキナーゼ阻害剤からなる化学療法剤の群の間より選択される、請求項 7～9 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 11】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、プロガストリン以外についての特異性を有する第 2 の治療用抗体の投与の前に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、プロガストリン以外についての特異性を有する第 2 の治療用抗体の投与と同時に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 13】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、プロガストリン以外についての特異性を有する第 2 の治療用抗体の投与の後に遂げられる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 14】

第 2 の抗体が VEGF 又は EGF R に特異的に結合する、請求項 11～13 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 15】

第 2 の抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、及びベバシズマブからなるモノクローナル抗体の群の間より選択される、請求項 11～13 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 16】

抗プロガストリン抗体が、以下：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化モ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、及びIgM抗体からなる群の間より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項17】

抗体を成分に結合させる、請求項1記載の方法。

【請求項18】

成分が非タンパク質性である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

成分が抗体の血清半減期を増加させるために効果的である、請求項17記載の方法。

【請求項20】

抗体を改変して、FcRnへのその結合を増加させる、請求項1記載の方法。

【請求項21】

抗体が、少なくとも約0.001nM~少なくとも約5000nMのプロガストリン結合親和性を有する、請求項1記載の方法。

【請求項22】

組成物が、プロガストリンの別のエピトープについての特異性を有する複数の抗体を含む、請求項1記載の方法。

【請求項23】

プロガストリン特異的抗体が、以下：MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb5、MAb6、MAb7、MAb8、MAb9、MAb10、MAb11、MAb12、MAb13、MAb14、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、MAb20、MAb21、MAb22、及びMAb23からなる群の間より選択されるモノクローナル抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項24】

モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項23記載の方法。

【請求項25】

プロガストリン特異的抗体が重鎖可変領域( $V_H$ )を含むモノクローナル抗体であり、相補性決定領域1(CDR1)が $V_H$  CDR 1.3、 $V_H$  CDR 1.4、 $V_H$  CDR 1.8、 $V_H$  CDR 1.13、 $V_H$  CDR 1.16、 $V_H$  CDR 1.19より選択され、CDR2が $V_H$  CDR 2.3、 $V_H$  CDR 2.4、 $V_H$  CDR 2.8、 $V_H$  CDR 2.13、 $V_H$  CDR 2.16、 $V_H$  CDR 2.19より選択され、CDR3が $V_H$  CDR 3.3、 $V_H$  CDR 3.4、 $V_H$  CDR 3.8、 $V_H$  CDR 3.13、 $V_H$  CDR 3.16、 $V_H$  CDR 3.19より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項26】

プロガストリン特異的抗体が軽鎖可変領域( $V_L$ )を含むモノクローナル抗体であり、相補性決定領域1(CDR1)が $V_L$  CDR 1.3、 $V_L$  CDR 1.4、 $V_L$  CDR 1.8、 $V_L$  CDR 1.13、 $V_L$  CDR 1.16、 $V_L$  CDR 1.19より選択され、CDR2が $V_L$  CDR 2.3、 $V_L$  CDR 2.4、 $V_L$  CDR 2.8、 $V_L$  CDR 2.13、 $V_L$  CDR 2.16、 $V_L$  CDR 2.19より選択され、CDR3が $V_L$  CDR 3.3、 $V_L$  CDR 3.4、 $V_L$  CDR 3.8、 $V_L$  CDR 3.13、 $V_L$  CDR 3.16、 $V_L$  CDR 3.19より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項27】

抗体が、プロガストリン感受性の転移性結腸直腸癌細胞の増殖を低下させることが可能である、請求項1記載の方法。

【請求項28】

抗体が、プロガストリン感受性の転移性結腸直腸癌細胞の細胞死の速度を増加させることが可能である、請求項1記載の方法。

【請求項29】

10

20

30

40

50

処置が、処置された被験者において結腸直腸癌転移の平均数を低下させるために効果的である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 30】

処置が、処置された被験者において結腸直腸癌転移の平均サイズを低下させるために効果的である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 31】

処置が、処置された被験者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 32】

抗体組成物が、以下：非経口投与、髄腔内投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、注入投与、又はボラス投与からなる群の間より選択される投与様式により投与される、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 33】

抗プロガストリン抗体が約 0.001 mg/kg ~ 約 250 mg/kg の用量で投与される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 34】

抗プロガストリン抗体の用量を、複数の時間的に間隔を空けた投与にわたり投与する、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

抗プロガストリン抗体の単位用量及び希釈剤を含む、転移性結腸直腸癌を処置するためのキット。

20

【請求項 36】

抗プロガストリン抗体を転移性結腸直腸癌のための処置を必要とする患者に投与するための指示をさらに含む、請求項 35 記載のキット。

【請求項 37】

転移性結腸直腸癌の防止を必要とする患者に、転移性結腸直腸癌を防止するために効果的な量で、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物を投与する工程を含む、転移性結腸直腸癌を防止するための方法。

【請求項 38】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、原発性結腸直腸腫瘍の外科的切除の前に遂げられる、請求項 37 記載の方法。

30

【請求項 39】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、原発性結腸直腸腫瘍の外科的切除の後に遂げられる、請求項 37 記載の方法。

【請求項 40】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、原発性結腸直腸腫瘍のための放射線治療の用量を投与する前に遂げられる、請求項 37 記載の方法。

【請求項 41】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、原発性結腸直腸腫瘍のための放射線治療の用量を投与する後に遂げられる、請求項 37 記載の方法。

40

【請求項 42】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、転移性結腸直腸癌の防止のために効果的な第 2 の薬剤の投与の前、それと同時に、又はその後に遂げられる、請求項 37 記載の方法。

【請求項 43】

第 2 の薬剤が、転移性結腸直腸癌を防止するために効果的な化学療法剤である、請求項 42 記載の方法。

【請求項 44】

化学療法剤が、以下：葉酸拮抗剤、プリン拮抗剤、ピリミジン拮抗剤、DNA アルキル化剤、DNA 架橋薬、抗生物質、白金錯体、プロテアソーム阻害剤、有糸分裂紡錘体毒、

50

トポイソメラーゼ阻害剤、及びチロシンキナーゼ阻害剤からなる化学療法剤の群の間より選択される、請求項 4 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 5】

第 2 の薬剤が、プロガストリン以外についての特異性を有する治療用抗体である、請求項 4 2 記載の方法。

【請求項 4 6】

抗プロガストリン抗体が、以下：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、I g A 1 抗体、I g A 2 抗体、I g D 抗体、I g E 抗体、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体、I g G 4 抗体、及び I g M 抗体からなる群の間より選択される、請求項 3 7 記載の方法。

10

【請求項 4 7】

抗体を成分に結合させる、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 8】

成分が非タンパク質性である、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

成分が抗体の血清半減期を増加させるために効果的である、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 0】

抗体を改変し、F c R n へのその結合を増加させる、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 5 1】

抗体が、少なくとも約 0 . 0 0 1 nM ~ 少なくとも約 5 0 0 0 nM のプロガストリン結合親和性を有する、請求項 3 7 記載の方法。

20

【請求項 5 2】

組成物が、プロガストリンの別々のエピトープについての特異性を有する複数の抗体を含む、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 5 3】

プロガストリン特異的抗体が、以下：M A b 1、M A b 2、M A b 3、M A b 4、M A b 5、M A b 6、M A b 7、M A b 8、M A b 9、M A b 1 0、M A b 1 1、M A b 1 2、M A b 1 3、M A b 1 4、M A b 1 5、M A b 1 6、M A b 1 7、M A b 1 8、M A b 1 9、M A b 2 0、M A b 2 1、M A b 2 2、及び M A b 2 3 からなる群の間より選択されるモノクローナル抗体である、請求項 3 7 記載の方法。

30

【請求項 5 4】

モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

プロガストリン特異的抗体が重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) を含むモノクローナル抗体であり、それにおいて相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) が V<sub>H</sub> C D R 1 . 3、V<sub>H</sub> C D R 1 . 4、V<sub>H</sub> C D R 1 . 8、V<sub>H</sub> C D R 1 . 1 3、V<sub>H</sub> C D R 1 . 1 6、V<sub>H</sub> C D R 1 . 1 9 より選択され、C D R 2 が V<sub>H</sub> C D R 2 . 3、V<sub>H</sub> C D R 2 . 4、V<sub>H</sub> C D R 2 . 8、V<sub>H</sub> C D R 2 . 1 3、V<sub>H</sub> C D R 2 . 1 6、V<sub>H</sub> C D R 2 . 1 9 より選択され、C D R 3 が V<sub>H</sub> C D R 3 . 3、V<sub>H</sub> C D R 3 . 4、V<sub>H</sub> C D R 3 . 8、V<sub>H</sub> C D R 3 . 1 3、V<sub>H</sub> C D R 3 . 1 6、V<sub>H</sub> C D R 3 . 1 9 より選択される、請求項 3 7 記載の方法。

40

【請求項 5 6】

プロガストリン特異的抗体が軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) を含むモノクローナル抗体であり、それにおいて相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) が V<sub>L</sub> C D R 1 . 3、V<sub>L</sub> C D R 1 . 4、V<sub>L</sub> C D R 1 . 8、V<sub>L</sub> C D R 1 . 1 3、V<sub>L</sub> C D R 1 . 1 6、V<sub>L</sub> C D R 1 . 1 9 より選択され、C D R 2 が V<sub>L</sub> C D R 2 . 3、V<sub>L</sub> C D R 2 . 4、V<sub>L</sub> C D R 2 . 8、V<sub>L</sub> C D R 2 . 1 3、V<sub>L</sub> C D R 2 . 1 6、V<sub>L</sub> C D R 2 . 1 9 より選択され、C D R 3 が V<sub>L</sub> C D R 3 . 3、V<sub>L</sub> C D R 3 . 4、V<sub>L</sub> C D R 3 . 8、V<sub>L</sub> C D R 3 . 1 3、V<sub>L</sub> C D R 3 . 1 6、V<sub>L</sub> C D R 3 . 1 9 より選択される、請求項 3 7 記載の方法。

50

## 【請求項 57】

抗体が、プロガストリン感受性の転移性結腸直腸癌細胞の増殖を阻害することが可能である、請求項 37 記載の方法。

## 【請求項 58】

抗体が、プロガストリン感受性の転移性結腸直腸癌細胞の細胞死の速度を増加させることが可能である、請求項 37 記載の方法。

## 【請求項 59】

抗体の投与が、処置された被験者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的である、請求項 37 記載の方法。

## 【請求項 60】

抗体組成物が、以下：非経口投与、髄腔内投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、注入投与、又はボラス投与からなる群の間より選択される投与様式により投与される、請求項 37 記載の方法。

## 【請求項 61】

抗プロガストリン抗体が約 0.001 mg/kg ~ 約 250 mg/kg の用量で投与される、請求項 37 記載の方法。

## 【請求項 62】

抗プロガストリン抗体の用量を、複数の時間的に間隔を空けた投与にわたり投与する、請求項 61 記載の方法。

## 【請求項 63】

結腸直腸癌の再発を防止するために効果的な量で、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物を、結腸直腸癌の再発の防止を必要とする患者に投与する工程を含む、結腸直腸癌の再発を防止するための方法。

## 【請求項 64】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、結腸直腸癌の再発の防止のために効果的な第 2 の薬剤の投与の前、それと同時に、又はその後遂げられる、請求項 63 記載の方法。

## 【請求項 65】

第 2 の薬剤が、プロガストリン以外についての特異性を有する治療用抗体である、請求項 64 記載の方法。

## 【請求項 66】

抗プロガストリン抗体が、以下：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、IgA1 抗体、IgA2 抗体、IgD 抗体、IgE 抗体、IgG1 抗体、IgG2 抗体、IgG3 抗体、IgG4 抗体、及び IgM 抗体からなる群の間より選択される、請求項 63 記載の方法。

## 【請求項 67】

抗体を成分に結合させる、請求項 63 記載の方法。

## 【請求項 68】

成分が非タンパク質性である、請求項 67 記載の方法。

## 【請求項 69】

成分が抗体の血清半減期を増加させるために効果的である、請求項 67 記載の方法。

## 【請求項 70】

抗体を改変し、FcRn へのその結合を増加させる、請求項 63 記載の方法。

## 【請求項 71】

抗体が、少なくとも約 0.001 nM ~ 少なくとも約 5000 nM のプロガストリン結合親和性を有する、請求項 63 記載の方法。

## 【請求項 72】

組成物が、プロガストリンの別々のエピトープについての特異性を有する複数の抗体を含む、請求項 63 記載の方法。

## 【請求項 73】

10

20

30

40

50

プロガストリン特異的抗体が、以下：MAb 1、MAb 2、MAb 3、MAb 4、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 15、MAb 16、MAb 17、MAb 18、MAb 19、MAb 20、MAb 21、MAb 22、及びMAb 23からなる群の間より選択されるモノクローナル抗体である、請求項 63 記載の方法。

【請求項 74】

モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項 73 記載の方法。

【請求項 75】

プロガストリン特異的抗体が重鎖可変領域 ( $V_H$ ) を含むモノクローナル抗体であり、相補性決定領域 1 (CDR1) が  $V_H$  CDR 1.3、 $V_H$  CDR 1.4、 $V_H$  CDR 1.8、 $V_H$  CDR 1.13、 $V_H$  CDR 1.16、 $V_H$  CDR 1.19 より選択され、CDR2 が  $V_H$  CDR 2.3、 $V_H$  CDR 2.4、 $V_H$  CDR 2.8、 $V_H$  CDR 2.13、 $V_H$  CDR 2.16、 $V_H$  CDR 2.19 より選択され、CDR3 が  $V_H$  CDR 3.3、 $V_H$  CDR 3.4、 $V_H$  CDR 3.8、 $V_H$  CDR 3.13、 $V_H$  CDR 3.16、 $V_H$  CDR 3.19 より選択される、請求項 63 記載の方法。

10

【請求項 76】

プロガストリン特異的抗体が軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) を含むモノクローナル抗体であり、相補性決定領域 1 (CDR1) が  $V_L$  CDR 1.3、 $V_L$  CDR 1.4、 $V_L$  CDR 1.8、 $V_L$  CDR 1.13、 $V_L$  CDR 1.16、 $V_L$  CDR 1.19 より選択され、CDR2 が  $V_L$  CDR 2.3、 $V_L$  CDR 2.4、 $V_L$  CDR 2.8、 $V_L$  CDR 2.13、 $V_L$  CDR 2.16、 $V_L$  CDR 2.19 より選択され、CDR3 が  $V_L$  CDR 3.3、 $V_L$  CDR 3.4、 $V_L$  CDR 3.8、 $V_L$  CDR 3.13、 $V_L$  CDR 3.16、 $V_L$  CDR 3.19 より選択される、請求項 63 記載の方法。

20

【請求項 77】

抗体が、プロガストリン感受性の転移性結腸直腸癌細胞の増殖を阻害することが可能である、請求項 63 記載の方法。

【請求項 78】

抗体が、プロガストリン感受性の転移性結腸直腸癌細胞の細胞死の速度を増加させることが可能である、請求項 63 記載の方法。

30

【請求項 79】

抗体の投与が、処置された被験者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的である、請求項 63 記載の方法。

【請求項 80】

抗体組成物が、以下：非経口投与、髄腔内投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、注入投与、又はポラス投与からなる群の間より選択される投与様式により投与される、請求項 63 記載の方法。

【請求項 81】

抗プロガストリン抗体が約 0.001 mg/kg ~ 約 250 mg/kg の用量で投与される、請求項 63 記載の方法。

40

【請求項 82】

抗プロガストリン抗体の用量を、複数の時間的に間隔を空けた投与にわたり投与する、請求項 81 記載の方法。

【請求項 83】

患者が結腸直腸癌のための処置を以前に受けており、該処置の後に、該結腸直腸癌が見かけ上消失した、請求項 63 記載の方法。

【請求項 84】

処置が、手術、放射線治療、生物学的治療、免疫療法、及び化学療法からなる群の間より選択された、請求項 83 記載の方法。

50

## 【請求項 8 5】

結腸直腸癌幹細胞の成長の阻害を必要とする患者に、該結腸直腸癌幹細胞を阻害するために効果的な量で、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物を投与する工程を含む、患者において結腸直腸癌幹細胞の成長を阻害するための方法。

## 【請求項 8 6】

抗プロガストリン抗体組成物を投与する工程が、結腸直腸癌幹細胞の成長を阻害するために効果的な第2の薬剤の投与の前、それと同時に、又はその後に遂げられる、請求項 8 5 記載の方法。

## 【請求項 8 7】

第2の薬剤が、プロガストリン以外についての特異性を有する治療用抗体である、請求項 8 6 記載の方法。

10

## 【請求項 8 8】

抗プロガストリン抗体が、以下：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、I g A 1 抗体、I g A 2 抗体、I g D 抗体、I g E 抗体、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体、I g G 4 抗体、及び I g M 抗体からなる群の間より選択される、請求項 8 5 記載の方法。

## 【請求項 8 9】

抗体を成分に結合させる、請求項 8 5 記載の方法。

## 【請求項 9 0】

成分が非タンパク質性である、請求項 8 9 記載の方法。

20

## 【請求項 9 1】

成分が抗体の血清半減期を増加させるために効果的である、請求項 8 9 記載の方法。

## 【請求項 9 2】

抗体を改変し、FcRnへのその結合を増加させる、請求項 8 5 記載の方法。

## 【請求項 9 3】

抗体が、少なくとも約 0.001 nM ~ 少なくとも約 5000 nM のプロガストリン結合親和性を有する、請求項 8 5 記載の方法。

## 【請求項 9 4】

組成物が、プロガストリンの別々のエピトープについての特異性を有する複数の抗体を含む、請求項 8 5 記載の方法。

30

## 【請求項 9 5】

プロガストリン特異的抗体が、以下：MAb 1、MAb 2、MAb 3、MAb 4、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 15、MAb 16、MAb 17、MAb 18、MAb 19、MAb 20、MAb 21、MAb 22、及び MAb 23 からなる群の間より選択されるモノクローナル抗体である、請求項 8 5 記載の方法。

## 【請求項 9 6】

モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項 9 5 記載の方法。

## 【請求項 9 7】

プロガストリン特異的抗体が重鎖可変領域 ( $V_H$ ) を含むモノクローナル抗体であり、相補性決定領域 1 (CDR 1) が  $V_H$  CDR 1.3、 $V_H$  CDR 1.4、 $V_H$  CDR 1.8、 $V_H$  CDR 1.13、 $V_H$  CDR 1.16、 $V_H$  CDR 1.19 より選択され、CDR 2 が  $V_H$  CDR 2.3、 $V_H$  CDR 2.4、 $V_H$  CDR 2.8、 $V_H$  CDR 2.13、 $V_H$  CDR 2.16、 $V_H$  CDR 2.19 より選択され、CDR 3 が  $V_H$  CDR 3.3、 $V_H$  CDR 3.4、 $V_H$  CDR 3.8、 $V_H$  CDR 3.13、 $V_H$  CDR 3.16、 $V_H$  CDR 3.19 より選択される、請求項 8 5 記載の方法。

40

## 【請求項 9 8】

プロガストリン特異的抗体が軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) を含むモノクローナル抗体であり、それにおいて相補性決定領域 1 (CDR 1) が  $V_L$  CDR 1.3、 $V_L$  CDR 1

50

・ 4、V<sub>L</sub> CDR 1.8、V<sub>L</sub> CDR 1.13、V<sub>L</sub> CDR 1.16、V<sub>L</sub> CDR 1.19より選択され、CDR2がV<sub>L</sub> CDR 2.3、V<sub>L</sub> CDR 2.4、V<sub>L</sub> CDR 2.8、V<sub>L</sub> CDR 2.13、V<sub>L</sub> CDR 2.16、V<sub>L</sub> CDR 2.19より選択され、CDR3がV<sub>L</sub> CDR 3.3、V<sub>L</sub> CDR 3.4、V<sub>L</sub> CDR 3.8、V<sub>L</sub> CDR 3.13、V<sub>L</sub> CDR 3.16、V<sub>L</sub> CDR 3.19より選択される、請求項85記載の方法。

【請求項99】

抗体の投与が、処置された被験者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的である、請求項85記載の方法。

【請求項100】

抗体組成物が、以下：非経口投与、髄腔内投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、注入投与、又はボーラス投与からなる群の間より選択される投与様式により投与される、請求項85記載の方法。

【請求項101】

抗プロガストリン抗体が約0.001mg/kg～約250mg/kgの用量で投与される、請求項85記載の方法。

【請求項102】

抗プロガストリン抗体の用量を、複数の時間的に間隔を空けた投与にわたり投与する、請求項101記載の方法。

【請求項103】

患者において転移性結腸直腸癌のための処置の効力をモニターするための方法であって、以下の工程：(i)転移性結腸直腸癌のための処置前に患者から得られた第1サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定すること、及び、(ii)該第1サンプル中のプロガストリンの濃度を、転移性結腸直腸癌のための処置後に同じ患者から得られた第2サンプル中のそれと比較することを含み、ここで、該第1サンプルと比較した、該第2サンプル中のプロガストリンの濃度における低下は、処置が効果的であったことを示す、方法。

【請求項104】

サンプルが体液から得られる、請求項103記載の方法。

【請求項105】

体液が、血液、血清、及び血漿からなる群の間より選択される、請求項104記載の方法。

【請求項106】

サンプルが転移性結腸直腸腫瘍の生検として得られる、請求項103記載の方法。

【請求項107】

転移性結腸直腸癌のための処置が、手術、化学療法、生物学的治療、免疫療法、及び抗体治療からなる群の間より選択される、請求項103記載の方法。

【請求項108】

第1サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定する工程が、プロガストリンに特異的に結合する抗体を用いたアッセイを使用して遂げられる、請求項103記載の方法。

【請求項109】

抗体が非中和性である、請求項108記載の方法。

【請求項110】

抗体が、以下：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、及びIgM抗体からなる群の間より選択される、請求項108記載の方法。

【請求項111】

抗体が、少なくとも約0.001nM～少なくとも約5000nMのプロガストリン結合親和性を有する、請求項108記載の方法。

【請求項112】

10

20

30

40

50

組成物が、プロガストリンの別々のエピトープについての特異性を有する複数の抗体を含む、請求項108記載の方法。

【請求項113】

プロガストリン特異的抗体が、以下：MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb5、MAb6、MAb7、MAb8、MAb9、MAb10、MAb11、MAb12、MAb13、MAb14、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、MAb20、MAb21、MAb22、及びMAb23からなる群の間より選択されるモノクローナル抗体である、請求項108記載の方法。

【請求項114】

プロガストリン特異的抗体が重鎖可変領域( $V_H$ )を含むモノクローナル抗体であり、  
 10  
 それにおいて相補性決定領域1(CDR1)が $V_H$  CDR 1.3、 $V_H$  CDR 1.4、 $V_H$  CDR 1.8、 $V_H$  CDR 1.13、 $V_H$  CDR 1.16、 $V_H$  CDR 1.19より選択され、CDR2が $V_H$  CDR 2.3、 $V_H$  CDR 2.4、 $V_H$  CDR 2.8、 $V_H$  CDR 2.13、 $V_H$  CDR 2.16、 $V_H$  CDR 2.19より選択され、CDR3が $V_H$  CDR 3.3、 $V_H$  CDR 3.4、 $V_H$  CDR 3.8、 $V_H$  CDR 3.13、 $V_H$  CDR 3.16、 $V_H$  CDR 3.19より選択される、請求項108記載の方法。

【請求項115】

プロガストリン特異的抗体が軽鎖可変領域( $V_L$ )を含むモノクローナル抗体であり、  
 20  
 それにおいて相補性決定領域1(CDR1)が $V_L$  CDR 1.3、 $V_L$  CDR 1.4、 $V_L$  CDR 1.8、 $V_L$  CDR 1.13、 $V_L$  CDR 1.16、 $V_L$  CDR 1.19より選択され、CDR2が $V_L$  CDR 2.3、 $V_L$  CDR 2.4、 $V_L$  CDR 2.8、 $V_L$  CDR 2.13、 $V_L$  CDR 2.16、 $V_L$  CDR 2.19より選択され、CDR3が $V_L$  CDR 3.3、 $V_L$  CDR 3.4、 $V_L$  CDR 3.8、 $V_L$  CDR 3.13、 $V_L$  CDR 3.16、 $V_L$  CDR 3.19より選択される、請求項108記載の方法。

【請求項116】

アッセイがラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)である、請求項108記載の方法。

【請求項117】

患者において結腸直腸癌の存在を診断するための方法であって、以下の工程：(i)結腸直腸癌を有することが疑われる患者から得られたサンプルにおけるプロガストリンの濃度を決定すること、及び、(ii)該サンプル中のプロガストリンの濃度を所定値と比較することを含み、ここで、所定値と比較した、サンプル中のプロガストリンの上昇レベルは、該患者における結腸直腸癌の存在を示す、方法。

【請求項118】

サンプルが体液から得られる、請求項117記載の方法。

【請求項119】

体液が、血液、血清、及び血漿からなる群より選択される、請求項117記載の方法。

【請求項120】

40  
 サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定する工程が、プロガストリンに特異的に結合する抗体を用いたアッセイを使用して遂げられる、請求項117記載の方法。

【請求項121】

抗体が非中和性である、請求項120記載の方法。

【請求項122】

抗体が、以下：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、及びIgM抗体からなる群の間より選択される、請求項120記載の方法。

【請求項123】

10

20

30

40

50

抗体が、少なくとも約 0.001 nM ~ 少なくとも約 5000 nM のプロガストリン結合親和性を有する、請求項 120 記載の方法。

【請求項 124】

組成物が、プロガストリンの別々のエピトープについての特異性を有する複数の抗体を含む、請求項 120 記載の方法。

【請求項 125】

プロガストリン特異的抗体が、以下：MAb 1、MAb 2、MAb 3、MAb 4、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 15、MAb 16、MAb 17、MAb 18、MAb 19、MAb 20、MAb 21、MAb 22、及び MAb 23 からなる群の間より選択されるモノクローナル抗体である、請求項 120 記載の方法。

10

【請求項 126】

プロガストリン特異的抗体が重鎖可変領域 ( $V_H$ ) を含むモノクローナル抗体であり、それにおいて相補性決定領域 1 ( $CDR1$ ) が  $V_H CDR 1.3$ 、 $V_H CDR 1.4$ 、 $V_H CDR 1.8$ 、 $V_H CDR 1.13$ 、 $V_H CDR 1.16$ 、 $V_H CDR 1.19$  より選択され、 $CDR2$  が  $V_H CDR 2.3$ 、 $V_H CDR 2.4$ 、 $V_H CDR 2.8$ 、 $V_H CDR 2.13$ 、 $V_H CDR 2.16$ 、 $V_H CDR 2.19$  より選択され、 $CDR3$  が  $V_H CDR 3.3$ 、 $V_H CDR 3.4$ 、 $V_H CDR 3.8$ 、 $V_H CDR 3.13$ 、 $V_H CDR 3.16$ 、 $V_H CDR 3.19$  より選択される、請求項 120 記載の方法。

20

【請求項 127】

プロガストリン特異的抗体が軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) を含むモノクローナル抗体であり、それにおいて相補性決定領域 1 ( $CDR1$ ) が  $V_L CDR 1.3$ 、 $V_L CDR 1.4$ 、 $V_L CDR 1.8$ 、 $V_L CDR 1.13$ 、 $V_L CDR 1.16$ 、 $V_L CDR 1.19$  より選択され、 $CDR2$  が  $V_L CDR 2.3$ 、 $V_L CDR 2.4$ 、 $V_L CDR 2.8$ 、 $V_L CDR 2.13$ 、 $V_L CDR 2.16$ 、 $V_L CDR 2.19$  より選択され、 $CDR3$  が  $V_L CDR 3.3$ 、 $V_L CDR 3.4$ 、 $V_L CDR 3.8$ 、 $V_L CDR 3.13$ 、 $V_L CDR 3.16$ 、 $V_L CDR 3.19$  より選択される、請求項 120 記載の方法。

30

【請求項 128】

アッセイがラジオイムノアッセイ (RIA) 又は酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) である、請求項 120 記載の方法。

【請求項 129】

方法が、被験者で診断テストを実施し、結腸直腸癌の存在を確認する工程をさらに含む、請求項 117 記載の方法。

【請求項 130】

診断テストが、以下：結腸直腸癌を検出するための探索的手術、結腸直腸癌を検出するための医学的画像テスト、潜血を検出するための患者の便のテスト、結腸内視鏡検査、結腸直腸癌を示している遺伝子材料を検出するための患者の便のテスト、該患者から得られたサンプルにおける結腸直腸癌の存在を示している因子の存在についてのテスト、及び結腸直腸癌を発生する傾向を検出するための遺伝子テストからなる群の間より選択される、請求項 129 記載の方法。

40

【請求項 131】

結腸直腸癌の存在を示している因子が癌胎児性抗原 (CEA) である、請求項 129 記載の方法。

【請求項 132】

結腸直腸癌を発生する傾向を検出するための遺伝子テストが、大腸腺腫様ポリポーシス (APC) 遺伝子における変異を検出するための遺伝子テストである、請求項 129 記載の方法。

【請求項 133】

50

患者が結腸直腸癌のために以前に処置されたが、サンプルが得られた時点で寛解になっている、請求項 1 1 7 記載の方法。

【請求項 1 3 4】

所定値が、結腸直腸癌のないヒトの集団から得られた同じ型のサンプルにおける平均プロガストリン濃度に基づく、請求項 1 1 7 記載の方法。

【請求項 1 3 5】

所定値が、患者に結腸直腸癌がなかった時点で患者から得られた同じ型のサンプルにおける過去の平均プロガストリン濃度に基づく、請求項 1 1 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

1. 関連出願の相互参照

本願は、仮出願第 6 1 / 2 9 3 , 6 1 2 号 ( 2 0 1 0 年 1 月 8 日出願 ) 及び仮出願第 6 1 / 3 6 7 , 8 5 5 号 ( 2 0 1 0 年 7 月 2 6 日出願 ) の 3 5 U . S . C . § 1 1 9 ( e ) 下の利益を主張し、全ての内容がその全体において参照により本明細書において組み入れられる。

【0 0 0 2】

2. 配列リスト、表、又はコンピュータプログラムの参照

配列リストを本明細書と同時に提出する。

【0 0 0 3】

20

3. 発明の属する技術分野

本開示は、とりわけ、プロガストリンについて特異的な抗体を含む組成物を投与することにより結腸直腸癌の転移及び再発を処置及び防止する方法に向けられる。

【0 0 0 4】

4. 背景

数十年の基礎及び臨床研究にもかかわらず、結腸直腸癌は人類の最も致命的な非伝染性疾患の 1 つのままである。世界保健機関の国際がん研究機関の G L O B O C A N プロジェクトによれば、2 0 0 8 年に結腸直腸癌の発生は 1 2 0 万を上回っており、同年に 6 0 万を超える人々がこの疾患により殺されたと推定された。多くのことが、近年、結腸直腸癌が分子レベルでどのように作用するかについて学ばれてきたが、臨床医は、依然として、一世代前の癌専門医が精通してきたであろう治療様式 ( 例えば手術、放射線、及び化学療法など ) に頼っている。早期診断が、画像テクノロジー及び分子診断における進歩 ( 任意の処置の成功における大きな要因 ) により可能になった。全てのこれらの処置の効力が長年にわたり改善されてきたが、治癒率における改善及び寿命における増加は漸進的である。分子腫瘍学における革命に起因する新たな標的治療さえ、大半の部分について、適度にだけ転帰を改善してきた。

30

【0 0 0 5】

結腸直腸癌患者を管理する最も困難な局面の 2 つは、転移及び再発である。

【0 0 0 6】

転移は、結腸直腸癌が原発腫瘍から遠隔臓器に広がる場合に生じる。原発腫瘍を切除することはしばしば可能であるが、患者を頻繁に殺してしまうことになるのは転移である。なぜなら、それらは、外科的に処置するには多すぎる、又は、健常宿主組織と絡み合うためである。米国癌協会によれば、1 9 9 8 年 ~ 2 0 0 0 年の間にステージ I I I C の結腸癌と診断された患者についての米国における 5 年生存率は 2 8 % であり、ステージ I V ( 即ち、転移性結腸直腸癌 ) ではわずか 6 % にまで下落した。

40

【0 0 0 7】

再発は、それにより、結腸直腸癌が、処置に最初は応答し、見かけ上消失した後に戻る現象である。患者及びその家族に与えられた感情的負担とは別に、再発が問題になる。なぜなら、戻った癌が、最初の癌と闘うために効果的であった治療にあまり応答性がないことがあるからである。他の患者については、最初の癌のための前処置が、不可逆的な副作

50

用（例えば心臓又は神経損傷など）を起こしたであろう。そのような患者においては、再発癌と闘うために同じ治療を使用するリスクが大きすぎることがある。これらの状況下では、患者は、同時により大きな死亡のリスクを伴うより少ない処置の選択肢を有しうる。

【0008】

放射線処置、化学療法における改善及び標的治療の出現によって結腸直腸癌に罹った患者の寿命が増加してきたが、多くのそのような患者は診断から数ヶ月から数年以内に死亡し続けている。緊急の必要性が、従って、転移性結腸直腸癌及び結腸直腸癌の再発に対して効果的な新たな処置について存在する。

【0009】

## 5. 要約

本開示は、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物の治療的に効果的な量を投与することにより、転移性結腸直腸癌のための処置を必要とする患者を処置するために有用な方法を提供する。一部の実施態様において、処置される転移性結腸直腸癌は、肝臓、肺、脳、又はリンパ節に位置する。

【0010】

一部の他の実施態様において、転移性結腸直腸癌の外科的切除の前に抗プロガストリン抗体組成物を投与することにより患者を処置することが有用である。他の実施態様において、そのような腫瘍の外科的切除後に抗体組成物を投与することにより、そのような患者を処置することが有用である。

【0011】

一部の実施態様において、患者に放射線治療を与える前に抗プロガストリン抗体組成物を投与することにより患者を処置することが有用である。他の実施態様において、放射線治療後に抗体組成物を投与することにより、そのような患者を処置することが有用である。

【0012】

一部の他の実施態様において、化学療法剤の前に、それと同時に、又はその後に抗プロガストリン抗体組成物を投与することにより患者を処置することが有用である。この目的のための有用な化学療法剤は、しかし、限定しないが、葉酸拮抗剤、プリン拮抗剤、ピリミジン拮抗剤、DNAアルキル化剤、DNA架橋薬、抗生物質、白金錯体、プロテアソーム阻害剤、有糸分裂紡錘体毒、トポイソメラーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、及びその他を含む。

【0013】

一部の実施態様において、転移性結腸直腸癌に対する効力を伴う異なる型の抗体の前に、それと同時に、又はその後に抗プロガストリン抗体組成物を投与することにより患者を処置することが有用である。そのような抗体は、しかし、限定しないが、EGFRを標的とする抗体（例えばセツキシマブ又はパニツムマブなど）、及びVEGFを標的とする抗体（例えばベバシズマブなど）を含む。

【0014】

転移性結腸直腸癌を処置する方法における使用のために、治療用抗体は、転移性結腸直腸癌細胞の増殖を低下させる又は分化もしくは細胞死の速度を増加させる、結腸直腸転移の平均数又はサイズを低下させる、あるいは処置された患者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的でありうる。

【0015】

開示の方法における使用のための抗体組成物は、様々な製剤（しかし、限定しないが、種々の経路による投与（しかし、限定しないが、非経口投与、髄腔内投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、注入投与、又はボラス投与を含む）のための水性懸濁液を含む）として調製することができる。一部の実施態様において、組成物は、非経口投与のために、一部の特定の実施態様において、注入による静脈注射のために製剤化される。

【0016】

10

20

30

40

50

一部の実施態様において、開示の抗プロガストリン抗体の効果的な用量は、0.001 mg/kg～約250 mg/kgの範囲であり、1投与において、又は複数の間隔を空けた投与にわたり与えてもよい。

【0017】

開示は、また、患者への抗プロガストリン抗体組成物の投与を促進するための、臨床医及びその他による使用のための医薬キットを提供する。一部の実施態様において、キットは、凍結乾燥形態中の又は水溶液としての開示の抗プロガストリン抗体、希釈剤（例えば医薬グレード水又は緩衝液など）、及び抗プロガストリン抗体を投与するためのデバイス（例えばシリンジ及びニードルなど）を含む。他の実施態様において、キットは、加えて、第2の治療用薬剤（例えば、しかし、限定しないが、開示の化学療法剤など）、開示の第2の抗プロガストリン抗体、又はその他を含みうる。

10

【0018】

方法を、また、転移性結腸直腸癌の防止を必要とする患者に、転移性結腸直腸癌を防止するために効果的な量で、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物を投与することにより転移性結腸直腸癌を防止するために提供する。多数の実施態様において、組成物の抗体は、転移性結腸直腸癌細胞の増殖を低下させる又は分化もしくは細胞死の速度を増加させる、あるいは処置された患者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的である。

【0019】

一部の実施態様において、組成物は、原発性結腸直腸癌のための手術又は放射線治療の前又は後に、あるいは、転移性結腸直腸癌を防止するために効果的な化学療法剤の投与と同時に又はその後に投与することができる。組成物は、また、プロガストリン以外についての特異性を有する、転移性結腸直腸癌を防止するために効果的な第2の治療用抗体と同時に又はその後に投与することができる。

20

【0020】

方法を、また、結腸直腸癌の再発の防止を必要とする患者に、結腸直腸癌の再発を防止するために効果的な量で、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物を投与することにより結腸直腸癌の再発を防止するために提供する。これらの方法の一部において、患者は結腸直腸癌のための処置（例えば手術、放射線治療、生物学的治療、免疫療法、及び化学療法など）を以前に受けており、その後、結腸直腸癌は見かけ上消失した。

30

【0021】

多数の実施態様において、組成物の抗体は、転移性結腸直腸癌細胞の増殖を低下させる又は分化もしくは細胞死の速度を増加させる、あるいは処置された患者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的である。他の実施態様において、組成物は、例えば、プロガストリン以外についての特異性を有する抗体を含む、転移性結腸直腸癌を防止するために効果的な第2の治療用薬剤と同時に又はその後に投与することができる。

【0022】

方法を、また、結腸直腸癌幹細胞の成長の阻害を必要とする患者に、前記結腸直腸癌幹細胞を阻害するために効果的な量で、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物を投与することにより、患者において結腸直腸癌幹細胞の成長を阻害するために提供する。

40

【0023】

多数の実施態様において、組成物の抗体は、結腸直腸癌幹細胞の増殖を低下させる又は分化もしくは細胞死の速度を増加させる、あるいは処置された患者においてプロガストリンの血中濃度を低下させるために効果的である。他の実施態様において、組成物は、結腸直腸癌幹細胞の成長を阻害するために効果的な第2の治療用薬剤、例えば、プロガストリン以外についての特異性を有する抗体と同時に又はその後に投与することができる。

【0024】

方法を、また、転移性結腸直腸癌のための処置前に患者から得られた第1サンプル（例えば体液又は転移性結腸直腸癌の生検など）においてプロガストリンの濃度を決定するこ

50

とにより、及び、次に、第1サンプル中のプロガストリンの濃度を、処置後に同じ患者から得られた第2サンプル中のそれと比較することにより、患者において転移性結腸直腸癌のための処置（例えば化学療法、生物学的治療、免疫療法、又は抗体治療など）の効力をモニターするために提供し、そこで、前記第1サンプルと比較した、前記第2サンプル中のプロガストリンの濃度における低下は、処置が効果的であったことを示す。

【0025】

この方法の一部の実施態様において、プロガストリンについて特異的な抗体を用いたアッセイ（例えばRIA又はELISAなど）を使用して、第1及び第2サンプル中のプロガストリンの濃度を決定する。

【0026】

方法を、また、結腸直腸癌を有することが疑われる患者から得られたサンプル（例えば体液など）におけるプロガストリンの濃度を決定することにより、及び、次に、サンプル中のプロガストリンの濃度を所定値と比較することにより、患者における結腸直腸癌の存在を診断するために提供し、そこで、所定値と比較した、サンプル中のプロガストリンの上昇レベルは、患者における結腸直腸癌の存在を示す。一部の実施態様において、所定値は、患者に結腸直腸癌が無いことが公知であった場合に得られたサンプル値の平均に基づき、他において、所定値は母集団の平均に基づく。

【0027】

この方法の一部の実施態様において、患者は結腸直腸癌のために以前に処置されたが、サンプルが得られた時点で寛解になっている。他の実施態様において、この方法は、結腸直腸癌の存在を確認するための患者での第2の診断テスト（例えば、血液テスト、医学的画像テスト、又は遺伝子テストを含む）を実施する追加の工程を含む。一部の実施態様において、血液テストは癌胎児性抗原を検出するためであり、他の実施態様において、遺伝子テストは大腸腺腫様ポリポーシス（APC）遺伝子における変異を検出することである。さらに他の実施態様において、プロガストリンについて特異的な抗体を用いたアッセイ（例えばRIA又はELISAなど）を使用して、サンプル中のプロガストリンの濃度を決定する。

【0028】

プロガストリンに特異的に結合する多くの異なる型の抗体が、転移性結腸直腸癌を処置するために効果的でありうる。これは、しかし、限定しないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ヒト化されうる）、ならびにキメラ抗体、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、及びIgMのアイソタイプを有する抗体、及び一本鎖抗体を含む。一部の他の実施態様において、開示の方法のために有用な抗体は、それらの機能又は特徴を有用に変える（例えば、しかし、限定しないが、血清半減期を増加させる）成分に結合された抗体を含む。さらに他の実施態様において、アミノ酸の変化を、同様の目的、又は他の目的のためにもたらすことができる。

【0029】

一部の実施態様において、抗体は、プロガストリンの1つのエピトープだけを認識する。他の実施態様において、プロガストリンの異なるエピトープについて特異的な抗体の混合物を使用することができる。

【0030】

転移性結腸直腸癌を処置する方法における使用のための抗体は、プロガストリンについての広範な結合親和性、例えば、約5000nM、又はさらにより高く、例えば、少なくとも約4000nM、3000nM、2000nM、1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nMを有しうる。

【0031】

開示する方法の特定の実施態様において、本明細書に開示するモノクローナル抗体を使

10

20

30

40

50

用してもよい（例えば、MAb 1、MAb 2、MAb 3、MAb 4、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 15、MAb 16、MAb 17、MAb 18、MAb 19、MAb 20、MAb 21、MAb 22、MAb 23、又はその他を含む）。

【0032】

開示する方法の他の実施態様において、本明細書に開示するモノクローナル抗体を使用してもよい（例えば、重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）を有するモノクローナル抗体を含み、それにおいて、第1CDRは、V<sub>H</sub> CDR 1.3、V<sub>H</sub> CDR 1.4、V<sub>H</sub> CDR 1.8、V<sub>H</sub> CDR 1.13、V<sub>H</sub> CDR 1.16、V<sub>H</sub> CDR 1.19より選択され、第2CDRは、V<sub>H</sub> CDR 2.3、V<sub>H</sub> CDR 2.4、V<sub>H</sub> CDR 2.8、V<sub>H</sub> CDR 2.13、V<sub>H</sub> CDR 2.16、V<sub>H</sub> CDR 2.19より選択され、及び、第3CDRは、V<sub>H</sub> CDR 3.3、V<sub>H</sub> CDR 3.4、V<sub>H</sub> CDR 3.8、V<sub>H</sub> CDR 3.13、V<sub>H</sub> CDR 3.16、V<sub>H</sub> CDR 3.19より選択される）。これらのCDRの特定の配列を以下に記載する。他の有用な抗体は軽鎖領域（V<sub>L</sub>）を有し、それにおいて、第1CDRは、V<sub>L</sub> CDR 1.3、V<sub>L</sub> CDR 1.4、V<sub>L</sub> CDR 1.8、V<sub>L</sub> CDR 1.13、V<sub>L</sub> CDR 1.16、V<sub>L</sub> CDR 1.19より選択され、第2CDRは、V<sub>L</sub> CDR 2.3、V<sub>L</sub> CDR 2.4、V<sub>L</sub> CDR 2.8、V<sub>L</sub> CDR 2.13、V<sub>L</sub> CDR 2.16、V<sub>L</sub> CDR 2.19より選択され、及び、第3CDRは、V<sub>L</sub> CDR 3.3、V<sub>L</sub> CDR 3.4、V<sub>L</sub> CDR 3.8、V<sub>L</sub> CDR 3.13、V<sub>L</sub> CDR 3.16、V<sub>L</sub> CDR 3.19より選択される。これらのCDRの特定の配列も以下に記載する。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は、異なるヒト原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株の間でガストリン遺伝子発現レベルを比較するグラフを提供する。

【図2】図2は、11の異なる患者の各々からの転移性結腸直腸腫瘍における相対的ガストリン遺伝子発現レベルを比較するグラフを提供する。各患者からの転移性結腸直腸腫瘍における発現レベルを、同じ患者からの対応する原発性結腸直腸腫瘍における発現レベルに対して標準化した。

【図3】図3は、3つの異なる転移性結腸直腸癌細胞株により成長培地中に分泌されたプロガストリンの量を比較するグラフを提供する。

30

【図4】図4は、健常コントロールと比較した、原発性結腸直腸癌、転移性結腸直腸癌、及び原発腫瘍が切除された転移性結腸直腸癌を伴う患者における血漿又は血清中プロガストリン濃度を示すグラフを提供する。

【図5】図5は、培養中のSW620転移性結腸直腸癌細胞の成長に対するコントロール及び抗hPGポリクローナル抗体の効果を比較するグラフを提供する。

【図6A】図6Aは、培養中のSW620転移性結腸直腸癌細胞の成長に対するコントロール及び4つの異なる抗hPGモノクローナル抗体（MAb 1 - MAb 4）の効果を比較するグラフを提供する。

【図6B】図6Bは、コントロール抗体と比較した、培養中のSW620転移性結腸直腸癌細胞の成長に対する19の異なる抗hPGモノクローナル抗体（MAb 5 - MAb 23）を用いた処理の効果を比較するグラフを提供する。

40

【図7】図7は、培養中のT84転移性結腸直腸癌細胞の成長に対するコントロール及び抗hPGモノクローナル抗体の効果を比較するグラフを提供する。

【図8A】図8Aは、目に見える転移が存在しない、抗hPGポリクローナル抗体を用いて処置したヌードマウスから除去した肝臓の写真を提供する。SW620細胞をヌードマウスの脾臓中に注射し、次に、抗hPGポリクローナル抗体、コントロールポリクローナル抗体、又はリン酸緩衝生理食塩水を用いて6週間にわたり処置した。

【図8B】図8Bは、コントロールポリクローナル抗体を用いて処置したヌードマウスから除去した、目に見える転移を伴う肝臓の写真を提供する。SW620細胞をヌードマウス

50

スの脾臓中に注射し、次に、抗hPGポリクローナル抗体、コントロールポリクローナル抗体、又はリン酸緩衝生理食塩水を用いて6週間にわたり処置した。

【図9】図9は、SW620細胞をヌードマウスの脾臓中に注射し、次に、抗hPGポリクローナル抗体、コントロールポリクローナル抗体、又はリン酸緩衝生理食塩水を用いて6週間にわたり処置した後に形成された、目に見える肝臓転移の数を比較するグラフを提供する。

【図10】図10は、SW620細胞をコントロールヌードマウスの脾臓中に注射し、次に、コントロールポリクローナル抗体又はリン酸緩衝生理食塩水を用いて6週間にわたり処置した後に形成された、例示的な肝臓微小転移の顕微鏡写真を提供する。

【図11】図11は、SW620細胞をヌードマウスの脾臓中に注射し、次に、抗hPGポリクローナル抗体対コントロール抗体を用いて6週間にわたり処置した後に形成された、目に見える肝臓転移の数を比較するグラフを提供する。

【図12】図12は、原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株、ならびに原発性ヒト結腸直腸癌の生検サンプルから得られた細胞による幹細胞マーカーLGR5の発現に対する低付着培養条件下での成長の効果を実証するグラフを提供する。

【図13】図13は、原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株、ならびに原発性ヒト結腸直腸癌の生検サンプルから得られた細胞により発現されたガストリンmRNAの量に対する低付着培養条件下での成長の効果を実証するグラフを提供する。

【図14】図14は、低付着培養条件下で成長させた、原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株、ならびに原発性ヒト結腸直腸癌の生検サンプルから得られた細胞により培地中に分泌されたプロガストリンの量を実証するグラフを提供する。

【図15】図15は、低付着培養条件下で成長させたHT-29原発性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する抗プロガストリンポリクローナル抗体の効果を実証するグラフを提供する。

【図16】図16は、低付着培養条件下で成長させたHCT116原発性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する抗プロガストリンポリクローナル抗体の効果を実証するグラフを提供する。

【図17】図17は、低付着培養条件下で成長させた原発性ヒト結腸直腸癌の生検サンプルから得られた細胞によるスフェロイドの形成に対する抗プロガストリンポリクローナル抗体の効果を実証するグラフを提供する。

【図18A】図18Aは、低付着培養条件において14日間にわたりインキュベートしたLGR5陽性HT29原発性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する2つの抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果を実証するグラフを提供する。

【図18B】図18Bは、低付着培養中のLGR5陽性HT29原発性結腸直腸癌細胞による球形成に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた処理の阻害効果が、抗体が除去された後、少なくとも17日間にわたり継続することを実証するグラフを提供する。

【図19A】図19Aは、低付着培養条件において14日間にわたりインキュベートしたLGR5陽性HCT116原発性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する2つの抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果を実証するグラフを提供する。

【図19B】図19Bは、低付着培養中のLGR5陽性HCT116原発性結腸直腸癌細胞による球形成に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた処理の阻害効果が、抗体が除去された後、少なくとも17日間にわたり継続することを実証するグラフを提供する。

【図20】図20は、低付着培養条件下で成長させたCRC1原発性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する4つの異なる抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた処理の効果を実証するグラフを提供する。

【図21】図21は、低付着培養条件下で成長させたT84転移性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果を実証するグラフを提供する。

10

20

30

40

50

【図 2 2】図 2 2 は、従来の組織培養条件下で成長させた A L D H 1 陽性原発性結腸直腸癌細胞の成長に対する 4 つの異なる抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた処理の効果を実証するグラフを提供する。

【図 2 3】図 2 3 は、低付着培養条件下で成長させた場合のスフェロイドとしての原発性結腸直腸癌細胞の成長に対する 4 つの異なる抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた前処理の効果を実証するグラフを提供する。

【図 2 4】図 2 4 は、T 8 4 転移性結腸直腸癌細胞における癌幹細胞マーカー A L D H 1 の発現に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた前処理の効果を実証するグラフを提供する。

【図 2 5】図 2 5 は、S W 6 2 0 転移性結腸直腸癌細胞における癌幹細胞マーカー A L D H 1 の発現に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた前処理の効果を実証するグラフを提供する。

【図 2 6】図 2 6 は、低付着培養条件下で成長させた T 8 4 転移性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた前処理の効果を実証するグラフを提供する。

【図 2 7】図 2 7 は、低付着培養条件下で成長させた S W 6 2 0 転移性結腸直腸癌細胞によるスフェロイドの形成に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた前処理の効果を実証するグラフを提供する。

【図 2 8】図 2 8 は、異種移植片から単離された転移性結腸直腸癌細胞が低付着培養条件下でスフェロイドとして成長する能力に対する、抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いてヒト転移性結腸直腸癌異種移植片を保持するマウスを処置することの効果を実証するグラフを提供する。

【図 2 9】図 2 9 は、異種移植片から単離された転移性結腸直腸癌細胞が、他のマウス中に移植された場合に新たな腫瘍成長を開始する能力に対する、抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いてヒト転移性結腸直腸癌異種移植片を保持するマウスを処置することの効果を実証するグラフを提供する。

【図 3 0】図 3 0 は、ヒトプレプロガストリン（配列番号 1 0 0）（そこでシグナルペプチド配列に下線が付いている）、成熟ヒトプロガストリン（配列番号 1 0 1）、及びプロガストリンプロセシングの特定産物（G 3 4（配列番号 1 0 2）、G 3 4 - G 1 y（配列番号 1 0 3）、G 1 7（配列番号 1 0 4）、G 1 7 - G 1 y（配列番号 1 0 5）、及び C T F P（配列番号 1 0 6）を含む）のアミノ酸配列を提供する。

【図 3 1 A】図 3 1 は、特定の例示的なマウス抗 h P G モノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3 つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 1 A は、マウス抗 h P G M A b 3 の V<sub>H</sub> 鎖のポリペプチド配列（配列番号 1 2）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 1 6）を提供する；

【図 3 1 B】図 3 1 は、特定の例示的なマウス抗 h P G モノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3 つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 1 B は、マウス抗 h P G M A b 3 の V<sub>L</sub> 鎖のポリペプチド配列（配列番号 1 3）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 1 7）を提供する；

【図 3 1 C】図 3 1 は、特定の例示的なマウス抗 h P G モノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3 つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 1 C は、マウス抗 h P G M A b 4 の V<sub>H</sub> 鎖のポリペプチド配列（配列番号 1 4）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 1 8）を提供する；

【図 3 1 D】図 3 1 は、特定の例示的なマウス抗 h P G モノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3 つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 1 D は、マウス抗 h P G M A b 4 の V<sub>L</sub> 鎖のポリペプチド配列（配列番号 1 5）及びそれをコードするポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列（配列番号19）を提供する；

【図31E】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Eは、マウス抗hPGMAb8のV<sub>H</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号59）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号67）を提供する；

【図31F】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Fは、マウス抗hPGMAb8のV<sub>L</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号63）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号71）を提供する；

【図31G】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Gは、マウス抗hPGMAb13のV<sub>H</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号60）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号68）を提供する；

【図31H】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Hは、マウス抗hPGMAb13のV<sub>L</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号64）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号72）を提供する；

【図31I】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Iは、マウス抗hPGMAb16のV<sub>H</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号61）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号69）を提供する；

【図31J】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Jは、マウス抗hPGMAb16のV<sub>L</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号65）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号73）を提供する；

【図31K】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Kは、マウス抗hPGMAb19のV<sub>H</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号62）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号70）を提供する；及び

【図31L】図31は、特定の例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の可変軽鎖及び可変重鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図31Lは、マウス抗hPGMAb19のV<sub>L</sub>鎖のポリペプチド配列（配列番号66）及びそれをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号74）を提供する。

【図32A】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Aは、ヒト化MAb3のV<sub>H</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号21）；

【図32B】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Bは、ヒト化MAb3のV<sub>L</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号22）；

【図32C】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体の

10

20

30

40

50

ヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Cは、ヒト化MAb4のV<sub>H</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号23）；

【図32D】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Dは、ヒト化MAb4のV<sub>L</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号24）；

【図32E】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Eは、ヒト化MAb8(a)のV<sub>H</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号75）；

【図32F】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Fは、ヒト化MAb8(a)のV<sub>L</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号76）；

【図32G】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Gは、ヒト化MAb8(b)のV<sub>H</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号77）；

【図32H】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Hは、ヒト化MAb8(b)のV<sub>L</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号78）；

【図32I】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Iは、ヒト化MAb8(c)のV<sub>H</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号79）；

【図32J】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Jは、ヒト化MAb8(c)のV<sub>L</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号76）；

【図32K】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Kは、ヒト化MAb13(a)のV<sub>H</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号80）；

【図32L】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Lは、ヒト化MAb13(a)のV<sub>L</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号81）；

【図32M】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Mは、ヒト化MAb13(b)のV<sub>H</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号82）；

【図32N】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Nは、ヒト化MAb13(b)のV<sub>L</sub>鎖の予測アミノ酸配列を提供する（配列番号83）；

【図32O】図32は、本明細書に記載する、選択された抗hPGモノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つのCDRを太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図32Oは、ヒト化M

A b 1 6 ( a ) の  $V_H$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 8 4 ) ;

【図 3 2 P】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 P は、ヒト化 M A b 1 6 ( a ) の  $V_L$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 8 5 ) ;

【図 3 2 Q】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 Q は、ヒト化 M A b 1 6 ( b ) の  $V_H$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 8 6 ) ;

【図 3 2 R】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 R は、ヒト化 M A b 1 6 ( b ) の  $V_L$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 8 7 ) ;

【図 3 2 S】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 S は、ヒト化 M A b 1 6 ( c ) の  $V_H$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 8 8 ) ;

【図 3 2 T】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 T は、ヒト化 M A b 1 6 ( c ) の  $V_L$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 8 9 ) ;

【図 3 2 U】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 U は、ヒト化 M A b 1 9 ( a ) の  $V_H$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 9 0 ) ;

【図 3 2 V】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 V は、ヒト化 M A b 1 9 ( a ) の  $V_L$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 9 1 ) ;

【図 3 2 W】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 W は、ヒト化 M A b 1 9 ( b ) の  $V_H$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 9 2 ) ;

【図 3 2 X】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 X は、ヒト化 M A b 1 9 ( b ) の  $V_L$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 9 3 ) ;

【図 3 2 Y】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 Y は、ヒト化 M A b 1 9 ( c ) の  $V_H$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 9 4 ) ; 及び

【図 3 2 Z】図 3 2 は、本明細書に記載する、選択された抗 h P G モノクローナル抗体のヒト化可変重鎖及び軽鎖についての予測ポリペプチド配列を提供する。各々の場合において、3つの C D R を太字の下線付きテキストで示す。具体的には：図 3 2 Z は、ヒト化 M A b 1 9 ( c ) の  $V_L$  鎖の予測アミノ酸配列を提供する ( 配列番号 9 5 ) 。

## 【 0 0 3 4 】

### 7 . 詳細な説明

#### 7 . 1 . 結腸直腸癌転移

転移は、癌が広がるプロセスを指す。簡単には、腫瘍細胞は、原発腫瘍を離れ、血液循環又はリンパ系を介して新たな組織部位へ移動し、二次腫瘍を形成する。新たな組織部位

10

20

30

40

50

の腫瘍は転移性腫瘍として言及され、典型的には、原発腫瘍の供給源を同定する。例えば、他の組織に広がっている結腸直腸癌は、二次性の転移性腫瘍の組織部位にもかかわらず、「転移性結腸直腸癌」として言及される。結腸直腸癌が転移する最も共通の臓器は肝臓及び肺であるが、しかし、結腸直腸癌は他の臓器にも広がりうる。

【0035】

癌細胞は原発腫瘍の近くのリンパ節に頻りに広がり、それはリンパ節転移又は局所疾患と呼ばれる。

【0036】

操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、転移は、多数の別々のステップ（浸潤及び遊走、脈管内への侵入、循環、血管外遊出及びコロニー形成、増殖及び血管新生を含む）を通じて進行すると考えられる。浸潤及び遊走の間に、個々の細胞はそれ自体が原発腫瘍から剥離し、隣接する健常組織に浸潤する。これを達成するために、癌細胞は、上皮から間葉への移行と呼ばれる表現型の形質転換を受けると仮定される。Kalluri, R., et al., *J. Clin. Invest.*, 119(6) (2009), 1420-28. そのような細胞は、細胞外マトリックスを分解することが可能な酵素を産生し、それにより、原発腫瘍外への及び周囲の健常組織中への遊走を促進しうる。遊走する癌細胞が血管又はリンパ管に遭遇する場合、それは、血管を覆う内皮細胞の間にそれ自体を挿入し、血流又はリンパ系中に侵入する。異常細胞は、次に、循環器系又はリンパ系を介して新たな臓器に移動する。癌細胞は、次に、新たな臓器の毛細血管又はリンパ管に留まり、次に、組織空間中へ内皮に侵入することにより血管外遊出しうる。最後に、コロニー形成、増殖、及び血管新生の間に、転移性癌細胞はその新たな宿主組織中に居を定めて、成長を始める。新たな転移性腫瘍が十分なサイズに達する場合、それは、成長因子（例えばVEGFなど）を分泌し、腫瘍中への新たな血管の成長を刺激し、急速に成長する腫瘍により要求される酸素及び栄養を供給しうる。

【0037】

#### 7.2. 結腸直腸癌の再発

結腸直腸癌の再発は、結腸直腸癌を見かけ上消失させた処置の後での結腸直腸癌の戻りとして定義される。戻りの結腸直腸癌が最初の癌と同じ場所にある、又はそれに非常に近接している場合、それは局所再発として公知である。戻りの結腸直腸癌が、最初の癌の場所の近くのリンパ節又は組織において成長する場合、それは局所再発として公知であり、戻りの結腸直腸癌が、最初の癌の場所から遠い臓器又は組織に転移した場合、それは遠隔再発として公知である。

【0038】

#### 7.3. 癌幹細胞及び直腸結腸癌

固形腫瘍は必ずしも均質な組織ではない。むしろ、一部の腫瘍は、別々の表現型特性及び機能特性を有する複数の異常な細胞型を含む。この点において、そのような腫瘍は異常な臓器に類似する。固形腫瘍を含む細胞の間での1つの重要な違いは、同じ宿主中の新たな部位に、又は同じもしくは異なる種の新たな宿主に移植した場合に新たな腫瘍の形成を開始することが可能である範囲である。この特性を有する細胞は、腫瘍又は癌を開始する細胞、又は、あるいは、腫瘍又は癌幹細胞として公知である。対照的に、腫瘍を構成する他の細胞は、より多くの細胞が使用される場合でさせ、移植後の新たな腫瘍を開始するずっと低下した潜在力を有する。1つの非限定的な例において、ヒト腫瘍に由来する数百の結腸癌幹細胞が、マウス中への移植後に新たな腫瘍を開始するのに十分であったのに対し、腫瘍からの10,000個の非幹細胞はそのようにするには不十分であった。Dalerba, P., et al., 2007, "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 10158-10163.

【0039】

多くの腫瘍において、癌幹細胞は、腫瘍内に存在する全ての生存可能な細胞の比較的小さな割合を構成する。対照的に、腫瘍の塊を構成する腫瘍細胞の大多数が、移植した場合に新たな腫瘍を開始することはできない。一部の腫瘍において、しかし、癌幹細胞が、腫

瘍を構成する大多数、又はさらには全ての細胞を構成しうる。本明細書において使用する通り、塊の腫瘍細胞は、そのような細胞の多数が使用されない場合、移植時に新たな腫瘍を開始することができない腫瘍細胞を指す。癌幹細胞は、また、塊の腫瘍細胞とは異なる表現型の特徴を有する（比較的少数の癌幹細胞の移植時に新たな腫瘍を自己再生及び形成する能力、及び蛍光活性化細胞選別（FACS）又は他のアッセイにより検出可能な異なるマーカーの発現を含む）。癌幹細胞と塊の腫瘍細胞の間での他の区別も可能である。

#### 【0040】

操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、癌幹細胞は、癌幹細胞の状況において、腫瘍を生じるそれらの能力に寄与する、正常幹細胞と特定の特性を共有すると考えられる。特に、癌幹細胞は非対称細胞分裂を受けて、2つの型の娘細胞を産生する。最初のもは未分化のままであり、それ自体を無限に再生することができる、その親の幹細胞の特徴を保持する。他の娘は、前駆細胞と呼ばれ、異常にはあるが、分裂及び分化することが可能であり、多くの固形腫瘍において見出される多くの分化細胞のスペクトラムを生じる。前駆細胞は幹細胞よりも高い速度で増殖し、このように、腫瘍の物理的成長に寄与するのに対し、幹細胞は、新たな前駆体を生成することにより、無限に成長する腫瘍の能力に関与している。

10

#### 【0041】

これらの特性によって、癌幹細胞は、最終的に、成長する腫瘍を構成する多数の細胞を生じることが許される。このように、新たな動物中に移植した場合、癌幹細胞は、複数の連続移植後でさえ、それらが由来した腫瘍の型を再構成しうる。癌幹細胞は、しかし、正常な幹細胞とは異なり、変化した増殖パターン及び/又は低速度のアポトーシスをもたらす遺伝子変異及び/又はエピジェネティック変化を持ち、ならびに、腫瘍の塊を構成しうる異常細胞の蓄積を起こす異常分化をもたらす。

20

#### 【0042】

癌幹細胞は、それらを塊の腫瘍細胞から区別する多数の表現型の特徴に従って同定することができる。最初に、上に記述した通り、癌幹細胞は、新たな宿主中に移植された場合、新たな腫瘍を開始する能力を有する。対照的に、塊の腫瘍細胞は、新たな腫瘍を開始すること、又は、新たな腫瘍の開始を達成するために癌幹細胞よりも多くの細胞を要求することはできない。癌幹細胞は、また、特定のマーカーのそれらでの発現又は非発現により同定可能であるのに対し、同じ腫瘍からの塊の腫瘍細胞は、マーカー発現の異なるパターンを有する。癌幹細胞は、また、塊の腫瘍細胞と比較して、無血清の低付着培養条件下で成長し、いわゆるスフェロイドを形成する優先的な能力を有する。塊の腫瘍細胞から癌幹細胞を区別することが可能な他の表現型の違いが可能である。

30

#### 【0043】

上に記述した通り、癌幹細胞は、また、単独で又は他との組み合わせで、特定のマーカーの発現パターンに従って同定されうる。異なる腫瘍からの癌幹細胞は、しかし、異なるマーカー表現型を示しうる。そのようなマーカーは、細胞内で、又は細胞表面上で発現されるタンパク質を含み、種々の技術（しかし、限定しないが、免疫組織化学、免疫蛍光、及びFACS分析を含む）を使用して検出することができる。マーカーを検出するための他の技術が、また、当業者の知識に従って可能である。マーカーは、また、その活性を癌幹細胞において機能的にアッセイすることができるタンパク質を含む。マーカーの型の非限定的な例は、トランスポータータンパク質（例えば、細胞から物質を輸送する又は細胞中に物質を取り込むものなど）、酵素（例えば解毒酵素など）を含む。

40

#### 【0044】

結腸直腸癌幹細胞を同定するために使用されうる例示的なマーカーは、しかし、限定しないが、以下：CD133、CD44、CD166、EpCAM、及びLGR5を含む。結腸直腸癌幹細胞を同定するための有用な他のマーカーも可能である。一部の実施態様において、マーカーの発現の非存在は、癌幹細胞の表現型を示している。また、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1（ALDH1）は解毒酵素であり、癌細胞は、増加したALDH1活性（癌幹細胞についての別のマーカー）についてアッセイすることができる。

50

## 【0045】

本開示の一部の実施態様において、結腸直腸癌幹細胞は、FACS、又は当業者が精通している他の技術を使用して、以下：EpCAM(hi)CD44(+)、EpCAM(hi)CD44(+)/CD166(+)、CD133(+)、ALDH1(+)、CD133(-)/ALDH1(+)、CD44(+)/CD24(+ )又はLGR5(+ )のマーカ-表現型により同定されうる。他のマーカ-の発現、ならびにそれらの組み合わせ及びパターンは、また、これらの癌、ならびに他の型の癌における癌幹細胞を同定するために使用されうる。

## 【0046】

本開示の他の実施態様において、癌幹細胞は、FACS分析を使用し、特定の色素を除外するそれらの優先的能力に従って、いわゆる副集団に選別されたそれらの細胞として同定されうる。そのような色素の1つの非限定的な例は、Hoechst色素33342である。

10

## 【0047】

上に記述する通り、癌幹細胞は、また、新たな宿主中への移植後に新たな腫瘍成長を開始するそれらの増加した能力により、塊の腫瘍細胞から区別することができる。このように、癌幹細胞であることが疑われる細胞集団の同一性を確認するための1つの方法は、塊の腫瘍細胞と比較して、非ヒトレシピエント動物中へのそのような細胞の相対的な小集団の移植後に、腫瘍成長を開始するそれらの能力をテストすることである。

## 【0048】

腫瘍又は細胞株が癌幹細胞を含むか否かを評価するために有用な移植の方法は、当業者が精通している。非限定的な例として、癌幹細胞を含むことが疑われる腫瘍、又はその一部を、例えば外科的切除などにより単離する。その後、腫瘍組織を刻み、酵素で処理するか、又は腫瘍を脱凝集し、その構成細胞を放出するために効果的な任意の他の処理を用いて処理する。あるいは、細胞株が分析下にある場合、酵素的又は化学的処理を用いて細胞を解離することだけが必要でありうる。

20

## 【0049】

細胞懸濁液を調製した後、細胞を遠心により回収し、癌幹細胞に対応することが公知である亜集団を、当技術分野において公知の方法に従って単離する。上に考察する通り、1つの非限定的な例において、そのような細胞は、特定の抗体及び蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用して検出可能である、癌幹細胞を示しているマーカ-の特定のパターンを発現する。他の実施態様において、癌幹細胞を含むことが疑われる亜集団は、他の表現型の特徴(例えば、特定の色素を除外するそれらの能力など)に従って単離することができる。

30

## 【0050】

関連する細胞亜集団を単離した後、所定の数のそのような細胞を、次に、レシピエント動物における1つ又は複数の標的組織又は臓器中に移植する。一部の実施態様において、レシピエント動物は、免疫不全マウス(しかし、限定しないが、ヌードマウス、重症複合免疫不全(SCID)を伴うマウス、及び非肥満-糖尿病SCID(NOD-SCID)マウスを含む)である。他の種を、また、当業者の知識に従って使用することができる。

40

## 【0051】

細胞を、脂肪パッド(例えば、マウスの乳房脂肪パッドなど)中に、脳、盲腸、脾臓、もしくは肝臓中に、又は腎臓中(例えば腎被膜中など)に皮下移植することができる。細胞を他の組織及び臓器中にも移植することができる。一部の実施態様において、標的組織又は臓器を選び、分析下の腫瘍が由来する組織又は臓器を複製する。しかし、他の実施態様において、別々の組織又は臓器を選び、それにおいて移植細胞の宿主とする。非限定的な例として、結腸癌幹細胞をNOD-SCIDマウスの腎被膜中に移植し、新たな腫瘍を開始するそれらの能力を評価することができる。

## 【0052】

移植(当業者が精通する技術を使用して遂げられる)後、細胞を乱さないように放置し

50

、新たな腫瘍が移植部位で成長するか否かを決定する。皮下移植された細胞については、腫瘍成長は、移植部位の目視検査及び触診により評価することができる。腫瘍が成長する場合、そのサイズを、ノギスを使用して、時間を通して測定することができる。内部臓器中に移植した細胞については、動物を移植後の所定の時間に屠殺してもよく、腫瘍が存在するか否か、及び、存在する場合、そのサイズを決定する。あるいは、当業者の知識に従って、非浸潤性の技術を使用して、腫瘍成長を評価することができる。

#### 【0053】

癌幹細胞の表現型は、また、無血清の低付着培養条件下でスフェロイドとして成長する癌幹細胞の優先的な能力により特徴付けられるのに対し、塊の腫瘍細胞は同じ条件下でスフェロイドとして成長することができる可能性は低くなる。スフェロイドは、特定の細胞が脱凝集した懸濁液として播種された後に培養中で成長する際に形成する圧縮した細胞球である。そのようなスフェロイドの形成は、細胞を、一般的には、特定の成長因子（しかし、限定しないが、上皮成長因子（EGF）及び塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）を含む）の存在において、及び、哺乳動物細胞が不十分に付着する表面を有する組織培養皿において、無血清培地中で成長させる場合に促進される。正常組織からの幹細胞と同様に、癌幹細胞が適切な培養条件下でスフェロイドとして優先的に成長することが発見されている。例えば、Rappa, G., et al., *Exp. Cell Res.*, 314: 2110 (2008); Singh, S.K., et al., *Cancer Res.*, 63: 5821 (2003); Fang, D., et al., *Cancer Res.*, 65: 9328 (2005)を参照のこと。対照的に、塊の腫瘍細胞は、より高度に分化する傾向があり、同一の培養条件下でスフェロイドを形成する可能性が低くなる。塊の腫瘍細胞がスフェロイドを形成することができる場合、それらは、同様の数の癌幹細胞により形成されるものと比較して、小さく及び/又は数が少ない傾向にある。

#### 【0054】

##### 7.4. 癌幹細胞及び結腸直腸癌再発

癌幹細胞の特性を伴う腫瘍細胞が同定されており、放射線及び/又は化学療法剤に対して増強した抵抗性を示す。異なる分子機構が、放射線又は化学療法剤に対する癌幹細胞の抵抗性を説明するために提案されている。例えば、特定の癌幹細胞が遺伝毒性傷害後にそれらのDNAをより容易に修復することができるのに対し、他の癌幹細胞は、高レベルの抗アポトーシスタンパク質又はそのような細胞に入る化学療法剤を除去するために効果的な分子ポンプを発現すると報告されている。Eyler, C.E., and J.N. Rich, *J. Clin. Oncol.*, 26: 2839-2845 (2008). 癌幹細胞が前駆細胞よりも遅く増殖することも、また、塊の腫瘍細胞を殺しうる放射線及び毒性化学療法剤への暴露で生き残る幹細胞の比較上の能力を説明しうる。

#### 【0055】

操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、癌幹細胞が放射線及び化学療法に抵抗性であるという観察は、そのような治療を用いて処置された癌患者における再発の現象を説明しうる。Eyler（上記を参照）そのような患者において、処置は最初は効果的であり、診断スキャンにおいて腫瘍の見かけ上の消失を起こすが、しかし、腫瘍は、処置を止めていくらかの時間後に再出現する。

#### 【0056】

再発の機構における癌幹細胞の役割に関して、大半の又はさらには全ての塊の腫瘍細胞が治療により殺されるが、放射線又は化学療法の効果に抵抗するそれらの増強した能力のため、多数の生存する生存可能な癌幹細胞が残ると仮定される。治療が終わった後、これらの生存細胞は成長し続け、最初の腫瘍の再形成又は新たな腫瘍の形成を可能にする。この理論と一致し、化学療法剤を用いたマウスの処置は、ヒト結腸直腸癌細胞から開始した腫瘍の収縮を起こすが、腫瘍内の癌幹細胞の割合を増加させることが報告された。Dylla, S.J., et al., 2008, "Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogeneic Tumors Following Chemotherapy," *PLoS ONE*, 3 (6): e2428.

#### 【0057】

##### 7.5. 結腸直腸癌におけるプロガストリンの役割の理解における進歩

驚くべきことに、プロガストリン感受性の転移性結腸直腸癌細胞及び結腸直腸癌幹細胞が存在することが発見されており、プロガストリン（「PG」）に特異的に結合し、インビトロ又はインビボでそのような細胞の成長を阻害する特定の抗体の能力により実証される通りである。

【0058】

PG感受性の結腸直腸癌細胞は、その生存及び/又は成長のために、直接的又は間接的に、プロガストリンに少なくとも部分的に依存するものである。操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、特定の抗PG抗体は、PGに結合し、PG依存性のシグナル伝達を遮断することにより、そのような細胞の生存及び/又は成長を阻害するために効果的であることが仮定される。プロガストリンは、従って、その生存及び/又は成長促進効果を媒介することが防止される。抗PG抗体が結腸直腸癌細胞の生存及び/又は成長を阻害する他の機構が存在しうる。特定の作用機構は、本開示の範囲を限定することを意図しない。

10

【0059】

実施例においてさらに詳細に記載する通り、出願人らは、驚くべきことに、ガストリン遺伝子（GAST）が、6つの異なるヒト原発性結腸直腸癌細胞株HT29、HCT116、RKO、SW480、DLD1、及びCRC1細胞において、2つの異なるヒト転移性結腸直腸癌細胞株SW620及びT84細胞において発現していることを発見している。インビトロ実験からのデータに関連して、出願人らは、また、驚くべきことに、ガストリン遺伝子が11人の異なる患者の各々から得られた原発性結腸直腸腫瘍及び対応する結腸直腸転移において発現していることを発見したが、原発腫瘍におけるレベルと比べて、対応する転移における発現レベルは異なる患者の間で変動した。なぜなら、プロガストリンはガストリン遺伝子の産物（同じ遺伝子産物から翻訳後にプロセシングされた他のペプチドと共に）であるため、このデータは、原発性及び転移性結腸直腸腫瘍がプロガストリンを分泌することを示唆する。追加実験では、以下に説明する通り、これが確認された。

20

【0060】

最初に、出願人らは、検出可能な量のPGタンパク質がSW620及びT84細胞により成長培地中に分泌される（Colo-205細胞により分泌されない）ことを確認した。加えて、出願人らは、原発性結腸直腸癌だけ、原発性及び転移性結腸直腸癌を同時に、及び原発腫瘍の切除後に転移性結腸直腸癌を有する患者は、全てが、健常コントロールの血液中よりも統計的に有意に高い、それらの血液中のPGレベルを有することを実証した。これらの結果は、原発性及び転移性結腸直腸腫瘍がPGを分泌し、それが直接的又は間接的に血流に入ることを示す。このように、上昇した血液PGレベルは、原発性ならびに転移性結腸直腸癌の存在を示している。したがって、本開示の方法は、異なる患者集団における原発性及び転移性結腸直腸癌の両方の存在を検出又は診断する方法を提供する。

30

【0061】

出願人らは、また、驚くべきことに、特定の抗PG抗体、即ち、中和性抗体が、培養中の転移性結腸直腸癌細胞の成長を阻害することが可能であることを発見している。具体的には、出願人らは、抗PGポリクローナル抗体及び4つの異なる抗PGモノクローナル抗体が、培養中で成長しているSW620細胞の成長を阻害することができることを実験的に実証した。同様に、T84細胞の成長は、抗PGモノクローナル抗体を用いたインキュベーションにより阻害された。これらのデータは、中和性抗PG抗体が転移性結腸直腸癌細胞の成長を防止することが可能であること及びそのような細胞が、従って、PG感受性であることを実証する。これらのデータは、さらに、そのような抗体の治療的に効果的な量が、転移性結腸直腸癌の処置を必要とする被験者に投与される場合、そのような転移を処置するために効果的であることを示す。

40

【0062】

ヌードマウスにおいて行ったさらなる実験は拡大し、出願人らのインビトロ実験を確認する。このように、出願人らは、ヌードマウスの脾臓中に転移性SW620細胞を注射した。その後、直ちに、脾臓を切除し、マウスに抗PGモノクローナル抗体を時間経過にわ

50

たり投与した。コントロール動物を同様に処理したが、しかし、コントロール抗体を用いて注射した。6週間の処置後、マウスを屠殺し、肝臓において形成した転移の数及び重量をカウントした。驚くべきことに、出願人らは、転移の平均数が、処置動物対コントロール動物において、統計的に有意な41%だけ下落することを見出した。この説得力のあるデータは、中和性抗PG抗体がインビボで転移性結腸直腸癌の成長を阻害することが可能であることを確認し、そのような抗体の治療的に効果的な量は、転移性結腸直腸癌のための処置を必要とする被験者に投与される場合、そのような転移を処置するために効果的であることを実証する。

#### 【0063】

出願人らによりインビトロ及びインビボで行われた追加実験では、驚くべきことに、原発性及び転移性結腸直腸癌が、PG感受性である結腸直腸癌幹細胞を含むこと、及び、中和性抗hPG抗体がそのような細胞の成長を阻害することが可能であることが実証されている。

10

#### 【0064】

1つの実験において、出願人らは、低付着培養条件下での原発性(HCT29、HCT116、CRC1)及び転移性(SW620及びT84)結腸直腸癌細胞株の成長が、LGR5(結腸直腸癌幹細胞の表現型マーカー)を発現する細胞の割合を増加させることを実証した。そのような培養条件によって、非幹細胞垂集団と比較して、癌幹細胞の成長について優先的に選択され、LGR5の増加発現によって、原発性及び転移性の両方の結腸直腸癌が癌幹細胞を含むことが確認される。

20

#### 【0065】

出願人らは、次に、低付着条件が、従来の条件下での細胞の成長と比較して、同じ細胞におけるガストリン遺伝子発現のレベルを増加させることを発見した。このデータは、ガストリン遺伝子発現が、同じ集団における非幹細胞と比較して、原発性及び転移性の両方の結腸直腸癌からの結腸直腸癌幹細胞においてより高いことを示唆し、分泌されたプロガストリンのレベルも高くなりうることをさらに示唆する。出願人らは、低付着条件下で成長させた場合、CRC1、HCT29、SW620、及びT84細胞においてプロガストリン発現を様々なレベルで確認したが、これらの細胞株がPG感受性の結腸直腸癌幹細胞を含むことを示唆する。

#### 【0066】

出願人らは、低付着条件下で成長させた原発性及び転移性結腸直腸癌細胞を、抗hPG抗体を用いて処理することによりこれを確認し、驚くべきことに、形成されたいわゆる細胞スフェロイドの数が、コントロール抗体を用いた処置と比較して低下することを見出した。なぜなら、低付着条件下でのスフェロイドの形成は、結腸直腸癌幹細胞(しかし、非幹細胞垂集団ではない)の特性であるため、この結果は、抗hPG抗体が原発性及び転移性の両方の結腸直腸癌における結腸直腸癌幹細胞の成長を阻害するために効果的であることを意味すると解釈される。

30

#### 【0067】

例えば、抗hPGポリクローナル抗体を用いたHCT29、HCT116、及びCRC1細胞(それらの全てが原発性結腸直腸癌細胞である)の処理は、低下した球形成をもたらした。HCT116及びHCT29細胞でのさらなるテストでは、2つの異なる抗hPGモノクローナル抗体を使用して、LGR5陽性癌幹細胞の垂集団による球成長に対する同様の効果が見出された。興味深いことに、洗浄による抗体の除去、それに続く、加えられた抗体の非存在における17日間にわたる継続的なインキュベーションは、増加した球数をもたらさなかったが、結腸直腸癌幹細胞に対する抗hPG抗体の阻害効果が永続的であり、それらの継続的な存在に依存しなかったことを示唆する。4つの異なる抗hPGモノクローナル抗体を用いたCRC1細胞の処理も、球形成を低下させるために効果的であった。加えて、抗hPGモノクローナル抗体の同じセットを用いた従来の条件下で成長しているCRC1細胞の前処理は、ALDH1陽性細胞の数、ならびに、前処理した細胞を低付着培養条件に移した後に形成されるスフェロイドの数を低下させた。抗体の3つがC末端

40

50

部分 P G を認識したのに対し、1 つが N 末端部分を認識した。

【 0 0 6 8 】

同様の結果が、転移性結腸直腸癌細胞株をテストした場合に得られた。このように、A L D H 1 ( 結腸直腸癌幹細胞の別のマーカー ) について陽性である T 8 4 細胞の垂集団の単離後、そのような細胞により形成されるスフェロイドの数は、コントロール抗体と比較して、抗 h P G モノクローナル抗体を用いた処理により、用量反応的な様式で低下した。同様に、同じ抗 h P G モノクローナル抗体を用いた従来の条件下で成長している T 8 4 及び S W 6 2 0 細胞の前処理は、A L D H 1 陽性細胞の数、ならびに、前処理した細胞を低付着培養条件に移した後に形成されるスフェロイドの数を低下させた。実際には、成長阻害効果は、5 - フルオロウラシル ( 化学療法薬 ) のそれより大きかった。このデータは、転移性結腸直腸癌細胞がプロガストリン感受性の幹細胞を含むという驚くべき結論を確認しており、その成長は、特定の抗 h P G モノクローナル抗体を用いた処理により阻害することができる。

10

【 0 0 6 9 】

先に考察した通り、癌幹細胞の特徴的な特性の 1 つは、移植後に新たな腫瘍を開始するそれらの能力である。結腸直腸癌幹細胞を阻害する抗 h P G 抗体の能力を確認するために、出願人は、結腸直腸癌肝臓転移からの細胞が培養中でスフェロイドとして成長し、移植後に新たな腫瘍を開始する能力に対する特定の抗 h P G モノクローナル抗体の効果をテストした。実施例においてさらに説明する通り、出願人は、ヌードマウスの脾臓中に転移性 S W 6 2 0 細胞を注射した。その後、直ちに、脾臓を切除し、マウスに抗 P G モノクローナル抗体を時間経過にわたり投与した。コントロール動物を同様に処理したが、しかし、コントロール抗体を用いて注射した。

20

【 0 0 7 0 】

6 週間の処置後、マウスを屠殺し、肝臓において形成している結腸直腸転移を解剖し、次に、生存可能な転移性結腸直腸癌細胞を放出するために処理した。細胞を、次に、低付着培養中でスフェロイドを形成し、新たなマウス中に移植した後に新たな腫瘍を形成するそれらの能力についてテストした。これらの特性の両方が結腸直腸癌幹細胞の特徴である。

【 0 0 7 1 】

結果によって、結腸直腸癌幹細胞の成長に対する抗 h P G 抗体の阻害効果が確認された。最初に、出願人は、コントロールと比較して、より少数のスフェロイドが、特定の抗体を用いて処置された動物の肝臓から単離された転移性結腸直腸癌細胞からの低付着培養において形成されることを見出した。さらに、出願人は、また、スフェロイドからの細胞を 2 匹の新たなテスト動物の大腿に皮下注射した場合、特定の抗体を用いてインビボで処理した細胞から成長している腫瘍のサイズが、コントロール抗体を用いてインビボで処理した細胞から成長しているものよりも平均してかなり小さいことを見出した。これらの説得力のある結果は、h P G について特異的な抗体を用いたインビボでの転移性結腸直腸癌細胞の処置が、転移性腫瘍における結腸直腸癌幹細胞の数を低下させることを実証する。

30

【 0 0 7 2 】

上に記載する驚くべき、説得力のある結果に基づき、抗 h P G 抗体を用いて患者を処置することは、原発性又は転移性結腸直腸癌の再発を防止するために効果的であることが期待される。さらに、そのような幹細胞の成長に対する抗体の阻害効果は、抗 h P G 抗体の継続的な存在を要求しないことがある。

40

【 0 0 7 3 】

7 . 6 . 抗体

本明細書に開示する方法及びキットにおいて有用な抗体は、ガストリン遺伝子の他の産物を上回りヒトプロガストリンに特異的に結合するものである。図 3 0 に例証する通り、ガストリン遺伝子は、1 0 1 アミノ酸ポリペプチド ( プレプロガストリンと呼ばれる ) に翻訳され、それは、切断されて、プロガストリン ( 8 0 アミノ酸ポリペプチド ) を生じる

50

シグナル配列（下線）を含む。プロガストリンは、順に、切断されて、34アミノ酸産物（配列において、プロガストリンの残基38-71に対応する）を生成し、それは、次に、グリシン残基を用いてそのカルボキシ末端で伸長されて、グリシン伸長G34（「G34-Gly」）を生成する。この切断の副産物は、6アミノ酸ペプチド（C末端隣接ペプチド、又はCTFPと呼ばれる）であり、それは、配列において、プロガストリンの残基75-80に対応する。G34-Glyは、次に、さらに切断されて、配列において、プロガストリンの残基55-71に対応し、G17-Glyとして言及される17残基ポリペプチドを生成する。G34-Gly及びG17-GlyのC末端グリシンの除去、それに続くC末端アミド化は、それぞれG34及びG17をもたらし、それらの両方がC末端アミド化されている。

10

#### 【0074】

本明細書において使用する通り、抗体は、それが全長プロガストリンに結合するが、しかし、CTFP、アミド化ガストリン、又はグリシン伸長ガストリンには全く結合しない場合、hPG「について高度に特異的」又はhPGに「高度に特異的に結合する」、及び、それがCTFP及びガストリン遺伝子の他の産物よりも少なくとも約5倍大きなhPGの結合を示す場合（標準的な結合アッセイにおいて測定した通り）、hPG「について特異的」又はhPGに「特異的に結合する」。特定の抗hPG抗体の特異性を評価するために使用することができる特定のELISAアッセイが、実施例21に提供される。

#### 【0075】

そのような高度に特異的及び/又は特異的な抗hPG抗体（本明細書において「抗hPG抗体」として言及される）は、ポリクローナル（「抗hPG PA b」）又はモノクローナル（「抗hPG MA b」）であるが、治療的使用、一部の例において、診断又は他のインビトロでの使用のために、モノクローナル抗体が好ましい。

20

#### 【0076】

抗hPG抗体により結合されるエピトープは決定的ではない。有用な抗hPG抗体は、hPGのN末端領域、hPGのC末端領域、又はhPGの異なる領域に結合しうる。近年、少なくともモノクローナル抗hPG抗体について、抗hPG抗体を産生するために使用される抗原の選択が重要でありうるということが発見されている（国際出願第PCT/EP2010/006329号（2010年10月15日出願）及び米国出願第12/906,041号（2010年10月15日出願）、その開示及び具体的に開示される抗hPG抗体が参照により本明細書において組み入れられる；以下、「329及び」041出願としてそれぞれ言及される）。「329及び」041出願において開示される通り、hPGに由来する全ての抗原が、生理学的条件下でhPGに特異的に結合するモノクローナル抗体の産生を刺激するわけではない。実際に、ポリクローナル抗hPG抗体を成功裏に産生するために使用されてきた特定の抗原（例えば全長組換えhPG（例、W008/076454 Singhを参照のこと）及びhPGのC末端の最後の10アミノ酸に対応するペプチド（W007/135542 Hollande et al.を参照のこと）など）は、モノクローナル抗体の生成に失敗した。「329及び」041出願において記述される通り、hPG配列内の抗原性N末端及びC末端配列が同定されており、hPGに特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するために使用することができる。興味深いことに、抗原性配列は、それに固有であるhPG配列の領域に限定する必要はない。ガストリン遺伝子の他の産物と共通の配列の領域を有するペプチド抗原（例えば、G17、G34、及びCTFP）は、hPGに結合するだけでなく、しかし、それに特異的に結合するモノクローナル抗体をもたらす。

30

40

#### 【0077】

hPGのN末端領域に対応する配列を有するペプチド抗原を使用して入手可能であり及び/又はhPGのN末端領域に結合する抗hPG抗体を、本明細書において「N末端抗hPG抗体」として言及する。hPGについて特異的なポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方を得るために適した免疫原を構築するために使用することができるhPGの特定の例示的な抗原性領域は、hPGの残基1~14：SWKPRSQQPDAPLG

50

(配列番号25)に対応する。N末端抗hPG抗体を得るために有用な例示的な免疫原、ならびに、これらの例示的な免疫原を用いて得られたN末端抗hPGモノクローナル抗体のCDRならびにV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>配列を以下の表1A及び実施例のセクションに提供する：  
【0078】

【表 1】

表 1A N 端末抗 hPG モノクローナル抗体						
免疫原	ハイブリドーマ (寄託#)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列	ヒト化 V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列 (予測)	
N1	43B9G11	MAb1				
N1	WE5H2G7	MAb2				
N2	6B5B11C10	MAb3	V <sub>H</sub> CDR 1.3	GYFTSYW (配列番号 1)	mV <sub>H.3</sub> (配列番号 12)	hV <sub>H.3</sub> (配列番号 21)
			V <sub>H</sub> CDR 2.3	FYPGNSDS (配列番号 2)		
			V <sub>H</sub> CDR 3.3	TRRDSPQY (配列番号 3)		
			V <sub>L</sub> CDR 1.3	QSIVHSNGNTY (配列番号 4)		
			V <sub>L</sub> CDR 2.3	KVS (配列番号 5)		
			V <sub>L</sub> CDR 3.3	FQGSHPVPT (配列番号 6)		
N2	20D2C3G2	MAb4	V <sub>H</sub> CDR 1.4	GYTFSSW (配列番号 7)	mV <sub>H.4</sub> (配列番号 14)	hV <sub>H.4</sub> (配列番号 23)
			V <sub>H</sub> CDR 2.4	FLPGSGST (配列番号 8)		
			V <sub>H</sub> CDR 3.4	ATDGNVDWFAY (配列番号 9)		
			V <sub>L</sub> CDR 1.4	QSLVHSSGVTY (配列番号 10)		
			V <sub>L</sub> CDR 2.4	KVS (配列番号 5)		
			V <sub>L</sub> CDR 3.4	SQSTHPVPT (配列番号 11)		
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb15				
N2	1E9D9B6	MAb16	V <sub>H</sub> CDR 1.16	GYFTSY Y (配列番号 39)	mV <sub>H.16</sub> (配列番号 61)	hV <sub>H.16a</sub> (配列番号 84)
			V <sub>H</sub> CDR 2.16	INPSNGGT (配列番号 43)		
			V <sub>H</sub> CDR 3.16	TRGGYYPFDY (配列番号 47)		
			V <sub>L</sub> CDR 1.16	QSLDSDGKTY (配列番号 50)		
			V <sub>L</sub> CDR 2.16	LVS (配列番号 53)		
			V <sub>L</sub> CDR 3.16	WQGTSPY T (配列番号 57)		
N2	1C8D10F5	MAb17				
N2	1A7C3F11	MAb18				

10

20

30

40

50

表 1A  
N 端末抗 hPG モノクローナル抗体

免疫原	ハイブリドーマ (寄託#)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列	ヒト化 V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列 (予測)	
N2	1B3B4F11	MAb19	V <sub>H</sub> CDR 1.19	GYSITSDYA (配列番号 40)	mV <sub>H</sub> .19 (配列番号 62)	hV <sub>H</sub> .19a (配列番号 90)
			V <sub>H</sub> CDR 2.19	ISFSGYT (配列番号 44)		hV <sub>H</sub> .19b (配列番号 92)
			V <sub>H</sub> CDR 3.19	AREVNYGDSYHFDY (配列番号 48)		hV <sub>H</sub> .19c (配列番号 94)
			V <sub>L</sub> CDR 1.19	SQHRITYT (配列番号 51)		hV <sub>L</sub> .19a (配列番号 91)
			V <sub>L</sub> CDR 2.19	VKKDGS (配列番号 54)		hV <sub>L</sub> .19b (配列番号 93)
			V <sub>L</sub> CDR 3.19	GVGDAIKGQSVFV (配列番号 58)		hV <sub>L</sub> .19c (配列番号 95)
N2	1C11F5E8	MAb20				

免疫原 N1 = SWKPRSQPDAPLG-Ahx-Cys-BSA, -Ahx-Cys-BSA (配列番号 25)としても表される  
 免疫原 N2 = SWKPRSQPDAPLG-Ahx-Cys-KLH, -Ahx-Cys-KLH (配列番号 25)としても表される

表 1A において、全てのアミノ酸配列を、従来の N→C 方向を使用して表す。各々の免疫原について、プロガストリンペプチドを、1つのアミノヘキサン酸(Ahx) 残基、それに続くシステイン(Cys) 残基の C 末端リンカーを用いて合成し、次に、ウシ血清アルブミン (“BSA”) 又はキーホールリンペプチドヘモシアニン (“KLH”) 担体のいずれかかを Cys リンカー残基を介して結合させた。

10

20

30

40

【 0 0 7 9 】

h P G の C 末 端 領 域 に 対 応 す る 配 列 を 有 す る ペ プ チ ド 抗 原 を 使 用 し て 入 手 可 能 で あり 及

50

び/又はhPGのC末端領域に結合する抗hPG抗体を、本明細書において「C末端抗hPG抗体」として言及する。hPGについて特異的なポリクローナル及びモノクローナル(末端抗hPG)抗体の両方を得るために有用な免疫原を構築するために使用することができる特定の例示的な抗原性領域は、hPGの残基55~80: QGPWLEEEEA YGWDFGRRSAEDEN(配列番号27)に対応する。C末端抗hPG抗体を得るために有用なこの抗原を含む例示的な免疫原、ならびに、これらの例示的な免疫原を用いて得られたC末端抗hPGモノクローナル抗体のCDRならびにV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>配列を以下の表1B及び実施例のセクションに提供する。

【0080】

【表 2】

表 1B C 端末抗 hPG モノクローナル抗体						
免疫原	ハイブリドーマ (寄託#)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列	ヒト化 V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列 (予測)	
C1	1B4A11D11 (I-4371)	MAb5				
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6				
C1	1B11E4B11 (I-4373)	MAb7				
C1	1C10D3B9	MAb8	V <sub>H</sub> CDR 1.8 GFTFTTYA (配列番号 37) V <sub>H</sub> CDR 2.8 ISSGGTYT (配列番号 41) V <sub>H</sub> CDR 3.8 ATQGNYSLDF (配列番号 45) V <sub>L</sub> CDR 1.8 KSLRHTKGITF (配列番号 49) V <sub>L</sub> CDR 2.8 QMS (配列番号 52) V <sub>L</sub> CDR 3.8 AQNLEPLT (配列番号 55)	mV <sub>H</sub> .8 (配列番号 59)  mV <sub>L</sub> .8 (配列番号 63)	hV <sub>H</sub> .8a (配列番号 75) hV <sub>H</sub> .8b (配列番号 77) hV <sub>H</sub> .8c (配列番号 79) hV <sub>L</sub> .8a (配列番号 76) hV <sub>L</sub> .8b (配列番号 78) hV <sub>L</sub> .8c (配列番号 76)	
C1	1D8F5B3	MAb9				
C1	1E1C7B4	MAb10				
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11				
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12				
C1	2C6C3C7	MAb13	V <sub>H</sub> CDR 1.13 GFIFSSYG (配列番号 38) V <sub>H</sub> CDR 2.13 INTFGDRT (配列番号 42) V <sub>H</sub> CDR 3.13 ARGTGTY (配列番号 46) V <sub>L</sub> CDR 1.13 QSLDSDGKTY (配列番号 50) V <sub>L</sub> CDR 2.13 LVS (配列番号 53) V <sub>L</sub> CDR 3.13 WQGTFFPQT (配列番号 56)	mV <sub>H</sub> .13 (配列番号 60)  mV <sub>L</sub> .13 (配列番号 64)	hV <sub>H</sub> .13a (配列番号 80) hV <sub>H</sub> .13b (配列番号 82)  hV <sub>L</sub> .13a (配列番号 81) hV <sub>L</sub> .13b (配列番号 83)	
C1	2H9F4B7	MAb14				
C2	1F11F5E10	MAb21				

10

20

30

40

50

免疫原	ハイブリドーマ (寄託#)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列	ヒト化 V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 配列 (予測)
C2	1F11F5G9	MAb22			
C2	1A11F2C9	MAb23			
免疫原 C1 = KLH-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, KLH-Cys-Ahx-Ahx-(配列番号 27)としても表される 免疫原 C2 = DT-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, DT-Cys-Ahx-Ahx-(配列番号 27)としても表される					

表 1B において、全てのアミノ酸配列を、従来の N→C 方向を使用して表す。各々の免疫原について、プロガストリンペンブチドを、N 末端 Ahx-Ahx-Cys リンカーを用いて合成し、次に、キーホールリンペットへモシニン(“KLH”)又はジフテリア毒素(“DT”)担体のいずれかを Cys リンカー残基を介して結合させた。

10

20

30

40

【 0 0 8 1 】

表 1 A 及び 1 B に提供する例示的な抗 h P G モノクローナル抗体 M A b 1 - M A b 2 3

50

により結合される特定のエピトープは、S P O T技術及びアラニンスクランを使用してマッピングされた (Laune et al., 2002, J. Immunol. Methods 267: 53-70及びLaune, 1997, J. Biol. Chem. 272: 30937-30944にそれぞれ記載される通り) ( ' 3 2 9 出願の実施例 6 も参照のこと )。

【 0 0 8 2 】

S P O T技術において、推定エピトープに及ぶ15のアミノ酸ペプチド配列を生成し、ニトロセルロース膜上にスポットし、それを、次に、テスト抗体を用いてプローブし、抗体により認識される最小エピトープ配列を決定する。アラニンスクランを使用して、抗体結合のために決定的であるエピトープ内の残基を決定する。推定エピトープ内の各残基が、1つずつ、アラニンに変異しており、アラニン含有ペプチドを、次に、テスト抗体を用いてプローブする。

【 0 0 8 3 】

N末端抗hPGモノクローナル抗体MAb1-4及び15-20について、エピトープは少なくとも以下：DAPLG (配列番号28)、PDAPLG (配列番号29)、PRSQQP (配列番号30)、WKPRSQQPD (配列番号31)、又はWKPRSQQPDAPLG (配列番号32) (以下の表2Aに示す通り)の配列を含む。

【 0 0 8 4 】

【 表 3 】

表 2A		
MAb#	PG ペプチド抗原: SWKPRSQQPDAPLG	配列番号
MAb2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb1	PDAPLG	29
MAb3	DAPLG	28
MAb17	WKPRSQQPD	31
MAb18	WKPRSQQPD	31
MAb19	WKPRSQQPD	31
MAb20	WKPRSQQPD	31
MAb15	PRSQQP	30
MAb16	PRSQQP	30

【 0 0 8 5 】

C末端抗hPGモノクローナル抗体MAb5-7、9-12、14、及び21-23について、エピトープは少なくとも以下：FGR (配列番号33)、MDFGR (配列番号34)、AEDEN (配列番号35)、及びGWMDFGR (配列番号36) (以下の表2Bに示す通り)の配列を含む。

【 0 0 8 6 】

10

20

30

【表 4】

表 2A		
MAb#	PG ペプチド抗原: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	配列番号
MAb14	GWMDFGRR	36
MAb11	MDFGR	34
MAb5	FGRR	33
MAb6	FGRR	33
MAb7	FGRR	33
MAb9	FGRR	33
MAb10	FGRR..E	33
MAb12	FGRR	33
MAb23	AEDEN	35

## 【0087】

エピトープマッピング実験では、抗hPG MAb2及びMAb4が同じエピトープに結合することが明らかになる；抗hPG MAb1及びMAb3はほぼ同じエピトープに結合する；MAb17、MAb18、MAb19、及びMAb20はほぼ同じエピトープに結合する；MAb15及びMAb16はほぼ同じエピトープに結合する；抗hPG MAb5、MAb6、MAb7、MAb9、及びMAb12は同じエピトープに結合し、抗hPG MAb10とほぼ同じエピトープに結合する；ならびに抗hPG MAb11及びMAb14はほぼ同じエピトープに結合する。

## 【0088】

本明細書に記載する方法及びキットにおいて有用なN末端抗PG抗体の特定の実施態様は、hPGの残基10～14（配列番号28）、hPGの残基9～14（配列番号29）、hPGの残基4～10（配列番号30）、hPGの残基2～10（配列番号31）、又はhPGの残基2～14（配列番号32）を含むエピトープに結合する抗体を含む。

## 【0089】

本明細書に記載する方法及びキットにおいて有用なC末端抗PG抗体の特定の実施態様は、hPGの残基71～74（配列番号33）、hPGの残基69～73（配列番号34）、hPGの残基76～80（配列番号35）、又はhPGの残基67～74（配列番号36）を含むエピトープに結合する抗体を含む。

## 【0090】

本明細書に開示する方法及びキットにおいて有用なN末端及びC末端抗hPG抗体は、表1A&1Bに提供するものに加えて、例示的なMAb1-23を用いたあるいはN又はC末端エピトープに結合する他の参照抗体を用いた競合結合アッセイにおいて同定することができる（後のセクションにおいてより詳細に記載する通り）。

## 【0091】

実施例において実証する通り、全ての抗hPG抗体（hPGについて高い程度の特異性及び親和性を示すものでさえ）が、hPGの生物学的活性を中和するわけではない。例えば、抗hPG MAb14は約6pMの $K_D$ でhPGに結合するが、それは少なくともテストした濃度では、インビトロアッセイにおいて結腸直腸癌細胞の成長を阻害しなかったのに対し、他の抗hPGモノクローナル抗体（例えば、MAb1-MAb13及びMAb15-MAb23）は様々な程度まで阻害活性を示した。hPGに特異的に結合する非中和及び中和性抗体の両方が本開示の診断方法のために有用であるが、治療方法のために有用な抗hPG抗体は中和活性を示すはずである。

## 【0092】

本明細書において使用する通り、「中和性抗hPG抗体」は、非特異的抗体を用いて処理したコントロールサンプルと比較して、抗hPG抗体を用いて処理したテストサンプル

10

20

30

40

50

中の生きた結腸直腸癌細胞の数における統計的に有意な低下をもたらす抗hPG抗体である。任意の特定の抗hPG抗体が中和性である能力を評価するための特定のアッセイが、実施例22に記載される。このアッセイにおいて生きた結腸直腸癌細胞の数における少なくとも約50%低下を示すそれらの抗hPG抗体は、結腸直腸癌を処置する際に特に有用であると考えられるが、このアッセイにおける生きた結腸直腸癌細胞の数におけるより低いレベルの中和活性、例えば、40%、30%、20%、15%、又は10%の統計的に有意な低下を示す抗hPG抗体が治療的利益を提供することが期待される。これらのアッセイにおける使用のための例示的な細胞は、しかし、限定しないが、本明細書に記載する原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株を含む。

【0093】

したがって、一部の実施態様、例えば、治療的な実施態様において、有用な抗hPG抗体は中和性である。本明細書において、ならびに'329及び'041出願において開示される通り、抗hPGモノクローナル抗体が中和性である能力は、エピトープ依存的ではない。なぜなら、N末端及びC末端抗hPGモノクローナル抗体の両方が、結腸直腸癌細胞を用いたアッセイにおいて中和活性を示したからである。このように、一部の特定の実施態様において、中和性抗hPG抗体はN末端中和性抗hPG抗体である。他の実施態様において、中和性抗hPG抗体はC末端中和性抗hPG抗体である。

【0094】

任意の特定の抗hPG抗体の親和性は決定的ではない。しかし、一部の使用のために、少なくとも約1 $\mu$ Mの親和性を示す抗体が好まれうる。治療的使用のために、少なくとも約90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM、0.001nM又はさらに大きい親和性が望まれうる。表1A&1Bにおいて同定された抗hPGモノクローナル抗体の測定された親和性は、 $10^{-6}$  ~  $10^{-12}$ Mの範囲である(以下の表3に記述する通り)：

【0095】

10

20

【表 5】

表 3	
モノクローナル抗体	測定された親和性定数 K <sub>d</sub> (M)
抗 hPG MAb 1	2.5 μM (2.5 × 10 <sup>-6</sup> M)
抗 hPG MAb 2	185 nM (1.85 × 10 <sup>-7</sup> M)
抗 hPG MAb 3	6.4 nM (6.4 × 10 <sup>-9</sup> M)
抗 hPG MAb 4	3.5 nM (3.5 × 10 <sup>-9</sup> M)
抗 hPG MAb 5	13 pM (1.30 × 10 <sup>-11</sup> M)
抗 hPG MAb 6	0.6 nM (6.38 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 7	58 pM (5.84 × 10 <sup>-11</sup> M)
抗 hPG MAb 8	0.1 nM (1.08 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 10	3.6 nM (3.62 × 10 <sup>-9</sup> M)
抗 hPG MAb 11	0.3 nM (3.12 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 12	0.4 nM (4.43 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 13	0.6 nM (6.12 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 14	6.8 pM (6.86 × 10 <sup>-12</sup> M)
抗 hPG MAb 15	0.2 nM (2.11 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 16	0.2 nM (2.78 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 17	8.3 nM (8.29 × 10 <sup>-9</sup> M)
抗 hPG MAb 18	1.2 nM (1.24 × 10 <sup>-9</sup> M)
抗 hPG MAb 19	0.7 nM (7.79 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 20	0.2 nM (2.47 × 10 <sup>-10</sup> M)
抗 hPG MAb 21	3.9 nM (3.90 × 10 <sup>-9</sup> M)
抗 hPG MAb 22	5 nM (4.94 × 10 <sup>-9</sup> M)
抗 hPG MAb 23	0.4 μM (3.99 × 10 <sup>-7</sup> M)

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 6 】

特定の所望の適用のために特に適する親和性を有する抗 P G モノクローナル抗体を、これらの間より容易に選択する、あるいは、本明細書に記載する抗 h P G 抗体の種々の免疫原、相補性決定領域 ( C D R ) 配列、可変重鎖 ( V<sub>H</sub> ) 及び可変軽鎖 ( V<sub>L</sub> ) 配列を使用して生成又は設計することができる。任意の特定の抗 P G モノクローナル抗体の親和性は、当技術分野において周知の又は本明細書に記載する技術 ( 例えば E L I S A 、 等温滴定量測定 ( I T C ) 、 B I A c o r e 、 又は蛍光偏光アッセイなど ) を使用して決定することができる。特定のアッセイを実施例 2 3 に提供する。

## 【 0 0 9 7 】

表 1 A & 1 B に記述する通り、いくつかの N 末端及び C 末端モノクローナル抗 h P G 抗体が同定されている。これらの抗体の全てが h P G について特異的であり、列挙される全てのもの ( M A b 1 4 を除く ) が中和活性を示す。抗体を得るための有用なハイブリドーマのいくつかは、2010年10月6日に、ブダペスト条約に従って、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes ( C N C M ) に寄託された。抗 h P G M A b 1 - 2 3 を産生するハイブリドーマの指定名称及び寄託されたそれらのハイブリドーマの寄託登録番号を表 1 A & 1 B に提供する。また、抗体のいくつかについて、それらの可変重鎖 ( V<sub>H</sub> ) 、可変軽鎖 ( V<sub>L</sub> ) 、 V<sub>L</sub> 相補性決定領域 ( C D R ) 、及び V<sub>H</sub> C D R のアミノ酸配列が決定されている。これらのアミノ酸配列、及び開示を通じてそれらを参照するために使用される省略命名法も表 1 A & 1 B に提供する。簡単には、マウス重鎖及び軽鎖可変ドメインは、本明細書において m V<sub>H</sub> 及び m V<sub>L</sub> として言及され、対応するモノクローナル抗体の番号が続く ( 例えば、抗 h P G M A b 3 の可変軽鎖及び可変重鎖についてそれぞれ m V<sub>H</sub> . 3 及び m V<sub>L</sub> . 3 ) 。同様に、ヒト重鎖及び軽鎖可変ドメインは、本明細書において h V<sub>H</sub> 及び h V<sub>L</sub> として言及され、対応するモノクローナル抗体の番号が続く。3つの可変重鎖 C D R 及び3つの可変軽鎖 C D R は、それぞれ V<sub>H</sub> C D R 1 、 2 、又は3及び V<sub>L</sub> C D R 1 、 2 、又は3として言及され、特定の抗 h P G モノクローナ

ル抗体の番号が続く。例えば、M A b 3 の  $V_H$  C D R 1 は  $V_H$  C D R 1 . 3 と表示され、及び、M A b 3 の  $V_L$  C D R 1 は  $V_L$  C D R 1 . 3 と表示される。M A b 3 の  $V_H$  C D R 2 は  $V_H$  C D R 2 . 3 と表示され、及び、M A b 3 の  $V_L$  C D R 2 は  $V_L$  C D R 2 . 3 と表示される。

【 0 0 9 8 】

ほぼ同じエピトープに結合する抗 h P G モノクローナル抗体の対応する C D R 及び / 又は  $V_H$  及び  $V_L$  鎖を交換して、本明細書に記載する方法及びキットにおいて有用な新たな抗 h P G モノクローナル抗体をもたらすことが期待される。例えば、上に記述する通り、例示的な抗 h P G モノクローナル抗体 M A b 5 及び M A b 6 は同じエピトープに結合する。その  $V_L$  鎖において、これらの 2 つの抗体の  $V_L$  C D R の種々の組み合わせ、及び / 又は、その  $V_H$  鎖において、これらの 2 つの抗体の  $V_H$  C D R の種々の組み合わせを含む抗 h P G モノクローナル抗体を設計することができる。可能な種々の組み合わせを例証するための特定の非限定的な例として、そのような抗体は、その  $V_L$  鎖において、M A b 5 の C D R 1 及び 2 (それぞれ  $V_L$  C D R 1 . 5 及び  $V_L$  C D R 2 . 5 ) ならびに M A b 6 の C D R 3 (  $V_L$  C D R 3 . 6 )、及び、その  $V_H$  鎖において、M A b 6 の C D R 1 (  $V_H$  C D R 1 . 6 ) ならびに M A b 5 の C D R 2 及び 3 (それぞれ  $V_H$  C D R 2 . 5 及び  $V_H$  C D R 3 . 5 ) を含むもの。

【 0 0 9 9 】

寄託されているハイブリドーマにより産生される抗体の C D R のアミノ酸配列は、従来の手段を使用して得ることができる。例えば、ハイブリドーマ 6 B 5 B 1 1 C 1 0 及び 2 0 D 2 C 3 G 2 により産生される抗体の関連配列を以下の通りに決定した。簡単には、全 R N A を、製造者の指示に従って使用した R N A B e e 試薬 ( A M S B i o カタログ n o . C S - 1 0 4 B ) を使用して凍結細胞ペレットから単離した。V 領域についての c D N A を、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 ( R T - P C R )、それに続く c D N A 末端の 5 ' 迅速増幅 ( R A C E ) を使用して m R N A から調製した。c D N A 合成を、定常領域特異的プライマーを使用して行い、その後、第 1 鎖産物を精製し、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼを使用して、c D N A の 3 ' 末端にホモポリマーテールを加えた。「テール付き」c D N A 配列を、次に、プライマーペア (ホモポリマーテール及び  $V_H$  又は  $V_L$  領域のいずれかについての各々 1 つのプライマー) をそれぞれ使用した P C R により増幅した。重鎖及び軽鎖可変領域の P C R 産物を、次に、「T A」クローニングベクター ( p - G E M - T e a s y , P r o m e g a c a t . n o A 1 3 6 0 ) 中にクローン化し、標準的手順を使用して配列決定した。図 3 1 A - B ( M A b 3 )、図 3 1 C - D ( M A b 4 ) を参照のこと。

【 0 1 0 0 】

同様に、ハイブリドーマ 1 C 1 0 D 3 B 9、2 C 6 C 3 C 7、1 B 3 B 4 F 1、及び 1 E 9 D 9 B 6 1 により産生される抗体の関連配列を以下の通りに決定した。全 R N A を、製造者の指示に従って使用した R N A q u e o u s ( 登録商標 ) - 4 P C R キット ( A m b i o n c a t . N o . A M 1 9 1 4 ) を使用して凍結細胞ペレットから単離した。重鎖 V 領域の m R N A を、6 つの縮重プライマープールのセット ( H A ~ H F ) を使用して増幅し、軽鎖 V 領域の m R N A を、8 つの縮重プライマープールのセットを使用して増幅した ( クラスターについて 7 つ ( K A ~ K G ) 及び クラスターについて 1 つ ( L A ) )。可変領域についての c D N A を、R T - P C R を使用して m R N A から調製した。c D N A 合成を、定常領域特異的プライマーを使用して行い、5 ' マウスシグナル配列についての縮重プライマーのプール及び I g G  $V_H$ 、I g  $V_L$ 、及び I g  $V_L$  の各々についての 3 ' 定常領域に対するプライマーを使用した P C R が続いた。( Jones et al., 1991, Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions, Bio/Technology 9:88-89). 重鎖及び軽鎖可変領域の P C R 産物を、次に、「T A」クローニングベクター ( p - G E M - T e a s y , P r o m e g a c a t . n o A 1 3 6 0 ) 中にクローン化し、標準的手順を使用して配列決定した。図 3 1 E - F ( M A b 8 )、3 1 G - H ( M A b 1 3 )、3 1 I - J ( M a b 1 6 )、及び 3 1 K - L ( M a b 1 9 ) を参照のこと。

10

20

30

40

50

## 【0101】

表1Aを参照して、本明細書に記載する方法及びキットにおいて有用なN末端抗hPG抗体の特定の実施態様は、しかし、限定しないが、以下：

(a) 配列において、MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、又はMAb20のV<sub>L</sub> CDRに対応するV<sub>L</sub> CDR、及び、配列において、MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、又はMAb20のV<sub>H</sub> CDRに対応するV<sub>H</sub> CDRを有する抗体；

(b) 配列において、MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、又はMAb20のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub> CDRに対応するV<sub>L</sub> CDR及びV<sub>H</sub> CDRを有する抗体；

(c) 抗体、それにおいて：

(i) V<sub>L</sub> CDR 1はQSIV<sub>H</sub>SNGNTY(「V<sub>L</sub> CDR 1.3」；配列番号4)、QSLV<sub>H</sub>SSGVTY(「V<sub>L</sub> CDR 1.4」；配列番号10)、QSLLDSDGKTY(「V<sub>L</sub> CDR 1.16」；配列番号50)、及びSQHRTYT(「V<sub>L</sub> CDR 1.19」；配列番号51)より選択される；

(ii) V<sub>L</sub> CDR 2はKVS(「V<sub>L</sub> CDR 2.3」及び「V<sub>L</sub> CDR 2.4」；配列番号5)、LVS(「V<sub>L</sub> CDR 2.16」；配列番号53)、及びVKKDGSH(「V<sub>L</sub> CDR 2.19」；配列番号54)；

(iii) V<sub>L</sub> CDR 3はFQGSHPVPT(「V<sub>L</sub> CDR 3.3」；配列番号6)、SQSTHVPPT(「V<sub>L</sub> CDR 3.4」；配列番号11)、WQGT HSPYT(「V<sub>L</sub> CDR 3.16」；配列番号57)、及びGVGDAIKGQSVFV(「V<sub>L</sub> CDR 3.19」；配列番号58)より選択される；

(iv) V<sub>H</sub> CDR 1はGYIFTSYW(「V<sub>H</sub> CDR 1.3」；配列番号1)、GYTFSSSW(「V<sub>H</sub> CDR 1.4」；配列番号7)、GYTFTSYY(「V<sub>H</sub> CDR 1.16」；配列番号39)、及びGYSITSDYA(「V<sub>H</sub> CDR 1.19」；配列番号40)より選択される；

(v) V<sub>H</sub> CDR 2はFYPGNSDS(「V<sub>H</sub> CDR 2.3」；配列番号2)、FLPGSGST(「V<sub>H</sub> CDR 2.4」；配列番号8)、INPSNGGT(「V<sub>H</sub> CDR 2.16」；配列番号43)、及びISFSGYT(「V<sub>H</sub> CDR 2.19」；配列番号44)より選択される；及び

(vi) V<sub>H</sub> CDR 3はTRRDS PQY(「V<sub>H</sub> CDR 3.3」；配列番号3)、ATDGN YDWFAY(「V<sub>H</sub> CDR 3.4」；配列番号9)、TRGGYY PFDY(「V<sub>H</sub> CDR 3.16」；配列番号47)、及びAREVN YGDSYH FDY(「V<sub>H</sub> CDR 3.19」；配列番号48)より選択される；

(d) 配列において、MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、又はMAb20のV<sub>L</sub>に対応するV<sub>L</sub>、及び、配列において、MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、又はMAb20のV<sub>H</sub>に対応するV<sub>H</sub>を有する抗体；及び

(e) 配列において、MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、又はMAb20のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>に対応するV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>を有する抗体を含む。

## 【0102】

表1Bを参照して、本明細書に記載する方法及びキットにおいて有用なC末端抗hPG抗体の特定の実施態様は、しかし、限定しないが、以下：

(f) 配列において、MAb5、MAb6、MAb7、MAb8、MAb9、MAb10、MAb11、MAb12、MAb13、MAb14、MAb21、MAb22又はMAb23のV<sub>L</sub> CDRに対応するV<sub>L</sub> CDR、及び、配列において、MAb5、MAb

6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 21、MAb 22、又はMAb 23のV<sub>H</sub> CDRに対応するV<sub>H</sub> CDRを有する抗体；

(g) 配列において、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 21、MAb 22、又はMAb 23のV<sub>L</sub> 及びV<sub>H</sub> CDRに対応するV<sub>L</sub> 及びV<sub>H</sub> CDRを有する抗体；

(h) 抗体、それにおいて：

(vii) V<sub>L</sub> CDR 1はKSLRHTKGI TF (「V<sub>L</sub> CDR 1.8」；配列番号49) 及び QSLLDSDGKTY (「V<sub>L</sub> CDR 1.13」；配列番号50) より選択される；

(viii) V<sub>L</sub> CDR 2はQMS (「V<sub>L</sub> CDR 2.8」；配列番号52) 及び LVS (「V<sub>L</sub> CDR 2.13」；配列番号53) より選択される；

(ix) V<sub>L</sub> CDR 3はAQNLELP LT (「V<sub>L</sub> CDR 3.8」；配列番号55) 及び WQGTHFPQT (「V<sub>L</sub> CDR 3.13」；配列番号56) より選択される；

(x) V<sub>H</sub> CDR 1はGFTFTTYA (「V<sub>H</sub> CDR 1.8」；配列番号37) 及び GFIFSSYG (「V<sub>H</sub> CDR 1.13」；配列番号38) より選択される；

(xi) V<sub>H</sub> CDR 2はISSGGTYT (「V<sub>H</sub> CDR 2.8」；配列番号41) 及び INTFGDRT (「V<sub>H</sub> CDR 2.13」；配列番号42) より選択される；及び

(xii) V<sub>H</sub> CDR 3はATQGNYS LDF (「V<sub>H</sub> CDR 3.8」；配列番号45) 及び ARG TGTY (「V<sub>H</sub> CDR 3.13」；配列番号46) より選択される；

(i) 配列において、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 21、MAb 22、又はMAb 23のV<sub>L</sub> に対応するV<sub>L</sub>、及び、配列において、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 21、MAb 22、又はMAb 23のV<sub>H</sub> に対応するV<sub>H</sub>を有する抗体；及び

(j) 配列において、MAb 5、MAb 6、MAb 7、MAb 8、MAb 9、MAb 10、MAb 11、MAb 12、MAb 13、MAb 14、MAb 21、MAb 22、又はMAb 23のV<sub>L</sub> 及びV<sub>H</sub> に対応するV<sub>L</sub> 及びV<sub>H</sub>を有する抗体を含む。

#### 【0103】

当業者により理解される通り、診断方法において有用な抗hPG抗体は、任意の起源（例えば、哺乳動物（例、ヒト、霊長類、げっ歯類、ヤギ、又はウサギ）、非哺乳動物、又は自然におけるキメラ（1を上回る種に由来する）を含む）でありうる。動物（ヒトを含む）における治療的使用のために適した抗体は、好ましくは、処置されることが意図される同じ種に由来する、あるいは、改変又は設計され、非免疫原性である、又は処置されている動物において低下した免疫原性を有する。ヒトにおける治療的使用のために有用な抗hPG抗体の特定のクラスは、ヒト化抗体のクラスであり、以下により詳細に考察する。本明細書に記載する方法及びキットにおいて有用な抗hPG抗体は、また、任意のアイソタイプ（例えば、IgA（例、IgA1又はIgA2）、IgD、IgE、IgG（例、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4）、又はIgMを含む）でありうる、又はそれに由来しうる。治療的使用のために設計された抗hPG抗体は、好ましくは、IgGアイソタイプである。

#### 【0104】

一部の実施態様において、本明細書に記載する治療的方法のために有用な抗hPG抗体はヒト化される。一般的には、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、それにおいて、CDR領域の全て又は実質的に全てが、

10

20

30

40

50

非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものであり、「CDR移植」として言及することができる。ヒト化抗体は、また、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものを含むことができる。抗体をヒト化するための方法(ヒト化抗体を設計するための方法を含む)は、当技術分野において周知である。例えば、Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-7; 米国特許第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,762号、及び第6,180,370号、Queen et al.; EP 239400; PCT公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; EP 592106; EP 519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol. 28: 489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7: 805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973; 及び米国特許第5,565,332号(その開示は、その全体において参照により本明細書により組み入れられる)。

10

20

30

40

50

#### 【0105】

非ヒト抗hPG抗体のCDRに対応するCDR配列を有する抗体のヒト化バージョン(例として、限定しないが、表1Aに提供する種々のN末端抗hPGモノクローナル抗体及び表1Bに提供する種々のC末端抗hPGモノクローナル抗体を含む)を、これらの周知の方法を使用して得ることができる。選択された抗hPG抗体のヒト化V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>鎖の予測配列を、表1A及び1Bに提供する。ヒト化抗体の特定の例は、以下:

- (k) 本明細書に開示される任意の3つのV<sub>L</sub> CDR及び任意の3つのV<sub>H</sub> CDR;
- (l) 配列番号21に対応するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号22に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
- (m) 配列番号23に対応するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号24に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
- (n) 配列番号75、77、及び79からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号76及び78からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
- (o) 配列番号80及び82からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号81及び83からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
- (p) 配列番号84、86、及び88からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号85、87、及び89からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域; 及び
- (q) 配列番号90、92、及び94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号91、93、及び95からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体を含む。

#### 【0106】

当業者により認識される通り、特定の結合特性(例えば、目的の特定のエピトープに結合する能力など)を有する抗hPG抗体は、本明細書に記載する種々の抗原及び免疫原を使用し、目的の参照抗体とhPG結合について競合するそれらの能力を評価して容易に得ることができる。本明細書に記載する抗hPG抗体のいずれかを、そのような競合アッセイにおける参照抗体として利用することができる。目的のビオチン化参照抗hPG抗体を用いてhPG結合について競合する抗体の能力を評価するために有用な特定のアッセイを、実施例24に提供する。

#### 【0107】

参照抗hPG抗体と任意のテスト抗体(種又はアイソタイプと無関係)の間での抗体競合試験を行う際、最初に、参照を、直接的(例えばラジオアイソトープ又はフルオロフォ

ア)又は間接的(例えばビオチン(蛍光標識ストレプトアビジンとの結合を介して検出可能)又は酵素(酵素反応を介して検出可能)など)のいずれかで検出可能な標識を用いて標識し、その後の同定を可能にする。この場合において、標識参照抗hPG抗体(固定又は増加濃度で)を、既知量のhPGを用いてインキュベートし、hPG:標識抗hPG抗体複合体を形成する。非標識テスト抗体を、次に、複合体に加える。複合標識の強度を測定する。テスト抗体が、重複するエピトープに結合することにより、hPGについて標識参照抗hPG抗体と競合する場合、複合標識の強度は、テスト抗体の非存在において行うコントロール実験と比べて減少する。

【0108】

結合競合アッセイを行うための多数の方法が公知であり、適応して、上に及び実施例24に記載するアッセイと同等の結果をもたらすことができる。

10

【0109】

抗体は、それが、競合結合アッセイ、及び、具体的には、実施例24の競合結合アッセイにおいて参照抗hPG抗体のhPGへの結合を、少なくとも50%だけ(より高いレベルの低下、例えば60%、70%、80%、90%、又はさらには100%が望まれうる)、テスト抗体濃度の範囲0.01~100µg/ml(例、0.01µg/ml、0.08µg/ml、0.4µg/ml、2µg/ml、10µg/ml、50µg/ml、又は100µg/ml、あるいは記述する範囲内の他の濃度)で低下させる場合、参照抗hPG抗体とhPG結合について競合すると考えられ、このように、参照抗hPG抗体とほぼ同じ又は重複するhPGのエピトープに結合すると考えられる。

20

【0110】

本開示の抗体は、また、誘導体化し、共有結合的に修飾し、又は他の分子に結合させ、それらの特性を変え、もしくは、その機能を向上させることができる。例えば、しかし、限定しないが、誘導体化抗体は、修飾されている(例、グリコシル化、フコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、ホルミル化、公知の保護/遮断基による誘導体化、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などによる)抗体を含む。あるいは、可変又は定常領域中の特定のアミノ酸を改変し、機能を変化又は改善することができる。1つの非限定的な例において、抗体のFc領域中のアミノ酸残基を改変し、FcRnへのその結合を増加させることにより抗体の血清半減期を増加させてもよい。

【0111】

抗hPGモノクローナル抗体は、検出可能な成分を用いて標識された抗体を含む。そのような標識は、開示の抗hPGモノクローナル抗体に直接的又は間接的に結合させることができる。標識はそれ自体が検出可能であり(例、ラジオアイソトープ標識、アイソトープ標識、又は蛍光標識)、又は、酵素標識の場合において、検出可能である基質化合物又は組成物の化学変化を触媒することができる。検出可能物質の例は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、種々の陽電子放射断層撮影を使用した陽電子放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンを含む。

30

【0112】

本明細書に記載する方法及びキットにおいて有用な種々の抗hPG抗体は、全長抗体を用いて例示されてきたが、当業者は、結合フラグメント、あるいは全長抗体又は結合フラグメントから設計される又はそれに由来するサロゲート抗体も使用してもよいことを理解するであろう。適したフラグメント、サロゲートなどは、しかし、限定しないが、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv、vIgG、scFvフラグメント及びサロボディ、rIgG、ジスルフィド安定化Fv抗体(dsFv)、ダイアボディ、トリアボディ、及び単ドメイン抗体(例えばラクダ化抗体又はナノボディなど)を含む。

40

【0113】

本開示の抗体は、当業者に公知の任意の方法に従って産生することができる。1つの非限定的な例において、抗体は天然の供給源(抗体、例えば、ヒト、サル、ニワトリ、ヤギ、ウサギ、及びげっ歯類(例、ラット、マウス、及びハムスター)に由来する抗体などを産生することが可能である任意の種を含む)から得ることができる。他の種も可能である

50

。抗体は、また、遺伝子操作又は組換えDNAテクノロジー（例えば、しかし、限定しないが、培養中の酵母細胞、細菌細胞、及び哺乳動物細胞（例えばCHO細胞など）における組換え抗体の発現など）を利用するシステムから生成及び単離されうる。抗体は、また、完全に又は部分的に合成的でありうる。

#### 【0114】

本開示のモノクローナル抗体（MAb）は、ハイブリドーマテクノロジーを通じて産生された抗体に限定されない。モノクローナル抗体は、当技術分野において利用可能な又は公知の任意の手段により、単クローン（任意の真核生物、原核生物、又はファージのクローンを含む）に由来する。モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の多様な技術（ハイブリドーマ、組換え、及びファージディスプレイテクノロジー、又はそれらの組み合わせの使用を含む）を使用して調製することができる。

10

#### 【0115】

転移性結腸直腸癌のための従来処置

転移性結腸直腸癌は、生物学的治療、標的治療、抗体治療、放射線治療、化学療法、手術、凍結手術、又はこれらの組み合わせを用いて処置されうる。転移性結腸直腸癌のための他の処置も可能である。

#### 【0116】

生物学的治療は、癌と闘うための免疫システムの能力を強化又は回復する処置である。生物学的治療において使用される薬剤は、生物学的応答の修飾因子（例えばインターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子、モノクローナル抗体、ワクチン、遺伝子治療、及び非特異的免疫調節剤など）を含む。これらの薬剤の一部は、また、直接的な抗腫瘍効果を有しうる。標的癌治療は、腫瘍の成長及び進行に關与する特定の分子に干渉することにより癌の成長及び広がりを遮断する薬物又は他の物質である。

20

#### 【0117】

抗体治療は、抗体（しかし、限定しないが、転移性結腸直腸癌細胞を直接的又は間接的に殺す、その成長を減速又は停止させるモノクローナル抗体を含む）の投与を含む。そのような抗体は、種々の別々の機構を通じて機能することができる。例えば、特定の抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）又は他の機構を介した患者の免疫システムによる攻撃のために癌細胞をマークすることができる。他の抗体が結合し、癌細胞が生存又は成長のために要求する抗原の機能を変える又は阻害する。多数の抗体がこのように機能すると考えられる。例えば、ベパシズマブ（アバスチン（登録商標））（成長因子VEGFに結合する）を含む。他の機構も可能である。特定の抗体は、1つ又は複数の作用機構を介して働くことができる。さらに他の抗体を放射性又は化学毒性成分に結合させ、それらを、抗体により特異的に認識される抗原を優先的に発現する癌細胞に標的化することができる。ベパシズマブ、セツキシマブ、及びパニツムマブは、転移性結腸直腸癌を処置する際に有用な抗体の具体的な例である。

30

#### 【0118】

放射線治療は、癌細胞を殺し、腫瘍を縮小するためのX線、ガンマ線、中性子、陽子、及び他の供給源からの高エネルギー放射線の使用である。放射線は身体外の機械から来ることがあり（外部ビーム放射線治療）、又は、それは、癌細胞の近くの身体において配置された放射性材料から来ることがある（内部放射線治療又は近接照射療法）。全身放射線治療では放射性物質（例えば放射標識モノクローナル抗体など）が使用されており、それは身体全体にわたる組織へ血液中を移動する。放射線治療は、また、照射及び放射線治療とも呼ばれることがある。他の放射線治療は、三次元原体放射線治療（3D-CRT）及び強度変調放射線治療（IMRT）を含む。他の放射線治療も可能である。

40

#### 【0119】

化学療法は、癌細胞を殺す（細胞傷害又は細胞破壊）又はその成長を防止する（細胞分裂停止）有機小分子薬の使用である。多くの化学療法剤が、種々の機構を通じてそれらの抗腫瘍効果を媒介し、転移性結腸直腸癌の処置のために利用可能である。

#### 【0120】

50

例示的な化学療法剤は以下：葉酸拮抗剤（メトトレキサート及びペメトレキセドを含む）；プリン拮抗剤（クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、6メルカプトプリン、ネララビン、ペントスタチンを含む）；ピリミジン拮抗剤（カペシタビン、シタラビン、5フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレアを含む）；プレオマイシン；DNAアルキル化剤（ニトロソウレア、カルムスチン、ロムスチンを含む）；DNA架橋薬及びアルキル化剤（ベンダムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、メルファラン、ダカルバジン、テモゾロミド、プロカルバジンを含む）；アスパラギナーゼ；抗生物質（マイトマイシンを含む）；白金錯体（カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチンを含む）；プロテアソーム阻害剤（ボルテゾミブを含む）；紡錘体毒、例えばタキサン（ドセタキセル、パクリタキセルを含む）及びビンカ（ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルピンを含む）など；トポイソメラーゼ阻害剤、例えばアントラサイクリン（ダウノルピシン、ダウノマイシン、ドキシソルピシン、エピルピシンを含む）、カンプトテシン（イリノテカン及びトポテカンを含む）、ポドフィロトキシン（エトポシド、テニポシド、及びミトキサントロンを含む）などを含む。他の化学療法剤も可能である。

10

20

30

#### 【0121】

転移性結腸直腸癌は、しばしば、化学療法剤を互いに及び/又は抗体と組み合わせて使用して処置される。そのような組み合わせの例は、ロイコボリン（フォリン酸又はLV）と組み合わせた5フルオロウラシル（5FU）を含む。ウラシル（UFT）及びロイコボリンと組み合わせたテガフル；5FUと組み合わせた、又はさらにカペシタビンと組み合わせでのオキサリプラチン；カペシタビンと組み合わせたイリノテカン；5FU、イリノテカン、又はカペシタビンと組み合わせたマイトマイシンC；単独で、又はベバシズマブもしくはセツキシマブと組み合わせたFOLFOX（ロイコボリン（フォリン酸）、5-FU、及びオキサリプラチン）；単独で、又はベバシズマブもしくはセツキシマブと組み合わせたFOLFIRI（ロイコボリン、5-FU、及びイリノテカン）；単独で、又はベバシズマブもしくはセツキシマブと組み合わせたCapeOX（カペシタビン及びオキサリプラチン）；ベバシズマブと組み合わせた5-FU及びロイコボリン；ベバシズマブと組み合わせたカペシタビン；FOLFFOXIRI（ロイコボリン、5-FU、オキサリプラチン、及びイリノテカン）；セツキシマブと組み合わせたイリノテカン。他の組み合わせ計画は、5FU Mayo、5FU Roswell Park、LVFU2、FOLFOX4、FOLFOX6、bFOL、FUFOX、IFL、XELOX、XEIRI、及びCAPIRIを含み、それらはChau, I., and Cunningham, D., Br. J. Cancer 100 (2009) 1704-19；及びField, K. and Lipton, L., World J. Gastroenterol.13 (2007) 3806-15においてさらに詳細に記載され、それらは参照により組み入れられる。化学療法剤及び他の治療用薬剤の他の組み合わせも可能である。

#### 【0122】

##### 抗PG抗体を使用した治療方法

本開示は、転移性結腸直腸癌を処置及び防止し、結腸直腸癌の再発を防止し、及び結腸直腸癌幹細胞の成長を防止する目的のために、被験者に組成物中で抗PG抗体を投与することを含む治療方法を提供する。特定の実施態様において、抗体はヒトプロガストリン（「hPG」）について特異的であり、他の実施態様において、そのような抗体はモノクローナル抗体である。

40

#### 【0123】

これらの実施態様の一部によれば、本明細書に開示する抗PG抗体は、組成物中で、転移性結腸直腸癌のための処置を必要とする被験者へ、治療的に効果的な量で、単剤療法として又は組み合わせ治療として投与される。そのような被験者は、しかし、限定しないが、転移性結腸直腸癌と診断された者を含む。これらの方法の特定の実施態様において、抗体は抗hPGモノクローナル抗体である。

#### 【0124】

他の実施態様によれば、本明細書に開示する抗PG抗体は、組成物中で、転移性結腸直

50

腸癌の防止を必要とする被験者へ、治療的に効果的な量で、単剤療法として又は組み合わせ治療として投与される。そのような被験者は、しかし、限定しないが、原発性結腸直腸癌を有すると決定されているが、しかし、それらにおいて癌が遠隔組織又は臓器に広がっていることが知られていない者を含む。これらの方法の特定の実施態様において、抗体は抗hPGモノクローナル抗体である。

【0125】

さらに他の実施態様によれば、本明細書に開示する抗PG抗体は、組成物中で、転移性結腸直腸癌の再発についての防止を必要とする被験者へ、治療的に効果的な量で、単剤療法として又は組み合わせ治療として投与される。そのような被験者は、しかし、限定しないが、原発性又は転移性結腸直腸癌のために以前に処置されたが、その処置後、そのような癌が見かけ上消失した者を含む。これらの方法の特定の実施態様において、抗体は抗hPGモノクローナル抗体である。

10

【0126】

他の実施態様によれば、本明細書に開示する抗PG抗体は、組成物中で、結腸直腸癌幹細胞の成長の阻害を必要とする被験者に、治療的に効果的な量で、単剤療法として又は組み合わせ治療として投与される。そのような被験者は、しかし、限定しないが、結腸直腸癌（その成長又は転移はその内での癌幹細胞の存在に少なくとも部分的に起因している）を有する者を含む。他の実施態様は、そのような幹細胞を、そのような細胞の成長を防止又は阻害するために効果的な抗PG抗体組成物の量を用いて接触させることにより、結腸直腸癌幹細胞の成長を防止又は阻害する方法を提供する。そのような方法は、インビトロ又はインビボで行うことができる。これらの方法の特定の実施態様において、抗体は抗hPGモノクローナル抗体である。

20

【0127】

中和性抗PG抗体は、治療的抗体組成物中で主要な活性薬剤になりうるが、非中和性抗PG抗体が、それらの存在が中和性抗体の治療効力を実質的に阻害しない場合、存在しうる。

【0128】

抗PG抗体組成物を投与することができる被験者は、哺乳動物、例えば非霊長類（例、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）又は霊長類（例、サル、チンパンジー、類人猿、又はヒト）でありうる。被験者は、ヒト（例えば成人患者又は小児患者など）でありうる。

30

【0129】

転移性結腸直腸癌を処置又は防止する、あるいは、結腸直腸癌の再発を防止する目的のために、抗PG抗体組成物を、単剤療法として、あるいは転移性結腸直腸癌を処置又は防止する、あるいは、結腸直腸癌の再発を防止するために効果的な1つ又は複数の一次治療の補助として被験者に単独で投与することができる。

【0130】

このように、本開示の特定の実施態様において、抗hPG抗体組成物は、化学療法の補助として、放射線治療の補助として、生物学的治療の補助として、外科的治療の補助として、あるいは転移性結腸直腸癌を処置又は防止するために効果的な他の型の抗体治療の補助として、転移性結腸直腸癌を処置又は防止することを必要とする被験者に投与することができる。さらに他の実施態様において、抗hPG抗体組成物は、そのような再発を防止するために効果的な他の治療の補助として、結腸直腸癌の再発を防止することを必要とする被験者に投与することができる。

40

【0131】

補助治療として、抗hPG抗体組成物を、一次治療と同時に、それに連続して、又はそれと別々に投与することができる。

【0132】

抗hPG抗体組成物及び一次治療は、同じ時間に投与される場合、さらには、それぞれの投与が重複する場合、同時に投与されるが、しかし、異なる時間に開始又は終了する。

50

同時投与の非限定的な例は、被験者が転移性結腸直腸癌のための化学療法を受けている又は原発性結腸直腸腫瘍の外科的切除を受けているのと同時での抗hPG抗体組成物の投与である。

【0133】

抗hPG抗体組成物及び一次治療は、同じ日に（例えば、同じ診察の間に）、しかし、同時ではなく被験者に投与される場合、連続的に投与される。連続投与は、1、2、3、4、5、6、7、8時間又はそれ以上離して生じうる。一次治療は最初に投与してもよく、抗hPG抗体組成物の投与が続く。代替の実施態様において、抗hPG抗体組成物は最初に投与してもよく、一次治療が続く。

【0134】

抗hPG抗体組成物及び一次治療は、それらが異なる日に被験者に投与される場合、別々に投与される。特定の実施態様において、抗hPG抗体組成物及び一次治療は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、又は1ヶ月又はそれ以上の間隔で投与することができる。連続投与と同様に、抗hPG抗体組成物の投与は、一次治療の別々の投与に先行する又はそれに続くことができる。

【0135】

本開示の特定の他の実施態様において、抗hPG抗体組成物及び一次治療を、連続で又は別々に投与するかを問わず、交互パターンで反復的に投与することができる。

【0136】

特定の実施態様において、一次治療の補助として抗hPG抗体組成物を投与することは、相加よりも大きな、又は相乗な効果をもたらす、治療的利益を提供し、そこでは、いずれの治療も、単独では、陥る許容不可能な副作用を伴わず、治療的に効果的でありうる量で投与することはできない。これらの状況下で、抗hPG抗体組成物及び/又は一次治療は、より低い量で投与することができ、それにより有害作用の可能性又は重症度を低下させる。しかし、相乗効果は、抗hPG抗体組成物を用いた補助治療が治療的に効果的であるために要求されない。

【0137】

7.7. 転移性結腸直腸癌の処置の効力をモニターする方法

上に記述する通り、原発性及び/又は転移性結腸直腸癌を伴う患者は、上昇したPGの血漿及び/又は血清レベルを有するのに対し、健常個人におけるPGのベースラインレベルは無視できる。原発性及び/又は転移性結腸直腸癌を伴う被験者におけるPG血漿及び/又は血清レベルを測定可能であり、約25pM又はそれより大きい。この観察に基づき、PGの血漿及び/又は血清レベルを使用して、とりわけ、原発性又は転移性結腸直腸癌の処置の有効性をモニターし、原発性又は転移性結腸直腸癌の存在を検出及び診断し、抗PG抗体を用いた処置から利益を得る被験者を選択することができる。

【0138】

このように、本開示は、転移性結腸直腸癌のための前のラウンドの治療の有効性を決定するために、結腸直腸転移癌のために処置されている被験者をモニターする方法を提供する。これらの方法は、単独で、又は他（しかし、限定しないが、抗hPG抗体組成物の投与、他の型の抗体を用いた治療、化学療法、放射線治療、生物学的治療、及びその他を含む）との組み合わせにおいて使用される転移性結腸直腸癌に対する任意の型の治療のために使用することができる。1ラウンドの治療が完了した後、被験者のケアについて責任がある処置チームは、それが、新たなラウンドの処置を投与するかしないかを決定し、他の臨床決定を行うために効果的であるか否かを確認する必要がある。

【0139】

モニタリング方法の一部の実施態様において、1つ又は複数の体液（例えば血液、血漿、血清、又はその他など）におけるPGの濃度は、転移性結腸直腸癌のための処置を開始する前に測定し、処置が完了した後に、ある時間に同じ型の体液中で測定されたPGレベルと比較することができる。他の実施態様において、目的の組織（例えば結腸直腸癌の生検など）におけるPGレベルを測定する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 0 】

P G濃度における低下は効力を示している。典型的には、処置後のP C処置における低下の範囲が大きいほど、治療はより有効であった。操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、患者における転移の数及び/又はサイズが、有効な処置の結果として低下するにつれて、転移により産生されたP Gの総量も減退すると考えられる。対照的に、処置が完了した後でのP Gレベルにおける低下又は上昇の欠如は、治療が効果的ではなかったことを示しうる。この情報に基づき、処置チームは、新たなラウンドの治療を開始するか否かを定めることができる。

## 【 0 1 4 1 】

1ラウンドの治療が完了し、その時間の前にサンプルをモニタリングのために取る適した間隔が、当業者により容易に決定され、考慮下にある治療の型、被験者の性別及び年齢、ならびにその他といった変数に依存する。例示的な間隔は、1ラウンドの治療が完了した後、サンプルを本開示のモニタリング方法における使用のために取る前の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11週間及び3、4、5、又は6ヶ月を含む。他の間隔も可能である。他の実施態様において、治療の完了後の異なる時間間隔での複数の測定値を取り、次に、グラフ化し、傾向が存在するか否かを決定しうる。非限定的な例において、P Gレベルを、1ラウンドの治療が終わった後、最初の6ヶ月にわたり毎週又は毎月決定することができる。他の間隔も可能である。

10

## 【 0 1 4 2 】

体液中のP G濃度レベルは、当業者が精通する分析技術（例えば、しかし、限定しないが、R I A及びE L I S Aなど）を使用して測定することができる。h P Gについて特異的な抗体に頼るアッセイ方法（例えばこれらなど）は、当業者の知識に従って、非中和性又は中和性抗体（例えば本明細書に開示するものなど）を使用して行うことができる。

20

## 【 0 1 4 3 】

特定の実施態様において、P Gレベルは、プロガストリンのN末端を標的化する1つの抗P G抗体及びプロガストリンのC末端を標的化する第2の抗P G抗体を用いたサンドイッチE L I S A法を使用して測定されうる。そのようなサンドイッチアッセイのために有用な例示的なN及びC末端抗P G抗体を、後のセクションに記載する。そのようなアッセイにおいて、表面（例えば96ウェルプレート中のウェルなど）を調製し、それに、既知量の第1の「捕捉」N末端又はC末端抗P G抗体を結合させる。テストサンプルを次に表面に適用し、インキュベーション期間が続く。表面を次に洗浄し、非結合抗原を除去し、第2「検出」抗P G抗体を含む溶液を適用し、そこで検出抗体がP Gの異なるエピトープに結合する（例えば、捕捉抗体がC末端抗P G抗体である場合、N末端抗P G抗体が検出抗体として使用され、及び逆もまた同様である）。P Gレベルを次に直接的（例えば、検出抗体が検出可能な標識に結合している場合）又は間接的（検出抗P G抗体に結合する標識二次抗体を通じて）のいずれかで測定する。血漿及び/又は血清P Gレベルを測定するための特定のサンドイッチアッセイを、実施例20に提供する。

30

## 【 0 1 4 4 】

本開示の方法の代替の実施態様において、目的の体液中のP Gレベルを低下させる際での被験者への抗h P G抗体組成物の投与の効力をモニターしてもよい。これらの方法において、サンプルを経時的に取り、P G濃度をグラフ化し、傾向を評価してもよい。残留抗h P G抗体が存在する場合、データは、抗体によるP Gの隔離に起因するP Gレベルにおける低下を示すことがあり、この効果が軽減するにつれて上昇が続き、処置が転移性結腸直腸癌を処置するために効果的である場合にはその後の減退が続く。

40

## 【 0 1 4 5 】

本開示の方法の他の実施態様によれば、約50 pM、40 pM、30 pM、20 pM、10 pM、5 pM、2 pM、1 pM又はそれ以下の既定の閾値を下回る血液、血清、又は血漿P G濃度は、転移性結腸直腸癌を処置するための効力を示している。効力を示している他のP G濃度の閾値も可能であり、当業者により容易に決定される。

## 【 0 1 4 6 】

50

## 7.8. 結腸直腸癌の存在を決定する方法

本開示は、また、いずれの被験者がテストされうるのかに従って、特定の実施態様を提供し、原発性又は転移性結腸直腸癌の存在あるいは処置後の結腸直腸癌の再発を検出する目的のために、適切なベースラインと比較して、それらが体液（例えば血液、血漿、血清、又はその他など）において上昇したPGレベルを有するか否かを決定する。

### 【0147】

本開示の方法の特定の実施態様において、被験者は、結腸直腸癌（原発性又は転移性）が被験者において存在するか否かを決定することが望まれる者でありうる。そのような被験者において、上昇したPGレベル（ベースラインと比べて）は、結腸直腸癌が存在することを示す。操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、被験者における結腸直腸癌のサイズ及び/又は範囲が増加するにつれて、全身及び/又は局所PGレベルも被験者において増加すると考えられる。

10

### 【0148】

他の実施態様において、被験者は、結腸直腸癌が遠隔組織又は臓器に転移したか否かを決定することが望まれる、原発性結腸直腸癌のために以前に処置された者でありうる。そのような被験者において、上昇したPGレベル（ベースラインと比べて）は、転移性結腸直腸癌が存在することを示す。そのような被験者についても、本開示の方法が、とりわけ、転移性結腸直腸癌を防止することが意図される処置が効果的であったか否かを決定するために有用である。操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、被験者における転移の数及び/又はサイズが増加するにつれて、全身及び/又は局所PGレベルも被験者において増加すると考えられる。

20

### 【0149】

さらなる他の実施態様によれば、被験者は、癌が見かけ上消失し、結腸直腸癌が再発している又は戻っているか否かを決定することが望まれる、結腸直腸癌（原発性又は転移性）のために以前に処置された者でありうる。そのような被験者において、上昇したPGレベル（ベースラインと比べて）は、結腸直腸癌が再発したことを示す。操作の任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、被験者における再発性結腸直腸癌のサイズ及び/又は範囲が増加するにつれて、全身及び/又は局所PGレベルも被験者において増加すると考えられる。

30

### 【0150】

転移性結腸直腸癌がPGを分泌し、PG感受性であるとの、本明細書に記載する発見の観点から、本開示は、また、抗PG抗体を投与することにより、治療から利益を受けうる被験者を選択する方法を提供する。このように、被験者は、それらが上昇した血漿及び/又は血清PGレベル（ベースラインと比べて）を有するか否かを検出するために、ケア提供者によりスクリーニングされうる。一旦、そのような被験者が同定されると、ケア提供者は、被験者における転移性結腸直腸癌の存在を確認するために追加のテストを注文することができる。転移性結腸直腸癌が確認された場合、次に、処置（抗hPG抗体の投与を含む）を始めることができる。

### 【0151】

被験者を選択するための方法の特定の実施態様において、スクリーニングを、被験者のプライマリケア医師による定期的な健康診断の一部として、又は、被験者の大規模集団を対象とする公衆衛生への取り組みの一部として実施しうる。他の実施態様において、スクリーニングされる被験者は、転移性結腸直腸癌を発生するより高い、次に、平均的なりスクを伴う特定の亜集団のメンバーである。そのような群は、しかし、限定しないが、結腸直腸癌を有していた近親者（親、兄弟、姉妹、又は子供）、結腸直腸ポリープの病歴を有する被験者、肥満である被験者、喫煙する被験者、及び身体的に不活性である被験者を含む。他のそのような被験者は、潰瘍性大腸炎、クローン病、又は家族性腺腫性ポリポーシス（FAP）と診断されたもの、あるいはHNPCC遺伝子における変異、APC遺伝子における変異、又は結腸直腸癌の増加リスクと関連する他の遺伝子を有するものである。さらに他の群は、結腸直腸癌について以前に診断され、成功裏に処置された被験者を含む

40

50

。

【0152】

P G濃度を、当業者が精通した技術（例えば、しかし、限定しないが、R I A及びE L I S Aなど）を使用して測定することができる。h P Gについて特異的な抗体に頼るアッセイ方法（例えばこれらなど）は、当業者の知識に従って、非中和性又は中和性抗体（例えば本明細書に開示するものなど）を使用して行うことができる。

【0153】

本開示の方法を使用した上昇P Gレベルの検出に基づき、処置チームは、次に、結腸直腸癌の存在又は処置後の結腸直腸癌の再発を確認するための追加試験を試みる、あるいは被験者を処置することに直接進むか否かを定めることができる。

10

【0154】

異なるベースラインを使用してもよく、それに対して、被験者において測定されたP Gレベルを比較する。本開示の方法の一部の実施態様において、ベースラインを、先の時間に同じ被験者からサンプリングした目的の体液中のP Gレベルを測定することにより確立する。そのようなサンプルを所定の間隔で取り、P Gレベルを測定してもよい。非限定的な例において、P Gレベルを、処置の終了後、最初の6ヶ月にわたり毎週又は毎月、次に、処置の終了の2周年目まで3ヶ月毎に1回、次に、その後、6ヶ月又は1年毎に測定する。他の所定の間隔も可能である。

【0155】

本開示の方法の他の実施態様において、ベースラインは、結腸直腸癌の転移又は再発の検出のためのサンプリングを受けた被験者のものと同様の特徴を伴う個体の集団における平均P Gレベルから確立することができる。そのような特徴は、しかし、必ずしも限定しないが、性、年齢、原発性結腸直腸腫瘍のステージ、特定の処置へ先の曝露、これらの又は他の因子の組み合わせを含みうる。さらに他の実施態様において、被験者に特異的なベースライン、ならびに集団由来のベースラインの両方を、対象の状態を評価する際に使用することができる。

20

【0156】

当業者の知識によれば、特定の閾値を超える（ベースラインと比べて）被験者からのサンプル中でのP Gレベルは、結腸直腸癌又は処置後に再発した結腸直腸癌を有するとして結論付けられる。処置チームは、次に、結腸直腸癌の存在を確認するための確認試験を試みてもよい。そのようなテストの非限定的な例は、結腸直腸癌を検出するための探索的手術、結腸直腸癌を検出するための医学的画像テスト、潜血を検出するための被験者の便のテスト、結腸内視鏡検査、増加リスクの結腸直腸癌を示している遺伝子変異（例えばH N P C C遺伝子又はA P C遺伝子など）の存在についての被験者から得られたサンプルのテスト、及び結腸直腸癌を示している生物学的因子（例えば癌胎児性抗原（C E A）など）の存在についての被験者から得られたサンプルのテストを含む。

30

【0157】

なぜなら、摂食は、通常、ガストリン合成及び分泌を増加させることから、摂食は、結腸直腸癌転移又は再発性結腸直腸癌により産生されたP Gの正確な測定に干渉しうる血中P Gレベルにおける一過性の増加をもたらしうる。この効果を回避するために、特に血漿及び/又は血清中のP Gレベルを決定すべき場合、サンプルを、当業者により容易に決定することができる通り、十分な時間にわたる絶食後に被験者から取ることができる。

40

【0158】

7.9. 医薬的組成物

本発明の方法における使用のための抗h P G抗体は、組成物として製剤化することができる。場合により、組成物は、1つ又は複数の追加の治療用薬剤（例えば、転移性結腸直腸癌又は結腸直腸癌の再発に対する治療的効力を伴う化学療法剤又は他の抗体など）を含むことができる。組成物は、医薬的に許容可能な担体を通例含む無菌の医薬的組成物の部分として通常供給される。この組成物は、患者にそれを投与する所望の方法に依存して、任意の適した形態でありうる。

50

## 【 0 1 5 9 】

抗 P G 抗体は、種々の経路により、典型的には、非経口的に、例えば、皮下、静脈内、腹腔内、又は筋肉内注射を介して被験者に投与することができる。投与は、1つ又は複数のボラス注射として、あるいは1つ又は複数の注入としてもたすることができる。他の投与経路が、また、当業者の知識に従って可能である。任意の所与の場合における投与のための最も適した経路は、投与される特定の組成物及び被験者の特徴（例えば年齢又は性など）に依存しうる。

## 【 0 1 6 0 】

医薬的組成物は、用量当たりを開示の抗 h P G 抗体の所定量を含む単位用量形態で便利に提示することができる。そのような単位は、しかし、限定しないが、例えば、5 mg ~ 5 g、10 mg ~ 1 g、又は 20 ~ 50 mg を含むうる。開示における使用のための医薬的に許容可能な担体は、例えば、投与経路に依存して、多様な形態を取ることができる。

10

## 【 0 1 6 1 】

開示の医薬的組成物は、所望の純度を有する抗体を、当技術分野において典型的に用いられる任意の医薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定剤（それらは全て本明細書において「担体」として言及される）、即ち、緩衝化薬剤、安定化薬剤、保存剤、等張剤、非イオン性界面活性剤、酸化防止剤、及び他の種々の添加剤を混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液としての保存のために調製することができる。Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed.1980)を参照のこと。そのような添加剤は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに非毒性でなければならない。

20

## 【 0 1 6 2 】

緩衝化薬剤は、生理的条件に近似する範囲内の pH を維持するために役立つ。それらは約 2 mM ~ 約 50 mM の範囲の濃度で存在することができる。本開示を用いた使用のための適した緩衝化薬剤は、有機酸及び無機酸の両方ならびにその塩、例えばクエン酸緩衝剤（例、クエン酸ナトリウム - クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸ナトリウム混合物など）、コハク酸緩衝剤（例、コハク酸 - コハク酸ナトリウム混合物、コハク酸 - 水酸化ナトリウム混合物、コハク酸 - コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸緩衝剤（例、酒石酸 - 酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸 - 酒石酸カリウム混合物、酒石酸 - 水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸塩緩衝剤（例、フマル酸 - フマル酸ナトリウム混合物、フマル酸 - フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸ナトリウム - フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸緩衝剤（例、グルコン酸 - グルコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸 - 水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸 - グルコン酸カリウム混合物など）、シュウ酸緩衝剤（例、シュウ酸 - シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸 - 水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸 - シュウ酸カリウム混合物など）、乳酸緩衝剤（例、乳酸 - 乳酸ナトリウム混合物、乳酸 - 水酸化ナトリウム混合物、乳酸 - 乳酸カリウム混合物など）、及び酢酸緩衝剤（例、酢酸 - 酢酸ナトリウム混合物、酢酸 - 水酸化ナトリウム混合物など）などを含む。加えて、リン酸緩衝剤、ヒスチジン緩衝剤、及びトリメチルアミン塩（例えば T r i s など）を使用することができる。

30

## 【 0 1 6 3 】

保存剤を加えて、微生物の成長を遅らせることができ、0.2% - 1% (w/v) の範囲の量で加えることができる。本開示を用いた使用のための適した保存剤は、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ベンザルコニウムハロゲン化物（例、塩化物、臭化物、及びヨウ化物）、塩化ヘキサメトニウム、及びアルキルパラベン（例えばメチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、及び3ペントノールなど）を含む。等張剤（時折「安定剤」として公知である）を加えて、本開示の液体組成物の等張性を確実にし、多価糖アルコール、例えば、三価又はそれより高い糖アルコール（例えばグリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトールなど）を含む。安定剤は、機能において、増量剤から添加剤

40

50

(治療用薬剤を安定化する、又は、変性もしくは容器壁への付着を防止することを助ける)に及びうる広範なカテゴリーの賦形剤を指す。典型的な安定剤は、多価糖アルコール(上に列挙)でありうる;アミノ酸(例えばアルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなど)、有機糖又は糖アルコール(例えばラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイノシトール、ガラクトール、グリセロールなど)、シクリトール(例えばイノシトールなど)を含む;ポリエチレングリコール;アミノ酸ポリマー;含硫の還元剤(例えば尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、モノチオグリセロール、及びチオ硫酸ナトリウムなど);低分子量ポリペプチド(例、10残基又はそれより少ないペプチド);タンパク質(例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなど);親水性ポリマー(例えばポリビニルピロリドンなど)単糖類(例えばキシロース、マンノース、フルクトース、グルコースなど);二糖類(例えば、ラクトース、マルトース、スクロース)、及び三糖類(例えばラフィノースなど);及び多糖類(例えばデキストランなど)。安定剤は、0.1~10,000重量部の活性タンパク質重量の範囲で存在することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0164】

非イオン性界面活性物質又は界面活性剤(「湿潤剤」としても公知である)を加えて、治療的薬剤を可溶化し、ならびに、攪拌誘導性の凝集に対して治療的タンパク質を保護するのに助けをすることができ、それは、また、タンパク質の変性を起こすことなく、製剤が剪断面に曝露されることを許す。適した非イオン性界面活性物質は、ポリソルベート(20、80など)、ポリオキサマー(184、188など)、プルロニックポリオール、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル(TWEEN(登録商標)20、TWEEN(登録商標)80など)を含む。非イオン性界面活性物質は、約0.05mg/ml~約1.0mg/ml、例えば、約0.07mg/ml~約0.2mg/mlの範囲で存在しうる。界面活性物質は、しかし、抗体に結合する傾向を有し、それらの立体構造を損ないうる。従って、使用した場合、濃度の安定化は低く、実験的に識別しなければならない。

#### 【0165】

追加の種々の賦形剤は、キレート剤(例、EDTA)、酸化防止剤(例、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE)、及び共溶媒を含むことができる。

#### 【0166】

抗hPG抗体は、単独であるいは1つ又は複数の抗hPG抗体単独の混合物として、あるいは結腸直腸癌転移又は再発を防止するために有用な他の薬剤(しかし、限定しないが、化学療法剤、生物学的治療用薬剤、及び抗体治療用薬剤(例、ペバシズマブ)を含む)との混合物又は組み合わせで投与することができる。

#### 【0167】

##### 7.10. 医薬的キット

特定の実施態様において、本発明は、臨床医又は他のユーザーによる使用のための医薬的キットを提供する。医薬的キットは、開示の抗hPG抗体(例、凍結乾燥形態又は水溶液のいずれか)及び以下:本開示において他に記載する少なくとも第2の治療用薬剤;抗hPG抗体を投与するためのデバイス(例、ニードル及び/又はシリンジ);及び抗体が凍結乾燥又は濃縮形態である場合、抗体を再懸濁又は希釈するための医薬品グレードの水又は緩衝液の1つ又は複数を含むパッケージである。キットは、また、抗体組成物を調製する及び/又は組成物を患者に投与するための指示を含みうる。

#### 【0168】

抗hPG抗体組成物の各単位用量は別々にパッケージ化することができる。キットは1つ又は複数の単位用量(例、2単位用量、3単位用量、4単位用量、5単位用量、7単位用量、8単位用量、10単位用量又はそれ以上)を含むことができる。一実施態様において、1つ又は複数の単位用量はシリンジ中に各々収容される。別の実施態様において、1つ又は複数の単位用量は、IVラインに接続するために適したバッグ又は同様の容器中に

各々含める。

【0169】

#### 7.11. 効果的な投与量

本発明の中和性抗hPG抗体を含む組成物は、一般的に、少なくとも部分的に所望の結果を達成するために効果的な投与量で、結腸直腸癌転移を処置又は防止するあるいは結腸直腸癌の再発を防止することを必要とする被験者に投与される。

【0170】

結腸直腸癌転移の処置に関して、治療上の利益は、とりわけ、転移性結腸直腸癌の任意の寛解、結腸直腸癌転移の成長を停止又は減速すること、被験者内でのそのような転移の数及び/又はサイズを低下すること、結腸直腸癌転移への血流を低下させること、結腸直腸癌転移の代謝を低下させること、結腸直腸癌転移の重症度を低下させること、転移性結腸直腸癌細胞の増殖を阻害すること又はそのアポトーシスを増加させること、被験者における転移性結腸直腸癌に関連する症状又は徴候の増悪を停止又は遅延すること、結腸直腸癌の外科的切除を許すこと(そこで、そのような切除は処置前に可能ではなかったであろう)、転移性結腸直腸癌を有する被験者の寿命、快適さ、又は生活の質を向上させること、あるいは、そのような被験者において痛みを低下させることを意味する。転移性結腸直腸癌の完全な治癒は、望ましいが、治療上の利益が存在するために要求されない。

10

【0171】

治療上の利益は、また、無増悪生存期間(PFS)に関して測定することができる。この状況において、ステージII、III、又はIV結腸直腸癌を最初に有する被験者が、疾患のより進行したステージに進むために要する時間を測定する。3、4、5、6、7、8、9、10ヶ月又はそれ以上のPFSにおける増加は、治療上の利益を提供すると考えられる。

20

【0172】

転移性結腸直腸癌の腫瘍サイズ、数、及び代謝を、種々のスキャン技術(しかし、限定しないが、CT、MRI、機能的MRI、SPECT、及びPETを含む)、ならびに当業者に公知の他の方法を使用して測定することができる。

【0173】

治療上の利益は、また、1つ又は複数のサロゲートエンドポイントと相関しうる。例として、限定しないが、転移性結腸直腸癌による特定のタンパク質又は他の因子(例えばプロガストリン又は癌胎児性抗原(CEA)など)の産生は、被験者において経時的に測定することができ、因子のレベルにおける低下は治療上の利益を示している。

30

【0174】

結腸直腸癌転移の防止に関しては、効果的な投与量は、転移性結腸直腸癌を少なくとも部分的に防止するために効果的なものであり、とりわけ、結腸直腸癌転移の非存在、結腸直腸癌転移の成長を遅延、停止、又は減速すること、最終的に生じうる任意の結腸直腸癌転移の数及び/又はサイズを低下させること、ならびに、転移性結腸直腸癌細胞が原発腫瘍から広がることのできる機構段階のいずれかの阻害又はその干渉により証明される。結腸直腸癌転移の完全な防止は、望ましいが、効力が存在するために要求されない。

【0175】

結腸直腸癌の再発の防止に関しては、効果的な投与量は、結腸直腸癌の再発を少なくとも部分的に防止するために効果的なものであり、とりわけ、結腸直腸癌の再発の非存在、結腸直腸癌の寛解を維持すること、あるいは、最初の結腸直腸癌が検出不可能になった又は見かけ上消失した処置後の被験者において、結腸直腸癌の再成長、又は新たな結腸直腸癌腫瘍の成長の再出現を遅延、停止、又は減速させることにより証明される。結腸直腸癌の再発を防止するための効力は、また、とりわけ、結腸直腸癌幹細胞の死滅、結腸直腸癌幹細胞の成長又は増殖を遅延、停止、阻害、又は減速させること、結腸直腸癌幹細胞のアポトーシスを増加させること、あるいは結腸直腸癌の形成又は成長に寄与することが可能ではない細胞への結腸直腸癌幹細胞の分化を起こすことにより証明される。本明細書において他に記載する通り、結腸直腸癌幹細胞は、そのような細胞に特徴的な1つ又は複数の表

40

50

現型特質（しかし、限定しないが、特定の細胞マーカーの発現、低付着培養条件下でスフェロイドとして成長する能力、及び移植後に新たな腫瘍成長を開始する能力を含む）を有するとして同定可能である。結腸直腸癌の再発の完全な防止は、望ましいが、効力が存在するために要求されない。

【0176】

全てのプロガストリンを結合することは、治療的効力を達成するために必ずしも要求されない。むしろ、腫瘍内のプロガストリンの濃度を、全身的に、特に体液（例えば腹水、胸水、脳脊髄液、リンパ液、血液、血漿、血清、又は他の場所からの液体など）において低下させることも効果的でありうる。

【0177】

当業者の知識によれば、抗hPG抗体組成物の用量を、患者において滴定し、投与後の所定の時間での目的の組織又は体液中での遊離hPG濃度を低下させるようにすることができる（少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%、あるいは約5% - 10%、約10% - 15%、約15% - 20%、約20% - 25%、約25% - 30%、約30% - 35%、約35% - 40%、約40% - 45%、約45% - 50%、約50% - 55%、約55% - 60%、約60% - 65%、約65% - 70%、約70% - 75%、約75% - 80%、約80% - 85%、約85% - 90%、又は約90% - 95%又は先行する値のいずれかの間の範囲での遊離hPG濃度におけるパーセンテージ低下）。

【0178】

投与される抗hPG抗体の量は、処置される被験者のサイズ及び体重、投与の形態、経路、及び部位、治療計画（例、第2の治療用薬剤が使用されているか否か）、処置されている特定の被験者の年齢及び状態、処置前の前記被験者の血液中で検出されたPGのレベル、抗PG抗体を用いて処理されている被験者の感受性を含む様々な要因に依存しうる。適切な投与量は、当業者により容易に決定されることができる。最終的には、臨床医が、使用される適切な投与量を決定する。この投与量は、しばしば、適宜、反復することができる。副作用が発生した場合、投与量の量及び/又は頻度を、通常の臨床診療に従って、変える又は低下させることができる。適当な投与量及び治療計画は、本開示の方法又は当業者に公知の他の方法を使用して、治療の進行をモニターすることにより確立することができる。

【0179】

効果的な投与量を、最初にインビトロアッセイから推定することができる。例えば、動物における使用のための初回用量を製剤化し、インビトロで測定されたプロガストリンについての抗体の結合親和性である又はそれを上回る抗hPG抗体の循環血液又は血清濃度を達成してもよい。特定の抗体のバイオアベイラビリティを考慮に入れた、そのような循環血液又は血清中濃度を達成するための投与量の算出は、十分に当業者の能力内である。ガイドンスについては、読者はパート1を参照のこと：General Principles in "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," 11th Ed., Hardman, J.G., et al., Eds., McGraw-Hill Professional、及びその中で引用される参考文献。初回投与量は、また、インビボのデータ（例えば動物モデルなど）から推定することができる。当業者は、そのような情報を定期的に適応して、ヒトへの投与のために適した投与量を決定することができる。

【0180】

特定の実施態様において、静脈内用量を、処置の数日から数週間前に数回個人の血清又は血漿PG濃度を測定し、飽和しうる抗PG抗体の量（即ち、PGの全てに結合するために十分でありうる量）を算出することにより個々の被験者について決定してもよい。当業者により理解される通り、PGの所与の血清又は血漿中濃度について飽和を達成するために必要な任意の特定の抗体の量は、特定の抗体の親和定数に部分的に依存する。目的の特定の抗PG抗体についての飽和量を算出するための方法は周知である。

【0181】

飽和を保証するために、算出された飽和量より大きい量を投与してもよく、例えば、算

10

20

30

40

50

出された飽和量よりも少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、又はさらには10倍大きい量を投与してもよい。静脈内以外の投与様式のために、量を、当技術分野において周知の通りに、薬物動態及びバイオアベイラビリティに基づいて適応することができる。

#### 【0182】

抗hPG抗体組成物の効果的な用量は、約0.001mg/kg～約250mg/kg/単回(例、ボラス)投与、複数投与又は連続(例、注入)投与の範囲でありうる、あるいは、再発を防止することが求められる癌の型、投与経路、ならびに被験者の年齢、体重、及び状態に依存する本明細書における任意の効果的な範囲又は値でありうる。特定の実施態様において、各用量は約0.1mg/kg～約0.5mg/kg；約0.25mg/kg～約0.75mg/kg；約0.5mg/kg～約1mg/kg；約2mg/kg；約1.5mg/kg～約2.5mg/kg；約2mg/kg～約3mg/kg；約2.5mg/kg～約3.5mg/kg；約3mg/kg～約4mg/kg；約3.5mg/kg～約4.5mg/kg；約4mg/kg～約5mg/kg；約5mg/kg～約7mg/kg；約6mg/kg～約8mg/kg；約7mg/kg～約9mg/kg；約8mg/kg～約10mg/kg；約10mg/kg～約15mg/kg；約12.5mg/kg～約17.5mg/kg；約15mg/kg～約20mg/kg；約17.5mg/kg～約22.5mg/kg；約20mg/kg～約25mg/kg；約22.5mg/kg～約27.5mg/kg；約25mg/kg～約30mg/kg；約30mg/kg～約40mg/kg；約35mg/kg～約45mg/kg；約40mg/kg～約50mg/kg；約45mg/kg～約55mg/kg；約50mg/kg～約60mg/kg；約55mg/kg～約65mg/kg；約60mg/kg～約70mg/kg；約65mg/kg～約75mg/kg；約70mg/kg～約80mg/kg；約75mg/kg～約85mg/kg；約80mg/kg～約90mg/kg；約85mg/kg～約95mg/kg；約90mg/kg～約100mg/kg；約95mg/kg～約105mg/kg；約100mg/kg～約150mg/kg；約125mg/kg～約175mg/kg；約150mg/kg～約200mg/kg；約175mg/kg～約225mg/kg；約200mg/kg～約250mg/kg。他の投与量の範囲も可能である。

#### 【0183】

投与の量、頻度、及び持続時間は、種々の要因(例えば患者の年齢、体重、及び疾患の状態など)に依存する。このように、非限定的な例において、投与のための治療計画は、1日又はそれ以上、2日又はそれ以上、3日又はそれ以上、4日又はそれ以上、5日又はそれ以上、6日又はそれ以上、1週間又はそれ以上、2週間から無制限にわたり、2週間～6ヶ月間、3ヶ月間～5年間、6ヶ月間～1又は2年間、8ヶ月間～18ヶ月間などにわたり継続することができる。場合により、治療計画は、反復投与(例、1日1回、1日2回、2日、3日、5日、1週間、2週間、又は1ヶ月毎)に提供する。反復投与では、同じ用量で又は異なる用量でありうる。投与は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回又はそれ以上反復することができる。抗hPG抗体の治療的に効果的な量は、単回用量として又は治療計画の経過にわたり(例、1週間、2週間、3週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年又はそれより長い経過にわたり)投与することができる。

#### 【0184】

### 8. 実施例

#### 実施例1：転移性結腸直腸癌細胞におけるガストリン遺伝子の発現

この例では、ヒト原発性結腸直腸癌細胞株HT29、HCT116、RKO、SW480、及びDLD1、ならびに転移性結腸直腸癌細胞株SW620及びT84におけるガストリン(GAST)遺伝子の発現を記載する。ヒト原発性結腸直腸腫瘍からの生検サンプルから単離された細胞もテストした(CRC1)。SW620細胞は、元々は、デュークスステージC結腸直腸腺癌と診断された患者のリンパ節転移に由来した。T84細胞は、元々は、結腸直腸癌と診断された患者の肺転移に由来した。

#### 【0185】

### A. 方法

標準的技術を使用して、GAST mRNAの発現は、HT29、HCT116、RKO、SW480、DLD1、SW620、及びT84細胞株のRNA調製物からの定量的RT-PCRを使用して定量した。データを、RKO原発性結腸直腸癌細胞株において見出されたガストリンmRNA発現レベルとの比較で表現する。RKO細胞は、通例、低レ

ベルのプロガストリンを発現する。相対的なガストリン mRNA レベルは対数スケールで報告されていることに留意すること。

【0186】

B. 結果

定量的 RT-PCR により測定したガストリン遺伝子発現レベルを図 1 に示す。検証した全ての原発性及び転移性結腸直腸癌細胞が、ガストリン遺伝子を発現したが、しかし、変動レベルであった。翻訳後プロセッシングを通じて、ガストリン遺伝子産物はプロガストリンに変換されうる。

【0187】

同様の実験を、転移性結腸直腸癌細胞株 Colo-205 を使用して実施したが、しかし、結果は再現可能ではなかった。

【0188】

実施例 2：患者から外科的に切除した原発性及び転移性結腸直腸腫瘍におけるガストリン遺伝子の発現

この実施例では、患者から外科的に切除した対応する原発性及び転移性結腸直腸腫瘍におけるガストリン遺伝子の発現を記載する。

【0189】

A. 方法

原発性及び転移性結腸直腸腫瘍を、適用可能な倫理ガイドラインに従って、患者から外科的に切除した。標準的技術を使用して、RNA を腫瘍組織サンプルから調製し、ガストリン mRNA を定量的 RT-PCR により測定した。転移性腫瘍におけるガストリン mRNA の発現を、同じ患者から取った、対応する原発腫瘍における発現のレベルと比べて標準化した。

【0190】

B. 結果

11 人の患者からの転移性結腸直腸腫瘍において発現されたガストリン mRNA のレベルを、同じ患者からの対応する原発腫瘍における発現と比べて、図 2 に示す。試験した全ての原発性及び転移性結腸直腸腫瘍が、ガストリン遺伝子を発現したが、転移性腫瘍における発現レベルは、対応する原発腫瘍と比べて、異なる患者の間で広範に変動した。

【0191】

実施例 3：転移性癌細胞によるプロガストリンの分泌

この実施例では、3 つの異なる転移性結腸直腸癌細胞によるプロガストリンの分泌の定量化を記載する。

【0192】

A. 方法

細胞を 60%コンフルエンスまで通常のプラスチック 75 cm<sup>2</sup> フラスコ中で成長させた。培地を次に除去し、細胞を、PBS を用いて 1 回リンスした。20 ml の M11 培地（フェノールレッドを伴わない）を次にフラスコに加えて、細胞を追加の 48 時間にわたりインキュベートした。培地を次に回収し、1,000 g で 5 分間にわたり遠心し、細胞デブリを除去し、-80 で凍結した。細胞を次にトリプシン処理し、カウントした。

【0193】

分泌されたプロガストリンを測定するために、凍結した成長培地をゆっくりと氷上で解凍し、次に、タンパク質コンセントレータ（Icon, Pierce）を使用して、2,500 g で 45 分間にわたる遠心により容積 500 μl まで 40 倍濃縮した。プロガストリン濃度を、次に、サンドイッチ ELISA 技術を使用して測定した。

【0194】

B. 結果

図 3 は、3 つの転移性結腸直腸癌細胞株により調整された培地中でのプロガストリンの濃度を示す。データを、プロガストリン濃度 (pM) / 100 万個の細胞 / 48 時間の成長として表現する。この実験において、Colo-205 細胞は、使用されるアッセイの検

10

20

30

40

50

出限界内でPGを産生しなかった。

【0195】

実施例4：原発性及び転移性結腸直腸癌と診断された患者における血漿及び血清プロガストリン濃度

この実施例では、原発性結腸直腸癌及び無転移を伴う患者、転移性結腸直腸癌を伴う患者、及び原発腫瘍を外科的に除去された転移性結腸直腸癌を伴う患者におけるプロガストリンの血漿及び血清レベルの定量化について記載する。

【0196】

C. 方法

血漿又は血清プロガストリン濃度を、コントロールとして健常個人において、及び結腸直腸癌を伴う患者において測定した。健常コントロールサンプル(N=104)を血液バンクから得た。結腸直腸癌患者は3群を構成した。第1に、サンプリング時に原発癌と診断された転移を伴わない患者(T+M-; n=16)。第2に、サンプリング時に転移性疾患と診断された患者(T+M+; n=24)。及び、第3に、サンプリング時に転移性疾患と診断された患者であって、しかし、それらから、原発腫瘍は外科的に切除されていなかった(T-M+; n=46)。転移性疾患を伴う患者の大多数(即ち、24人のT+M+患者の15人及び46人のT-M+患者の41人)が、サンプリング時に化学療法を受けていた、又は、ちょうど受けた。

10

【0197】

血漿又は血清プロガストリンレベルの定量化は、以下に予言的に記載するものと同様のプロガストリン特異的サンドイッチELISA技術を使用して実施した。

20

【0198】

Nunc MaxiSORP 96ウェルプレートのウェルを、以下の通りに第1プロガストリン特異的抗体を用いてコーティングする。プロガストリンのカルボキシ末端領域について特異的な抗プロガストリンポリクローナル抗体を、MilliQ水中の50mM, pH 9.6炭酸/重炭酸ナトリウム緩衝液の溶液中に、濃度3µg/mlまで希釈する。合計100µlの抗体溶液を、次に、96ウェルプレートの各ウェルに加えて、4で一晚インキュベートする。結合後、抗体溶液をウェルから除去し、それらを次に、100µl洗浄緩衝液(1xPBS/0.1% TWEEN-20)を用いて3回洗浄する。合計100µlのブロッキング緩衝液(1xPBS/0.1% TWEEN-20/0.1% BSA)を次に各ウェルに加えて、22で2時間にわたりインキュベートする。ブロッキング緩衝液を次に除去し、ウェルを、洗浄緩衝液を用いて3回洗浄する。患者から単離された血漿又は血清サンプルを、ウェルに、容積100µl中の希釈系列(典型的には1:1、1:2、1:5、及び1:10希釈)において加えて、次に、22で2時間にわたりインキュベートする。血漿又は血清サンプルを2通りに分析する。

30

【0199】

アッセイは、また、2つの標準曲線を含む。第1の標準曲線を、組換えプロガストリンの希釈物を使用して、最終量1ng、0.5ng、0.25ng、0.1ng、0.05ng、0.01ng、及び0ng/ウェルに調製する。第2の標準曲線は、陰性コントロールとしての役割を果たし、テストサンプルと同じ希釈で(即ち、1:1、1:2、及び1:10)、ブロッキング緩衝液中に希釈したプロガストリン陰性ヒト血清から調製する。あるいは、血漿サンプルをアッセイしている場合、第2の標準曲線は、陰性コントロールとしての役割を果たし、テストサンプルと同じ希釈で(即ち、1:1、1:2、及び1:10)、ブロッキング緩衝液中に希釈したプロガストリン陰性ヒト血漿から調製する。

40

【0200】

血漿又は血清サンプルを用いたインキュベーションが完了した後、ウェル内容物を除去し、洗浄緩衝液(100µl/ウェル)を用いて3回洗浄し、その後、第1抗体に結合したプロガストリンを、プロガストリンについて特異的な第2抗体を使用して、以下の通りに検出する。

【0201】

50

プロガストリンのアミノ末端領域について特異的なビオチン結合抗プロガストリンポリクローナル又はモノクローナル抗体を、ブロッキング緩衝液中で、濃度 0.1 ~ 10 µg/ml まで、抗体に依存して希釈する。合計 100 µl の抗体溶液を次に各ウェルに加えて、22 で 1 時間にわたりインキュベートする。

【0202】

第 2 抗体結合が完了した後、プレートを、洗浄緩衝液 (100 µl/ウェル) を用いて 3 回洗浄し、その後、100 µl のストレプトアビジン - HRP 溶液 (ブロッキング緩衝液中 25 ng/ml) を各ウェルに加えて、22 で 1 時間にわたりインキュベートする。ストレプトアビジン - HRP 溶液を用いたインキュベーションが完了した後、プレートを、洗浄緩衝液 (100 µl/ウェル) を用いて 3 回洗浄する。その後、Pierce SuperSignal E LISA Femto Maximum Sensitivity Chemiluminescent Substrate キットを使用して調製した 100 µl の化学発光基質を 1 ウェル当たりに加え、暗所に室温で 5 分間にわたりインキュベートし、ルミノメーターで読み込む。

10

【0203】

ルミノメーターの読み取りに基づき、線形回帰分析を使用して、標準曲線データに対応する線の等式を導く。この等式を使用して、種々の患者サンプル中でのプロガストリンの濃度を次に算出する。

【0204】

D. 結果

図 4 のボックスプロットは、健常コントロールと比較した、アッセイされた結腸直腸癌患者の 3 群における血清プロガストリン濃度の 25 パーセントイル、中央値、及び 75 パーセントイル血漿を示す。ウィスカーは、血漿又は血清プロガストリン濃度の 5 及び 95 パーセントイルを示す。T+又はT-は、それぞれ、原発腫瘍がまだその場所ある又は切除されていることを示す；M+又はM-は、それぞれ、転移が患者において検出された又は検出されなかったことを示す。表 4 は、生データの統計分析の要約を含む。

20

【0205】

このデータは、原発性及び転移性の両方の結腸直腸癌を伴う患者が、健常個人と比較して、それらの血漿又は血清中のプロガストリンの上昇レベルを有していたことを実証する。また、プロガストリンレベルは、原発腫瘍が外科的に除去された転移性結腸直腸癌を伴う患者において上昇したままである。これは、結腸直腸転移がそのような患者においてプロガストリンを産生することを示唆する。

30

【0206】

【表 6】

表 4				
分析した表	CRC 患者における PG			
クラスカル・ワリス検定				
P 値	< 0.0001			
正確な又は適切な P 値?	ガウス近似			
P 値の要約	***			
中央値は有意に変動するのか (P < 0.05)	はい			
群の数	4			
クラスカル・ワリス統計	33,86			
ダンの多重比較検定	順位和における差		有意? P < 0.05?	要約
T+M- 患者対コントロール (血液バンク)	51,45		はい	***
T+M+ 患者対コントロール (血液バンク)	50,41		はい	***
T-M+ 患者対コントロール (血液バンク)	37,42		はい	***

10

## 【 0 2 0 7 】

20

実施例 5 : 培養中の SW 6 2 0 転移性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンポリクローナル抗体の効果

この実施例では、培養中の SW 6 2 0 ヒト転移性結腸直腸癌細胞株の成長に対する抗 h P G ポリクローナル抗体の効果に記載する。

## 【 0 2 0 8 】

## A . 方法

SW 6 2 0 細胞を 6 ウェルプレート中に播種し、一晚、血清飢餓させ、次に、12 時間毎に PBS、3 マイクログラム/ml コントロール抗体 (ポリクローナルウサギ抗ヒト Ig G, Affinity BioReagents, Ref #SA1-600) 又は抗 P G ポリクローナル抗体を用いて処理した。実験を 2 通りに行い、技術者は、処理溶液の内容物に関して盲検化された。処置の開始から 72 時間後、各ウェル中の生存細胞の数を 3 回カウントした。

30

## 【 0 2 0 9 】

## B . 結果

図 5 に示す通り、抗 P G ポリクローナル抗体を用いた処理によって、72 時間の期間にわたり SW 6 2 0 細胞の成長における 43.5% 減少を起こした (p = 0.0294、マンホイットニー検定; n = 2)。この実験の結果は、P G に対するポリクローナル抗体が、インピトロでの転移性結腸直腸癌細胞の成長を低下させるために効果的であることを実証する。

## 【 0 2 1 0 】

実施例 6 : 培養中の SW 6 2 0 転移性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果

40

この実施例では、培養中の SW 6 2 0 ヒト転移性結腸直腸癌細胞株の成長に対する抗 h P G モノクローナル抗体の効果に記載する。

## 【 0 2 1 1 】

## A . 方法

SW 6 2 0 細胞を 6 ウェルプレート中に播種し、一晚、血清飢餓させ、次に、12 時間毎に PBS、3 マイクログラム/ml コントロール抗体 (マウス抗ヒト Ig G 1, Calbiochem, Ref #411451) 又は 4 つの異なる抗 P G モノクローナル抗体 MA b 3、MA b 4、MA b 2、及び MA b 1 を用いて処理した。実験を 2 通りに行い、技術者は、処理溶液の内容物に関して盲検化された。処置の開始から 48 時間後、各ウェル中の生存細胞の数を 6

50

回カウントし、平均した。

【 0 2 1 2 】

別々の実験において、SW620細胞を6ウェルプレート中に播種し(100,000個細胞/ウェル)、上と同様に、5µg/mlの抗hPGモノクローナル抗体5-23(即ち、MAb5-MAb23)又は5µg/mlのコントロール抗体を用いて処理した。48時間後、生存可能な細胞の数をカウントし、そこから、実験の開始時の細胞の数(即ち、T0)を引いた。特定の抗体処理ウェル中の生存細胞の数を、次に、コントロールのパーセンテージとして表現した。

【 0 2 1 3 】

B. 結果

SW620細胞を、MAb1-MAb4を用いて処理した結果(図6Aに示す)を、実験の終了時での平均細胞数/ウェル-実験の開始時に播種した細胞数として算出した。生の数値及び統計値(マンホイットニー検定)を表5に示す。この実験の結果は、PGに対する異なるモノクローナル抗体が、コントロール抗体と比較して、インビトロでSW620転移性結腸直腸癌細胞の成長を低下させるために効果的であることを実証する。結果は、また、PGに対する全てのモノクローナル抗体が、コントロール抗体と比較して、細胞の成長を低下させるために効果的であったが、2つの抗体MAb3及びMAb4は、他よりも効果的であったことを示す。

【 0 2 1 4 】

【表7】

表 5		
抗体処理	細胞数	p 値 (処理対 CTMab)
CT 抗体-T0	158556	
MAb3-T0	50056	0.0009
MAb4-T0	52984	0.0014
MAb2-T0	115056	0.0156
MAb1-T0	108056	0.0009

【 0 2 1 5 】

SW620細胞を、MAb5-MAb23(それらの各々がhPGに特異的に結合することが可能である)を用いて処理した結果を、図6Bに示す。結果が実証する通り、非特異的コントロール抗体と比較して、テストされた抗hPGモノクローナル抗体は、培養中のSW620転移性結腸直腸癌細胞株の成長を阻害するための有効性の範囲を示す。

【 0 2 1 6 】

MAb3を用いてColo-205転移性結腸直腸癌細胞を処理することの成長に対する効果を決定するための関連実験を実施したが、しかし、結果は再現可能ではなかった。

【 0 2 1 7 】

実施例7: 培養中のT84転移性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果

この実施例では、培養中のT84ヒト転移性結腸直腸癌細胞株の成長に対する抗hPGモノクローナル抗体の効果を記載する。

【 0 2 1 8 】

A. 方法

この実験のために用いられた方法は、使用された抗プロガストリン抗体が抗hPG MAb3であったことを除き、SW620細胞に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果を測定するために使用されたものと同様であった。

【 0 2 1 9 】

B. 結果

10

20

30

40

50

結果（図 7 に示す）を、実験の終了時での平均細胞数 / ウェル - 実験の開始時に播種した細胞数として算出した。統計分析の要約を表 6 に示す。この実験の結果は、抗 h P G M A b 3 が、コントロール抗体と比較して、インビトロでの T 8 4 転移性結腸直腸癌細胞の成長を低下させるために効果的であることを実証する。

【 0 2 2 0 】

【表 8】

表 6	
分析した表	T84 細胞
カラム E	CT MAb - T0
vs	vs
カラム F	抗 hPG MAb3 - T0
マンホイットニー検定	
P 値	0.0370
正確な又は適切な P 値?	ガウス近似
P 値の要約	*
中央値は有意に異なるか? (P < 0.05)	はい
片側又は両側 P 値?	両側
カラム E, F における順位和	52.50, 25.50
マンホイットニー U	4,500

10

20

【 0 2 2 1 】

M A b 3 を用いて C o l o - 2 0 5 転移性結腸直腸癌細胞を処置することの成長に対する効果を決定するための関連実験を実施したが、しかし、結果は再現可能ではなかった。

【 0 2 2 2 】

実施例 8 : S W 6 2 0 細胞異種移植片によるヌードマウスにおける肝転移の形成に対する抗プロガストリンポリクローナル抗体の効果

この実施例では、ヌードマウス中への移植後に肝臓転移を形成する S W 6 2 0 細胞の能力に対する抗 P G ポリクローナル抗体の効果が記載される。

30

【 0 2 2 3 】

A . 方法

合計  $5 \times 10^6$  個の S W 6 2 0 細胞を、6 週齢の 3 1 匹の B A L B c / ヌードマウスの各々の脾臓中に注射した。細胞の注射から 2 分後、脾臓を外科的に除去した。4 日間の回復後、マウスを無作為に 3 群に分け、その各々を 3 つの異なる処置の 1 つに供した。具体的には、1 1 匹のマウスに、P B S を用いて注射し、1 0 匹に、P B S 中に希釈したコントロール抗体を用いて注射し、1 0 匹のマウスに、抗 P G ポリクローナル抗体（また P B S 中に希釈した）を用いて注射した。抗体の用量は、容積 1 5 0 マイクロリットル中 8 mg / kg であった。注射を腹腔内に 6 週間にわたり 2 回 / 週行った。6 週間後、注射のコースが終わった後、マウスを、二酸化炭素を用いて安楽死させ、肝臓を除去し、存在する目に見える転移の数をカウントした。肝臓及び転移もパラフィン包埋及び免疫組織化学分析のために調製した。

40

【 0 2 2 4 】

B . 結果

抗 h P G ポリクローナル抗体を用いて処置したマウスから目に見える転移を伴わない肝臓の写真を図 8 A に示す。コントロールポリクローナル抗体を用いて処置したマウスからの目に見える転移を伴う肝臓の写真を図 8 B に示す。表 7 は、抗 h P G ポリクローナル抗体を用いて処置したマウスからの各肝臓においてカウントされた転移の数を示す。表 8 は、コントロールポリクローナル抗体を用いて処置したマウスからの各肝臓においてカウントされた転移の数を示す。表 9 は、P B S を用いて処置したマウスからの各肝臓において

50

カウントされた転移の数を示す。図 9 は、転移の数対治療群のグラフィカルな表示である。

【 0 2 2 5 】

【 表 9 】

マウス	体重 (g)	肝臓転移の数
0	20.1	0
1	17.7	2
2	17.3	0
3	21.2	0
4	19.9	0
5	19.9	3
6	17.0	0
7	18.1	0
8	16.7	2
9	16.6	1

10

【 0 2 2 6 】

【 表 1 0 】

マウス	体重 (g)	肝臓転移の数
10	17.0	0
11	18.0	2
12	19.9	1
13	17.2	0
14	18.2	1
15	17.8	3
16	17.9	10
17	17.9	0
18	17.0	1
19	16.0	1

20

30

【 0 2 2 7 】

【表 1 1】

マウス	体重 (g)	肝臓転移の数
20	20.1	7
21	19.3	0
22	19.2	0
23	18.7	1
24	18.8	1
25	16.5	0
26	19.3	0
27	19.1	1
28	18.0	0
29	18.8	5
30	17.8	3

10

## 【0 2 2 8】

組織学的分析では、両方のコントロール群からの肝臓切片における微小転移の存在が明らかになったが、それらは、抗hPG抗体を用いて処置した動物の肝臓から得られた切片中には存在しなかった。コントロール動物の肝臓内の血管において検出された微小転移の例を、図10に描写する顕微鏡写真に示す。

20

## 【0 2 2 9】

この実施例における結果は、SW620細胞（結腸直腸癌転移性細胞株）を用いて移植したヌードマウスの抗hPG抗体を用いた処置が、コントロール抗体又は媒体単独を受けたマウスと比較して、目に見える肝臓転移の総数が低下したことを実証する。低下の程度は統計的有意性に達しなかったが、数値データにおける傾向、ならびに抗hPG抗体処置マウスの肝臓における微小転移の非存在は、PG抗体が、このモデルシステムにおいて結腸直腸癌の転移の発生率を低下させるのに効果的であることを示唆する。

## 【0 2 3 0】

実施例9：SW620細胞異種移植片によるヌードマウスにおける肝臓転移の形成に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果

30

この実施例では、ヌードマウス中への移植後に肝臓転移を形成するSW620細胞の能力に対する抗PGモノクローナル抗体の効果が記載される。

## 【0 2 3 1】

## A. 方法

合計  $5 \times 10^6$  個のSW620細胞を、5週齢の20匹のBALB/c/ヌードマウスの各々の脾臓中に注射した。細胞の注射から2分後、脾臓を外科的に除去した。回復後、マウスを無作為に2群に分け、その各々を2つの異なる処置の1つに供した。具体的には、10匹のマウスに、PBS中に希釈したコントロール抗体（抗ヒトIgG1Fc）を用いて注射し、10匹のマウスに、抗hPGモノクローナル抗体MAb3（またPBS中に希釈した）を用いて注射した。抗体の用量は、容積150マイクロリットル中8mg/kgであった。注射を腹腔内に6週間にわたり2回/週行った。1週間に1回、各マウスの体重を量った。6週間後、注射のコースが終わった後、マウスを、二酸化炭素を用いて安楽死させ、肝臓を除去し、存在する目に見える転移の数をカウントした。

40

## 【0 2 3 2】

## B. 結果

結果を図11に示す。転移の平均数は、コントロール抗体を投与されたマウスにおいて7.3であり、抗hPGモノクローナル抗体MAb3を用いて処置されたマウスにおいて4.3であった。これは41%の減少に対応し、 $p = 0.0372$ で統計的に有意である。統計分析を以下の表10に示す。処置マウスにおける肝臓転移の平均重量は、また、コ

50

ントロールマウスにおける 167 mgと比較して、96 mgに減少したが、この差は統計的な有意性に達するように算出されなかった。

【0233】

【表12】

表 10	
分析した表	転移の数
カラム A	CtrlMab
vs	vs
カラム B	MAb3
マンホイットニー検定	
P 値	0,0372
正確な又は適切な P 値?	ガウス近似
P 値の要約	*
中央値は有意に異なるか? (P < 0.05)	はい
片側又は両側 P 値?	片側
カラム A,B における順位和	129, 81
マンホイットニー-U	26,00

10

【0234】

実施例 10 : 結腸直腸癌細胞における LGR5 の発現は、低付着培養条件下での成長により増加する。

この実施例では、結腸直腸癌細胞株での結腸幹細胞表面マーカー LGR5 の発現に対する低付着培養条件下での成長の効果を記載する。テストした細胞は、原発性結腸直腸癌及び転移性結腸直腸癌細胞株からの細胞、ヒト原発性結腸直腸癌から得られた生検サンプルからの細胞を含んだ。低付着培養条件は、スフェロイドとしての癌幹細胞の成長のために濃縮し、結腸直腸癌幹細胞のための有用なアッセイツールを提供することができる。

【0235】

A. 方法

テストした細胞は、原発性結腸直腸癌細胞株 HT29 及び HCT116、及び転移性結腸直腸癌細胞株 SW620 及び T84 からであった。

【0236】

ヒト原発性結腸直腸腫瘍からの生検サンプルから単離された細胞も、以下の通りにテストした (CRC1)。生検サンプルを無菌ハンス平衡塩類 (HBSS) 中で数回リンスし、次に HBSS 中の 0.4% 次亜塩素酸ナトリウム溶液中で、室温で 30 分間にわたり置いた。HBSS 中でのいくつかのさらなるリンス後、生検を、メスの刃を使用して 1mm 小片に切断し、リンスした。小片を、次に、20 分毎に 1 回の緩やかな攪拌を伴い、50% Accumax 溶液において、強い抗生物質及びグルコースを含む M11 培地 (20 ng/ml EGF、10 ng/ml FGF、20 µg/ml インスリン、N2 サプリメント、2 µg/ml シプロフラキシン (ciprofloxacin)、5 µg/ml ゲンタマイシン、及び 3 µg/ml グルコースを伴う DMEM/F12) 中で、37 °C で 1 時間にわたりインキュベートした。これらの消化サンプルを含む Accumax 溶液を、次に、100 マイクロメートルのふるいで濾過した。生存率を、トリパンブルー技術を使用して、濾過溶液の小さな一定分量で決定した。この溶液を、次に、200 g で 10 分間にわたり遠心し、ペレットを、Accumax 反応を停止するために、10% FBS を含む 2 ml の M11 培地中に再懸濁した。細胞を、次に、Corning 超低付着フラスコ中で数日間にわたりインキュベートし、次に、さらなる増幅のための FBS を伴わない M11 培地中に移した。CRC1 サンプルからの細胞を数週間にわたり増幅させ、実験を実施する前に 1 回凍結 / 解凍した。

【0237】

細胞を、2 つの異なる培養条件下で成長させた。第 1 に、細胞を、哺乳動物細胞の成長

20

30

40

50

のための標準的プラスチックカルチャウェア（表面への細胞付着を促進する）において成長させた。具体的には、200,000個の細胞を、75cm<sup>2</sup>フラスコ（Corning）中に、DMEM + 5%ウシ胎児血清（FBS） + 100U/mlペニシリン + 100U/mlストレプトマイシン中に播種した。

#### 【0238】

第2に、細胞を、低付着カルチャウェア（哺乳動物細胞は、典型的には、不十分に付着する又は全く付着しない）において成長させた。具体的には、30,000個の細胞を、超低付着性75cm<sup>2</sup>フラスコ（Corning）において、M11培地（20ng/ml EGF、10ng/ml FGF、20μg/mlインスリン、N2サプリメント、2μg/mlシプロフラキシン（cycloproflaxin）、5μg/mlゲンタマイシン、及び3μg/mlグルコースを伴うDMEM/F12）中で成長させた。成長の期間後、細胞を、FACS解析前に、Accumax（Innovative Cell Technologies, Inc.）を使用して、37℃で45分間にわたり単一細胞懸濁液に再懸濁及び脱凝集した。標準的な技術を使用して、細胞を、その後、細胞表面マーカーLGR5（Abgent, Inc.）のN末端領域への抗体を用いて染色し、FACSにより選別し、マーカーを発現する細胞のパーセンテージを決定した。全ての実験を3回実施した。

10

#### 【0239】

##### B. 結果

2つの培養条件下での細胞の成長に起因するLGR5発現結腸直腸癌細胞の相対的なパーセンテージを図12に示す。テストした全ての細胞株について、LGR5発現細胞のパーセンテージは、細胞が、従来の条件（灰色バー）下での成長と比較して、低付着培養条件（黒色バー）下でスフェロイドとして成長させた場合により大きかった。パターンは、原発性結腸直腸癌細胞株（HT29及びHCT116）、ならびに転移性結腸直腸癌細胞株（SW620及びT84）に由来する細胞について同様であった。

20

#### 【0240】

ヒト原発性結腸直腸癌の生検から得られたCRC1細胞は、低付着培養条件下で成長させた場合、また、LGR5を発現した。この特定の実験において、CRC1細胞は従来の付着性条件下でうまく成長しなかったため、しかし、細胞を付着性対非付着性条件下で成長させた場合、LGR5発現レベルを直接的に比較することは可能ではなかった。

#### 【0241】

実施例11：ガストリン遺伝子の発現は、低付着培養条件下での結腸直腸癌細胞の成長により増加する

30

この実施例では、原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株、ならびに低付着培養条件下で成長させたヒト原発性結腸直腸癌から得られた生検サンプルからの細胞におけるガストリン遺伝子の発現に対する効果について記載する。そのような成長条件によって癌幹細胞が濃縮される。

#### 【0242】

##### A. 方法

テストした細胞は、原発性結腸直腸癌細胞株HT29、HCT116、RKO、SW480、及びDL1、ならびに転移性結腸直腸癌細胞株SW620及びT84からであった。ヒト原発性結腸直腸腫瘍からの生検サンプルから単離された細胞もテストした（CRC1）。細胞を、2つの異なる培養条件下で成長させた。第1に、細胞を、哺乳動物細胞の成長のための従来のカルチャウェア（プラスチック表面への細胞付着を促進する）において、上に記載する通りに成長させた。第2に、細胞を、また、低付着カルチャウェア（哺乳動物細胞は、典型的には、不十分に付着する）において成長させた。成長の期間後、細胞を再懸濁及び溶解し、mRNAを、標準的技術を使用して単離した。ガストリン遺伝子の発現を、次に、標準技術に従って定量的RT-PCRを使用して測定した。各実験を3回反復した。

40

#### 【0243】

##### B. 結果

50

従来の低付着培養条件下でテストした異なる細胞において発現されるガストリン mRNA の相対的レベルを図 1 3 に報告する。レベルを、R K O 原発性結腸直腸癌細胞株において発現されるガストリン mRNA の量と比べて標準化した。R K O 細胞は、通例、低レベルのプロガストリンを発現する。相対的なガストリン mRNA レベルは対数スケールで報告されていることに留意すること。テストした全ての細胞株 (R K O 細胞を除く) について、ガストリン遺伝子発現は、細胞が、従来の条件 (灰色バー) 下での成長と比較して、低付着培養条件 (黒色バー) 下で成長させた場合により高かった (時折、何倍もより高かった)。パターンは、原発性結腸直腸癌細胞株、ならびに転移性結腸直腸癌細胞株に由来する細胞について同様であった。

#### 【0244】

実施例 1 2 : 低付着培養条件において成長させた結腸直腸癌細胞は、プロガストリントタンパク質を発現する

この実施例では、原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株、ならびに低付着培養条件下で成長させたヒト原発性結腸直腸癌から得られた生検サンプルからの細胞におけるプロガストリントタンパク質の発現について記載する。そのような成長条件によって癌幹細胞が濃縮される。

#### 【0245】

##### A . 方法

テストした細胞は、原発性結腸直腸癌細胞株 H T 2 9、及び転移性結腸直腸癌細胞株 S W 6 2 0 及び T 8 4 からであった。ヒト原発性結腸直腸腫瘍からの生検サンプルから単離された細胞もテストした (C R C 1)。細胞を低付着カルチャウェアにおいて M 1 1 培地 (フェノールレッドを伴わない) 中で成長させた。4 8 時間後、培地を回収し、1, 0 0 0 g で 5 分間にわたり遠心し、細胞デブリを除去し、- 8 0 °C で凍結した。細胞を、Accu max を使用して脱凝集し、カウントした。分泌されたプロガストリンを測定するために、凍結した培地を氷上で解凍し、次に、タンパク質コンセントレータ (Icon, Pierce) を使用して、2, 5 0 0 g で 4 5 分間にわたる遠心により容積 5 0 0 μ l まで 4 0 倍濃縮した。プロガストリン濃度を、次に、サンドイッチ E L I S A 技術を使用して測定した。各実験を 2 回反復した。

#### 【0246】

##### B . 結果

低付着培養条件下での 4 8 時間の成長後に結腸直腸癌細胞により成長培地中に分泌されたプロガストリンの濃度を図 1 4 に示す。テストした全ての細胞 (1 つの原発性結腸直腸癌細胞株、2 つの転移性結腸直腸癌細胞株、及びヒト原発性結腸直腸癌から得られた生検サンプルからの細胞を含む) は、低付着培養条件においてスフェロイドとして成長させた場合、プロガストリンを分泌した。しかし、S W 6 2 0 細胞は、試験下の他の細胞株よりも実質的に少ないプロガストリンを分泌した。データを、プロガストリン濃度 (pM) / 1 0 0 万個細胞 / 4 8 時間の成長として表現した。

#### 【0247】

実施例 1 3 : 低付着培養条件下でのスフェロイドとしての原発性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンポリクローナル抗体の効果

この実施例では、原発性結腸直腸癌細胞株、ならびに低付着培養条件下で成長させたヒト原発性結腸直腸癌から得られた生検サンプルからの細胞のスフェロイドとしての成長に対する抗プロガストリンポリクローナル抗体の効果について記載する。そのような成長条件によって癌幹細胞が濃縮される。

#### 【0248】

##### A . 方法

テストした細胞は、原発性結腸直腸癌細胞株 H T 2 9 及び H C T 1 1 6、ならびにヒト原発性結腸直腸腫瘍 (C R C 1) からの生検サンプルから単離された細胞からであった。細胞を、低付着 9 6 ウェルプレート (Corning) のウェルにおいて、M 1 1 培地 (2 0 ng/ml E G F、1 0 ng/ml F G F、2 0 μ g/ml インスリン、N 2 サプリメント、2 μ g/ml

10

20

30

40

50

シプロフラキシン ( c y p r o f l a x i n )、5  $\mu$ g/mlゲンタマイシン、及び3  $\mu$ g/mlグルコースを伴うDME M / F 1 2 ) 中に播種した。HT 2 9 及びHCT 1 1 6 細胞について、100  $\mu$ l中の合計500個の細胞を、3ウェル/処理条件の各々に加えたのに対し、CRC 1 細胞について、100  $\mu$ l中の合計500個の細胞を、10ウェル/処理条件の各々に加えた。24時間毎に、細胞を、3  $\mu$ g/mlのポリクローナル抗プロガストリン抗体、又はコントロール抗体 ( ポリクローナルウサギ抗ヒトI g G、Affinity BioReagents, Ref #SA1-600 ) を用いて処理した。HT 2 9 及びHCT 1 1 6 細胞について10日間の処理、ならびにCRC 1 細胞について14日間の処理後、各ウェル中の細胞スフェロイドの数をカウントし、1ウェル当たりの平均を算出した。実験を実施する技術者は、テストされている抗体溶液の内容物に関して盲検化された。各実験を2回反復した。

10

【0249】

## B . 結果

図15~17に示す通り、コントロール抗体と比較して、抗プロガストリンポリクローナル抗体は、低付着培養条件下で成長させた原発性結腸直腸癌細胞により形成された細胞スフェロイドの数を実質的に低下させた。

【0250】

実施例14：低付着培養条件下でのスフェロイドとしての原発性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果

この実施例では、そのような細胞を低付着培養条件下で成長させた場合での2つの原発性結腸直腸癌細胞株からのLGR 5 陽性細胞のスフェロイドとしての成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果を記載する。そのような成長条件によって癌幹細胞が濃縮される。

20

【0251】

## A . 方法

テストした細胞は原発性結腸直腸癌細胞株HT 2 9 及びHCT 1 1 6 からであった。細胞を、最初に、FACS ( FACSaria, BD Biosciences ) により選別し、癌幹細胞マーカーLGR 5 を発現する細胞を単離した。FACSのために、 $2 \times 10^6$ 個のHT 2 9 細胞を選別し、 $1 \times 10^6$ 個のHCT 1 1 6 細胞を選別した。細胞を、2mg /  $1 \times 10^6$ 個細胞のLGR 5 のN末端について特異的な抗体 ( Abgent, Inc., No.AP2745A ) を用いて標識した。FACS後、LGR 5 陽性細胞を、低付着96ウェルプレートの30ウェルにおいて、密度10個細胞/ウェルで、100  $\mu$ lのM11培地 ( 20ng/ml EGF、10ng/ml FGF、20  $\mu$ g/mlインスリン、N2サプリメント、2  $\mu$ g/mlシプロフラキシン ( c y p r o f l a x i n )、5  $\mu$ g/mlゲンタマイシン、及び3  $\mu$ g/mlグルコースを伴うDME M / F 1 2 ) 中に蒔いた。14日間にわたり24時間毎に、細胞を、0.3  $\mu$ g/mlの2つの異なる抗プロガストリンモノクローナル抗体 ( MA b 2 及びMA b 3 ) の1つ、又はコントロールモノクローナル抗体 ( モノクローナルマウス抗ヒトI g G 1、Calbiochem, Ref #411451 ) を用いて処理した。処理の終了時、各抗体型の存在において形成された細胞スフェロイドの数をカウントした。細胞を、次に、追加の17日間成長することを許し、その間に、培地を、さらなる抗体処理を伴わず、毎週新しくした。実験を実施する技術者は、テストされている抗体溶液の内容物に関して盲検化された。

30

40

【0252】

## B . 結果

図18A及び図19Aにそれぞれ示す通り、2つの原発性結腸直腸癌細胞株 ( HCT 1 1 6 及びHT 2 9 ) からLGR 5 陽性細胞がスフェロイドとして14日間にわたり低付着培養において成長する能力は、コントロールモノクローナル抗体と比較して、プロガストリンに対する2つの別々のモノクローナル抗体を用いた処理により低下した。

【0253】

さらに、図18B及び19Bに示す通り、スフェロイドの数は、HCT 1 1 6 及びHT 2 9 細胞の17日間にわたる外因的に加えられた抗体の非存在における培養中でのさらなるインキュベーション後に増加しなかった。このデータは、抗hPG抗体による球形成の

50

抑制が、特定の抗体を除去した後でさえ継続していることを意味する。

【0254】

実施例15：低付着培養条件下でのスフェロイドとしての原発性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果

この実施例では、そのような細胞を低付着培養条件下で成長させた場合でのCRC1細胞のスフェロイドとしての成長に対する4つの異なる抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果を記載する。そのような成長条件によって癌幹細胞が濃縮される。

【0255】

A. 方法

CRC1細胞は、標準的な手順に従って、ヒト結腸癌生検から得られた。Accumax (Sigma) 中での37℃で45分間にわたり解離させた後、細胞を、低付着96ウェルプレート (Corning) において、密度100個細胞/ウェルで、M11培地 (20 ng/ml EGF、10 ng/ml FGF、20 µg/ml インスリン、N2 サプリメント、2 µg/ml シプロフラキシン (cyproflaxin)、5 µg/ml ゲンタマイシン、及び3 µg/ml グルコースを伴うDMEM/F12) 中に蒔いた。各処理群について、10ウェルを使用した。

10

【0256】

第1日に開始し、細胞を、4つの異なる抗プロガストリンモノクローナル抗体MAb5、MAb8、MAb13、又はMAb16 (3 µg/ml) の1つ又は同じ濃度のモノクローナル抗体P3X63Ag8 (ATCC, Ref TIB-9) 又はコントロールとして抗体を加えていない培地を用いて1日2回処理した。その後、処理を8日間にわたり1日1回実施した。球を、その後のカウントのために毎日写真撮影した。全ての実験を盲検化様式で行った。実験の終了時、各処理群からのスフェロイドの数をカウントした。

20

【0257】

B. 結果

結果を図20に示す。テストした抗hPGモノクローナル抗体の各々が、低付着培養条件において原発性結腸直腸癌細胞により形成されたスフェロイドの数を低下させるために効果的であった。非特異的モノクローナル抗体及び培地単独と比較して、テストした全ての抗体についての阻害効果は、ボンフェローニの事後検定を用いた一元配置ANOVAを使用し、 $p < 0.05$ で統計的に有意であった。MAb5、MAb8、及びMAb13が全てhPGのC末端エピトープを認識するのに対し、MAb16はhPGのN末端エピトープに結合する。

30

【0258】

実施例16：低付着培養条件下でのスフェロイドとしての転移性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果

この実施例では、そのような細胞を低付着培養条件下で成長させた場合での転移性結腸直腸癌細胞株からのALDH1陽性細胞のスフェロイドとしての成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体の効果を記載する。

【0259】

A. 方法

テストした細胞は、転移性結腸直腸癌細胞株T84からであった。細胞を、最初に、FACS (FACSaria, BD Biosciences) により選別し、ALDEFUORキット (Stemcell Technologies) を使用して癌幹細胞マーカーALDH1を発現する細胞を単離した。FACS後、ALDH1陽性細胞 (即ち、検出可能なALDH1酵素活性を示す細胞) を、低付着96ウェルプレートのウェルにおいて、密度100個細胞/ウェルで、100 µlのM11培地 (20 ng/ml EGF、10 ng/ml FGF、20 µg/ml インスリン、N2 サプリメント、2 µg/ml シプロフラキシン (cyproflaxin)、5 µg/ml ゲンタマイシン、及び3 µg/ml グルコースを伴うDMEM/F12) 中に蒔いた。11日間にわたり24時間毎に、細胞を、3つの異なる濃度 (0.01 µg/ml、0.1 µg/ml、又は1 µg/ml) の1つの抗プロガストリンモノクローナル抗体 (MAb3)、又は1 µg/mlのコントロールモノクローナル抗体 (モノクローナルマウス抗ヒトIgG1, Calbiochem, Ref #411451

40

50

)を用いて処理した。処理の終了時、各抗体の存在において形成された細胞スフェロイドの数をカウントした。実験を実施する技術者は、テストされている抗体溶液の内容物に関して盲検化された。

【0260】

#### B. 結果

図21に示す通り、T84転移性結腸直腸癌細胞株からのALDH1陽性細胞が低付着培養においてスフェロイドとして成長する能力は、コントロールモノクローナル抗体と比較して、プロガストリンに対するモノクローナル抗体を用いた処理により用量依存的な様式で低下した。

【0261】

実施例17：低付着培養条件下でのスフェロイドとしての原発性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた前処理の効果

この実施例では、細胞を低付着培養条件に移した場合、スフェロイドとしての従来の培養条件下でのALDH1陽性CRC1細胞の成長に対する4つの異なる抗プロガストリンモノクローナル抗体を使用した前処理の効果を記載する。

【0262】

#### A. 方法

CRC1細胞は、標準的な手順に従って、ヒト結腸癌生検から得られた。37で45分間にわたりAccumax (Sigma)中で解離された後、CRC1細胞(100,000個細胞/ウェル)を、抗hPGモノクローナル抗体MAb5、MAb8、MAb13、又はMAb16の存在又は非存在における72時間にわたる無血清DMEM培地中での従来の付着性培養条件下で成長させた。実験を盲検化様式で行った。

【0263】

処理期間の終わりに、2つの異なるアッセイを細胞で実施した。第1に、ALDH1(結腸直腸癌幹細胞のマーカー)を発現する細胞のパーセンテージをFACSにより決定した。第2アッセイにおいて、各処理群について、200個細胞/ウェルを、低付着24ウェルプレートの6ウェルにおいて、bFGF及びEGFを添加した500μlの無血清M11培地中に蒔き、さらなる処理を伴わず、7日間にわたり成長させた。この期間の終了時に、写真を撮り、ウェル当たりの球の数をカウントし、球の表面積を測定した。

【0264】

#### B. 結果

結果を図22及び図23に示す。テストした4つの抗hPGモノクローナル抗体の各々は、コントロールと比較して、ALDH1を発現するCRC1原発性結腸直腸癌細胞の数を低下させるために、従来の付着性培養において3日後に効果的であった。これらの抗体の各々は、また、抗体を除去し、細胞を追加の7日間にわたり成長させた後、低付着培養条件における原発性結腸直腸癌細胞により形成されるスフェロイドの数を低下させるために効果的であった。コントロールと比較して、MAb5、MAb8、及びMAb16の阻害効果は、ボンフェローニの事後検定を用いた一元配置ANOVAを使用し、 $p < 0.05$ で統計的に有意であった。MAb13は、また、コントロールと比較して、スフェロイドの数を低下させたが、効果は統計的有意性に達しなかった。

【0265】

実施例18：低付着培養条件下でのスフェロイドとしての転移性結腸直腸癌細胞の成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いた前処理の効果

この実施例では、そのような細胞を低付着培養条件下で成長させた場合での2つの転移性結腸直腸癌細胞株からのALDH1陽性細胞のスフェロイドとしての成長に対する抗プロガストリンモノクローナル抗体を使用した前処理の効果を記載する。

【0266】

#### A. 方法

テストした細胞は、転移性結腸直腸癌細胞株T84及びSW620からであった。細胞は、最初に、従来の付着性カルチャウエア中で、抗プロガストリンモノクローナル抗体M

10

20

30

40

50

A b 3 ( 1  $\mu$ g/ml )、コントロールモノクローナル抗体、化学療法剤 5 フルオロウラシル ( 5 F U 1 0  $\mu$ M)、又は溶剤ジメチルスルホキシド ( D M S O ) の存在において 7 2 時間にわたり成長させた。処理後、細胞を 2 つのアッセイに供した。第 1 において、癌幹細胞マーカー A L D H 1 について陽性の細胞のパーセンテージを、A L D E F L U O R キット ( Stemcell Technologies ) を使用して決定した。第 2 のアッセイにおいて、各処理群について、細胞を、低付着 9 6 ウェルプレートの 6 ウェル中に、密度 5 0 0 個細胞 / ウェルで、b F G F 及び E G F を含む 1 0 0  $\mu$ l の無血清培地中に蒔き、さらなる処理を伴わずに 1 1 日間にわたり成長させた。この期間の終了後、1 ウェル当たりのスフェロイドの数をカウントした。

【 0 2 6 7 】

#### B . 結果

図 2 4 及び図 2 5 にそれぞれ示す通り、A L D H 1 陽性 T 8 4 及び S W 6 2 0 転移性結腸直腸癌細胞の数は、コントロールモノクローナル抗体を用いた処理と比較して、抗プロガストリンモノクローナル抗体 M A b 3 を用いた 7 2 時間にわたる前処理の結果として低下した。

【 0 2 6 8 】

図 2 6 及び図 2 7 にそれぞれ示す通り、T 8 4 及び S W 6 2 0 転移性結腸直腸癌細胞が低付着培養においてスフェロイドとして成長する能力は、コントロールモノクローナル抗体と比較して、プロガストリンに対するモノクローナル抗体を用いた 7 2 時間にわたる前処理により低下した。

【 0 2 6 9 】

実施例 1 9 : 抗プロガストリン抗体はインビボで新たな腫瘍の開始を低下させる

この実施例では、ヌードマウスにおいて成長するヒト転移性結腸直腸癌から単離された細胞が移植後に新たな腫瘍を形成する能力に対するヒトプロガストリンに特異的なモノクローナル抗体の効果を記載する。

【 0 2 7 0 】

#### A . 方法

標準的な技術を使用して、免疫不全 / B A L B c ヌードマウスに、ヒト転移性 S W 6 2 0 結腸直腸癌細胞の脾臓内注射を与えた。マウスに、次に、抗 h P G モノクローナル抗体 M A b 3 又はコントロールモノクローナル抗体を合計 6 週間にわたり週 2 回投与した。各抗体について、用量は 8 mg/kg であった。処置期間の終わりに、組織を、処置及びコントロールの両方のマウスからの転移から解剖した。腫瘍細胞を、Accumax を用いた解剖組織の処理により脱凝集し、濾過し、カウントした。合計 2 3 , 8 0 0 個の生存可能な腫瘍細胞が M A b 3 を用いて処理したマウスからの転移組織から得られ、3 6 , 4 0 0 個がコントロールマウスから得られた。

【 0 2 7 1 】

単離した細胞を次にテストし、細胞が低付着培養条件下でスフェロイドとして成長することができるか否か、及び、それらが、新たな宿主中に移植された場合に新たな腫瘍を開始することができるか否かをテストすることにより、それらが癌幹細胞の表現型特徴を示すか否かを決定した。スフェロイドテストについては、処理及びコントロール細胞の各々について、2 , 0 0 0 個細胞 / ウェルを、低付着カルチャウェアの 5 つのウェル中に、b F G F 及び E G F を添加した M 1 1 培地中に播種した。細胞を 7 日間にわたり成長させ、次に、各ウェルにおいて形成されたスフェロイドの数をカウントした。移植テストについては、処理及びコントロール転移から単離した細胞から発生したスフェロイドをプールし、脱凝集し、カウントした。合計 2 0 , 0 0 0 個の細胞が処置された転移に由来するスフェロイドから得られ、1 1 0 , 0 0 0 個の細胞がコントロール転移に由来するスフェロイドから得られた。2 匹の新たな B A L B c / ヌードマウスに、次に、等しい数の処理又はコントロール細胞を用いて移植した。具体的には、処置した転移に由来する 6 , 5 0 0 個の腫瘍細胞をマウスの左大腿中に皮下注射したのに対し、同じ数のコントロール細胞を右大腿中に皮下注射した。この様式において、各マウスがそれ自体のコントロールとしての

10

20

30

40

50

役割を果たした。腫瘍容積を、次に、時間を通して両方の動物において算出した。

【0272】

#### B. 結果

図28に示す通り、インビボ転移から単離されたヒト転移性結腸直腸癌細胞の低付着培養におけるスフェロイドとしての成長は、同じ用量のコントロールモノクローナル抗体を用いた処置と比較して、抗プロガストリンモノクローナル抗体MAb3を用いて動物を処置することにより低下した。

【0273】

図29に示す通り、インビボ転移から単離された転移性結腸直腸癌細胞の移植後に新たな腫瘍成長を開始する能力も、同じ用量のコントロールモノクローナル抗体を用いた処理と比較して、抗プロガストリンモノクローナル抗体MAb3を用いて細胞を処理することにより低下した。グラフにおいて、Y軸は腫瘍容積( $\text{mm}^3$ )に対応する。黒四角は、コントロールモノクローナル抗体を用いて処置したマウスにおいて成長した転移に由来する転移性結腸直腸癌細胞を用いて皮下注射したヌードマウスの1匹についての腫瘍容積のデータポイントを表す。逆に、白四角は、MAb3抗プロガストリンモノクローナル抗体を用いて処置したマウスにおいて成長した転移に由来する転移性結腸直腸癌細胞を用いて反対側の大腿に注射された同じマウスについてのデータポイントを表す。黒及び白ダイヤモンドは、実験に使用した第2ヌードマウスから収集した同様のデータに対応する。

【0274】

#### 実施例20：血漿又は血清PGレベルの定量化

PGの血漿及び/又は血清レベルは、以下のアッセイを使用して便利に決定することができる。96ウェルマイクロタイタープレートを、 $0.5 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ のC末端抗hPG抗体、例えば、ウサギC末端抗hPGポリクローナル抗体、又はC末端抗hPG抗体(本明細書に記載する)を用いてコーティングし、次に、一晚インキュベートする。プレートを、次に、PBS-TWEEN(0.05%)中で3回洗浄し、PBS-TWEEN(0.05%)中の2%脱脂乾燥ミルク(w/v)を用いてブロックする。別々に、テストサンプル、コントロールサンプル(ブランク又はPG陰性血漿又は血清サンプル)、及び約 $5 \text{ pM}$ ( $0.5 \times 10^{-11} \text{ M}$ )~約 $0.1 \text{ nM}$ ( $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ )のhPG参照基準(PG陰性血漿又は血清中で希釈した凍結乾燥hPG)を適切な希釈剤(例、PBS-TWEEN 0.05%)中で調製する。サンプルを、コーティングしたプレート上で2~4時間にわたり37°Cで、又は、あるいは、12~16時間21°Cでインキュベートする。インキュベーション後、プレートを、PBS-TWEEN(0.05%)を用いて3回洗浄し、 $0.001 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ のN末端抗hPG抗体、例えば、ポリクローナルN末端抗hPG抗体又はN末端モノクローナル抗hPG抗体(本明細書に記載する)を用いてインキュベートし、21°Cで30分間にわたり西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(Nakane et al., 1974, J. Histochem. Cytochem. 22(12): 1084-1091を参照のこと)に結合させる。プレートを次にPBS-TWEEN(0.05%)中で3回洗浄し、HRP基質を21°Cで15分間にわたり加える。反応を、 $100 \mu\text{l}$ の $0.5 \text{ M}$ 硫酸を加えることにより停止させ、光学密度測定値を $405 \text{ nm}$ で取る。テストサンプルhPGレベルを、hPG参照基準に由来する測定値から構築された標準曲線との比較により決定する。

【0275】

#### 実施例21：抗hPG抗体の特異性を評価するためのELISAアッセイ

抗hPG抗体の特異性を、以下の通りにELISAアッセイを使用して便利に決定することができる。96ウェルプレートを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の適切な濃度のテストポリペプチド(例、25及び50ngの組換えヒトPG、ならびに50及び250ngのCTFP又は他のガストリン由来の遺伝子産物)を用いて4°Cで一晩インキュベートした。その後、ウェルを、洗浄溶液(PBS及び0.1%TWEEN-20)を用いて3回洗浄し、次に $100 \mu\text{l}$ のプロッキング溶液(PBS、0.1%TWEEN-20、0.1%ウシ血清アルブミン又はカゼイン加水分解物)を用いて22°Cで2時間にわたりインキュベートした。プロッキング後、ウェルを3回洗浄し、アッセイする抗体(テスト抗体)を加える。

100  $\mu$ lのPBS中のテスト抗体(0.3 ~ 1 ng/ml)及び0.1%TWEEN-20を各ウェルに加える。プレートに次に22で2時間にわたりインキュベートし、その後、テスト抗体溶液を捨て、洗浄工程(3 x 100  $\mu$ lの洗浄溶液、上に記述する通り)後、二次抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させたヤギ抗マウスIgG(Fc)抗体を含むブロッキング溶液を用いて置換する。二次抗体を用いた1時間のインキュベーション後、100  $\mu$ lの基質溶液(例、Fast OPD、又はO-フェニレンジアミン二塩酸塩、Sigma-Aldrich Co.から入手可能、製造者の指示に従って調製した)を各ウェルに加え、暗所で、22で20分間にわたりインキュベートした。反応は、50  $\mu$ lの4N硫酸を加えることにより停止させ、触媒された基質の量を、492 nmでの光学密度(OD)を測定することにより決定する。基質変換は、抗原に結合した一次(テスト)抗体の量に比例する。実験を2通りに実行し、OD測定値を抗原濃度の関数としてプロットする。テスト抗体は、測定されたODがhPGについて0.2 ~ 1.5の間であり、CTFP又は他のガストリン遺伝子由来ペプチドのいずれかを用いて、バックグラウンドを上回る統計的に有意なシグナルはない場合、PGについて特異的であるとスコア化される(ここで、バックグラウンドはPBSだけを含むコントロールウェルからの平均シグナルである)。

10

#### 【0276】

実施例22:抗hPG抗体の中和活性を評価するためのアッセイ

特異的な抗hPG抗体が中和性であるか否かを評価するための特定のテストを、以下の通りに実行することができる。結腸直腸癌細胞を6ウェルプレート中に約50,000 ~ 100,000個細胞/ウェルで播種する。細胞を、次に、テスト抗hPG抗体又はコントロール抗体を用いて、約5  $\mu$ g/mlの抗体濃度で48時間にわたり12時間間隔で処理する。テスト抗体は、テスト抗体を用いて処理した細胞の数が、コントロールの非特異的抗体を用いて処理した細胞の数と比較して、生存細胞の数における少なくとも10%の統計的に有意な低下を示す場合(両側マンホイットニー検定(差は、 $p < 0.05$ の場合に有意と考えられる)を使用する)、アッセイにおいて中和性であるとして定義される。全細胞数は、処理期間の開始時での細胞数について補正され、T0として言及される。このアッセイにおける使用のための例示的な結腸直腸癌細胞は、しかし、限定しないが、本明細書に開示する原発性及び転移性結腸直腸癌細胞株を含む。

20

#### 【0277】

実施例23:抗hPG抗体の親和性を評価するためのアッセイ

抗hPG抗体の親和性定数は、Proteon Technique(BioRad)を使用して、Nahshol et al., 2008, Analytical Biochemistry 383: 52-60(その全体において参照により本明細書により組み入れられる)に従って測定することができる。簡単には、マウス抗PG抗体について、抗マウスIgG抗体(50  $\mu$ g/ml)を最初にセンサーチップ上にコーティングし、抗体の注射後にチップにより検出されたシグナルが10,000 ~ 11,500応答単位(RU)の間に入ることを確認する。目的のマウス抗hPG抗体(テスト抗体)を次に注射する(30  $\mu$ g/mlの典型的な濃度で)。テスト抗体が十分に結合する場合、少なくとも500RUの追加シグナルが観察される。テスト抗体とhPGの間での結合の時間経過を、次に、hPGの変動濃度、例えば、200nM、100nM、50nM、25nM、及び12.5nMを注射し、結合のレベルを検出することにより得る。典型的には、いくつかのチャンネルが、単一の実験において並行して複数の抗体をテストするために利用可能であり、hPGの異なる濃度で並行して単一のテスト抗体の結合をアッセイすることを可能にする。1つのチャンネルを、非特異的結合についてのコントロールとして、hPGに特異的ではないマウスモノクローナル抗体を用いて注射すべきである。別のチャンネルを、バックグラウンドシグナルについてのベースラインとして、希釈緩衝液単独を用いて注射すべきである。一般的に、結合は、非特異的マウス抗体を用いて注射したチャンネルにおいて検出可能ではない。この設定において高レベルの結合を示す抗体は、hPGによる捕捉モノクローナル抗体の飽和をもたらすのが、より低いhPG濃度(50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、及び3.125nM)に対してテストすることができ、より洗練された測定を許す。

30

40

50

## 【0278】

親和性定数 ( $K_D$ ) を、解離定数 ( $k_d$ ) と結合定数 ( $k_a$ ) の間の比率として算出する。実験値は、結合測定値に基づく実験曲線及び理論上のプロファイルの間での統計的に関連する類似性を分析することにより検証することができる。

## 【0279】

非マウス抗 h P G 抗体の親和性定数は、抗 h P G 試験抗体の起源の種について特異的な I g G を使用して同様のフォーマットにおいて評価することができる。

## 【0280】

実施例 24：参照抗 h P G 抗体を用いた競合的結合を評価するためのアッセイ

目的の抗体 (テスト抗体) が、h P G 結合について、ビオチン化参照抗 h P G 抗体と競合するか否かを評価するための特定のアッセイを、以下の通りに実施することができる。

96 ウェルプレートに、捕捉抗 h P G 抗体 (ビオチン化参照抗 h P G 抗体により認識されるエピトープとは異なる h P G の N 又は C 末端領域を認識するポリクローナル又はモノクローナル抗体) を用いて、1 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  の範囲内で選ばれる濃度で、4 で一晚コーティングする (0.1 ~ 1  $\mu\text{g}$ /ウェル)。22 で2時間にわたるブロッキングバッファー (PBS 中の 0.1% TWEEN - 20、0.1% BSA) を用いたブロッキング後、組換え h P G を、10 pM ~ 1 nM (10 ~ 1000 pg/ウェル) の間の範囲の濃度で加え、22

で2時間にわたりインキュベートする。その後、ビオチン化参照抗 h P G 抗体 (又はビオチン化参照抗 h P G 抗体を含む混合物) を、増加濃度の非標識テスト抗体濃度と共に加え、22 で1時間にわたりインキュベートする。非結合抗体を除去するための洗浄後、結合した標識参照抗 h P G 抗体の検出を、混合物を、50 ng/ml のストレプトアビジン (streptavidin) - HRP を用いて 22 で1時間にわたりインキュベートすることにより実施し、西洋ワサビペルオキシダーゼ用の蛍光基質とのインキュベーション、及び、次に、ルミノメーターにおける相対的な光単位 (RLU) の定量化が続く。アッセイを2通りに実施した。

## 【0281】

参照抗 h P G 抗体と競合する抗体は、h P G への参照抗体の結合を阻害する。実質的に同一のエピトープに、又は重複するエピトープと参照抗体として結合する抗体は、結合した参照抗 h P G 抗体の量を有意に低下させる (例えば、少なくとも 50%) (観察された RLU における低下により証明される通り)。

## 【0282】

高いコントロール値が、標識した参照抗体を、テスト抗体を伴わず、組換え h P G とインキュベートすることにより行われるコントロール実験から得られる。低いコントロール値は、過剰濃度の非標識参照抗体 (非標識参照抗体は、このように、h P G への結合について標識抗体と競合する) の存在において標識された参照抗体を、組換え h P G を用いてインキュベートすることにより行われるコントロール実験から得られる。参照抗 h P G 抗体と競合するテスト抗体の能力は、次に、標識した参照抗体を、増加濃度の非標識テスト抗体の存在において組換え h P G とインキュベートすることにより決定される。

## 【0283】

テストアッセイにおいて、テスト抗体の存在における観察された RLU における有意な低下は、テスト抗体が、参照抗 h P G 抗体と実質的に同じエピトープを認識することを示す。

## 【0284】

結合の阻害は阻害定数又は  $K_i$  として表現することができ、以下：

$$K_i = IC_{50} / (1 + ([\text{参照抗 h P G Ab 濃度}] / K_D^{\text{参照抗 h P G Ab}}))$$
 の式に従って算出される。

式中、「 $IC_{50}$ 」は、参照抗体の結合における 50% 低下をもたらすテスト抗体の濃度であり、 $K_D^{\text{参照抗 h P G Ab}}$  は参照抗 h P G 抗体の解離定数 (h P G についてのその親和性の測定値) である。参照抗 h P G 抗体 (例えば、本明細書に記載する抗 h P G 抗体の 1 つ) と競合する有用なテスト抗体は、典型的には、本明細書に記載するアッセイ条

10

20

30

40

50

件下で10pM~100nMの範囲のK<sub>i</sub>sを有する。

【0285】

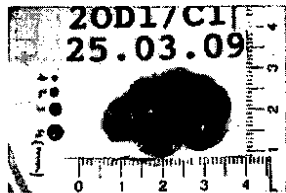
本願において引用する全ての刊行物、特許、特許出願、及び他の文書が、各々の個々の刊行物、特許、特許出願、又は他の文書が全ての目的のために参照により組み入れられることが個々に示される場合と同じ程度まで、全ての目的のためにそれらの全体において参照により本明細書により組み入れられる。

【0286】

種々の特定の実施態様が例証及び記載されているが、種々の変化を、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく作ることができることが理解されるであろう。

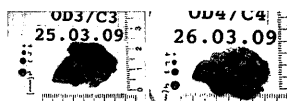
【図8A】

FIG. 8A



【図8B】

FIG. 8B



【図10】

FIG. 10



【図31A】

FIG. 31A

mV<sub>H</sub> MAb3

```

gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac 96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att 144
Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
ggt ggt ttt tat cct gga aat agt gat tct agg tac aac cag aaa ttc 192
Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
aag ggc aag gcc aca ctg act gca gtc aca tcc gcc agt act gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gac ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288
Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
aca aga aga gat agt ccc cag tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca 336
Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110
gtc tcc tca 345
Val Ser Ser
115

```

【 図 3 1 B 】

FIG. 31B

mV<sub>L</sub> MAb3

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat agt 96  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30

aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144  
Aan Gly Aan Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

agc aga ctg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288  
 Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

tca cat gtt cct ccc acc ttc ggc tgg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336  
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

【 図 3 1 C 】

FIG. 31C

mV<sub>H</sub> MAb4

cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc 96  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser  
 20 25 30

tgg ata gag tgg tta aaa cag agg cct gga cat ggc ctt gag tgg att 144  
Trp Ile Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

gga gag ttt tta cct gga agt ggt agt aca gac tac aat gag aag ttc 192  
 Gly Glu Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttc act gca gac aca tcc tcc gac aca gcc tac 240  
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

atg cta ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt 288  
 Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gca act gat ggt aat tat gac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336  
Ala Thr Asp Gly Aan Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

ctg gtc act gtc tct gca 354  
 Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

【 図 3 1 D 】

FIG. 31D

mV<sub>L</sub> MAb4

gat ctt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48  
 Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt 96  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

agt gga gtc acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144  
Ser Gly Val Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

agc aga ctg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa ggt 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95

aca cat gtt cct ccc acc ttc ggc tgg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336  
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

【 図 3 1 E 】

FIG. 31E

mV<sub>H</sub> MAb8

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gcc tta gtg aag cct gga ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc act acc tat 96  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cgc gag aag agg ctg gag tgg gtc 144  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

gca acc att agt agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg 192  
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggt cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac gcc cta tac 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa atg agc agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gca aca cag ggg aat tac tct ttg gac ttc tgg ggc caa ggc acc tct 336  
Ala Thr Gln Gly Aan Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351  
 Leu Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 1 F 】

FIG. 31F

mV<sub>L</sub> MAb8

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act 96  
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr  
 20 25 30

aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct 144  
Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

cct cag ctc ctg att tat cag atg tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca 192  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

gac agg ttc agt agc agt ggg tca gga act gat ttc aca ctg aga atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 85 90 95

cta gaa ctt ctg ctg acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 336  
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

【 3 1 G 】

FIG. 31G

mV<sub>H</sub> MAb13

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct gga gga 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt agc tat 96  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtt cgc cag tct cca gac agg agg ctg gag ttg gtc 144  
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Arg Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45

gca agt att aat act ttt ggt gat aga acc tat tat cca gac agt gtg 192  
 Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa atg acc agt ctg aag tct gag gac aca gcc att tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gca aga ggg acc gga acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctg aca gtc 336  
Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Thr Val  
 100 105 110

tcc tca 342  
 Ser Ser

【 3 1 H 】

FIG. 31H

mV<sub>L</sub> MAb13

gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgg gtt acc att gga 48  
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

caa cca gcc tcc atc tcc tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt 96  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144  
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

cca aag cgc cta atc tat ctg tgg tct aaa ctg gac tct gga gtc cct 192  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95

aca cat ttt cct cag acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 336  
Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

【 3 1 I 】

FIG. 31I

mV<sub>H</sub> MAb16

cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac 96  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

tat atg tac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att 144  
Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

gga gag att aat cct agc aat ggt ggt act aac ttc aat gag aag ttc 192  
 Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gca tac 240  
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct ggc gtc tat tac tgt 288  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

aca aga ggc ggt tac tac ccc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act 336  
Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351  
 Leu Thr Val Ser Ser  
 115

【 図 3 1 J 】

FIG. 31J

mV<sub>L</sub> MAb16

gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tgg gtt acc att ggg 48  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

cgc cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta gac agt 96  
 Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

gat gga aag aca tat ttg tat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144  
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

cca aag cgc cta atc tat ttc gtg tct gag ctg gac tct gga gtc cct 192  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

gac agg atc act ggc agt ggg tgg ggg aca gat ttc aca ctg aag atc 240  
 Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa gga 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95

aca cat tct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336  
Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

【 図 3 1 K 】

FIG. 31K

mV<sub>H</sub> MAb19

gat gtg cag ctt cag gag tgg gga cct ggc ctg gtg aaa cct tct cag 48  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

tct ctg tcc ctc aca tgc act gtc act ggc tac tca atc acc agt gat 96  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

tat gcc tgg aat tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag tgg 144  
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45

atg ggc tac ata agc ttc agt ggt tac act agt tac aac cca tct ctc 192  
 Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

aaa agt cga atc tct gtc act cgg gac aca tcc agg aac caa ttc ttc 240  
 Lys Ser Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

ctc cag ttg act tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt 288  
 Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Cys  
 85 90 95

gca aga gag gtc aac tat ggg gac tcc tac cac ttt gac tac tgg ggc 336  
Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

caa ggc acc att gtc aca gtc tcc tca 363  
 Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

【 図 3 1 L 】

FIG. 31L

mV<sub>L</sub> MAb19

caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc 48  
 Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt cca cac aga acg tac acc 96  
 Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr  
 20 25 30

att gaa tgg tat cag caa cag tca ctc aag cct cct aag tat gtg atg 144  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met  
 35 40 45

gag gtt aag aaa gat gga agc cac agc aca ggt cat ggg att cct gat 192  
 Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60

cgc ttc tct gga tcc agt tct ggt gct gat cgc tac ctc agc att tcc 240  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser  
 65 70 75 80

aac atc cag cct gaa gat gaa gca ata tac atc tgt ggt gtg ggt ggt 288  
 Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp  
 85 90 95

gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc 336  
Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Thr Lys Val  
 100 105 110

act gtc cta 345  
 Thr Val Leu  
 115

【 図 3 2 A 】

FIG. 32A

hV<sub>H</sub> MAb3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 48  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr 96  
 20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met 144  
 35 40 45

Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Ser Gln Lys Phe 192  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr 240  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 288  
 85 90 95

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr 336  
 100 105 110

Val Ser Ser 345  
 115

【 3 2 B 】

FIG. 32B

hV<sub>L</sub> MAb3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

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

【 3 2 C 】

FIG. 32C

hV<sub>H</sub> MAb4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ile Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 2 D 】

FIG. 32D

hV<sub>L</sub> MAb4

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Ser Gly Val Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95

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

【 3 2 E 】

FIG. 32E

hV<sub>H</sub> MAb8(a)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 2 F 】

FIG. 32F

hV<sub>L</sub> MAb8(a)

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr  
 20 25 30

Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 85 90 95

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

【 3 2 G 】

FIG. 32G

hV<sub>H</sub> MAb8(b)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 2 H 】

FIG. 32H

hV<sub>L</sub> MAb8(b)

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr  
 20 25 30

Lys Gly Ile Thr Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 85 90 95

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

【 3 2 I 】

FIG. 32I

hV<sub>H</sub> MAb8(c)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 2 J 】

FIG. 32J

hV<sub>L</sub> MAb8(c)

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr  
 20 25 30

Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 85 90 95

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

【 3 2 K 】

FIG. 32K

hV<sub>H</sub> MAb13(a)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asn Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

【 3 2 L 】

FIG. 32L

hV<sub>L</sub> MAb13(a)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95

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

【 3 2 M 】

FIG. 32M

hV<sub>H</sub> MAb13(b)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

【 3 2 N 】

FIG. 32N

hV<sub>L</sub> MAb13(b)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95

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

【 3 2 O 】

FIG. 32O

hV<sub>H</sub> MAb16(a)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 2 P 】

FIG. 32P

hV<sub>L</sub> MAb16(a)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95

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

【 3 2 Q 】

FIG. 32Q

hV<sub>H</sub> MAb16(b)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 2 R 】

FIG. 32R

hV<sub>L</sub> MAb16(b)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95

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

【 3 2 S 】

FIG. 32S

hV<sub>H</sub> MAb16(c)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

【 3 2 T 】

FIG. 32T

hV<sub>L</sub> MAb16(c)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95

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

【 3 2 U 】

FIG. 32U

hV<sub>H</sub> MAb19(a)

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

【 3 2 V 】

FIG. 32V

hV<sub>L</sub> MAb19(a)

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr  
 20 25 30

Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met  
 35 40 45

Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp  
 85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 100 105 110

Glu Ile Lys  
 115

【 3 2 W 】

FIG. 32W

hV<sub>H</sub> MAb19(b)

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

【 3 2 X 】

FIG. 32X

hV<sub>L</sub> MAb19(b)

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr  
 20 25 30

Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met  
 35 40 45

Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp  
 85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 100 105 110

Glu Ile Lys  
 115

【 3 2 Y 】

FIG. 32Y

hV<sub>H</sub> MAb19(c)

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

【 3 2 Z 】

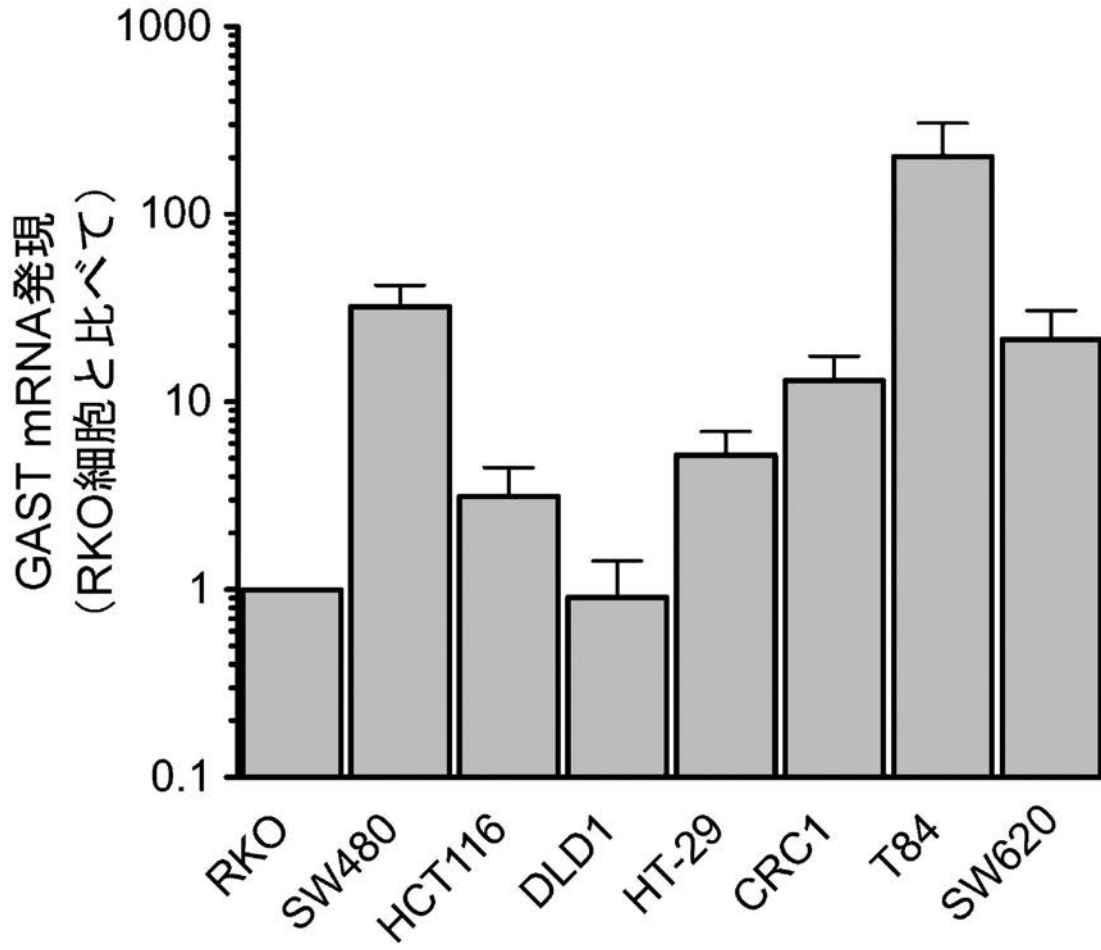
FIG. 32Z

hVL MAb19(c)

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

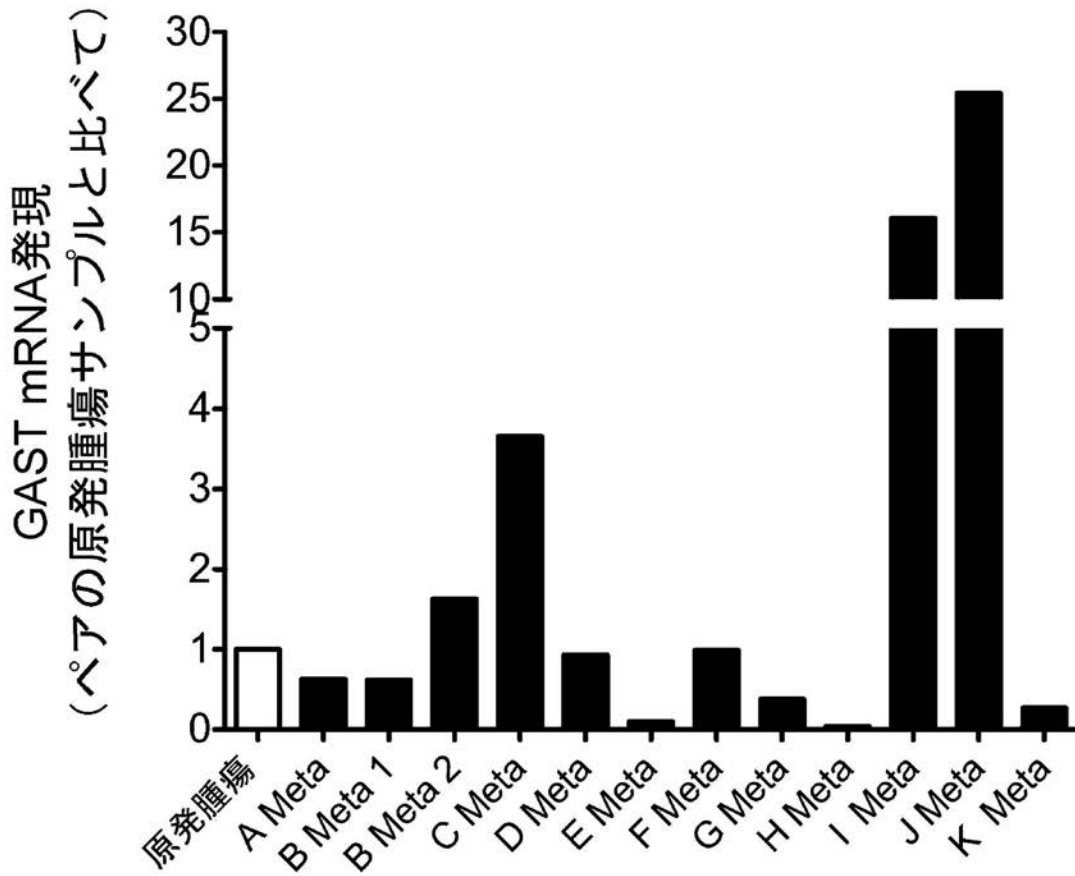
【図1】

## 原発性及び転移性CRC癌株におけるGAST mRNA

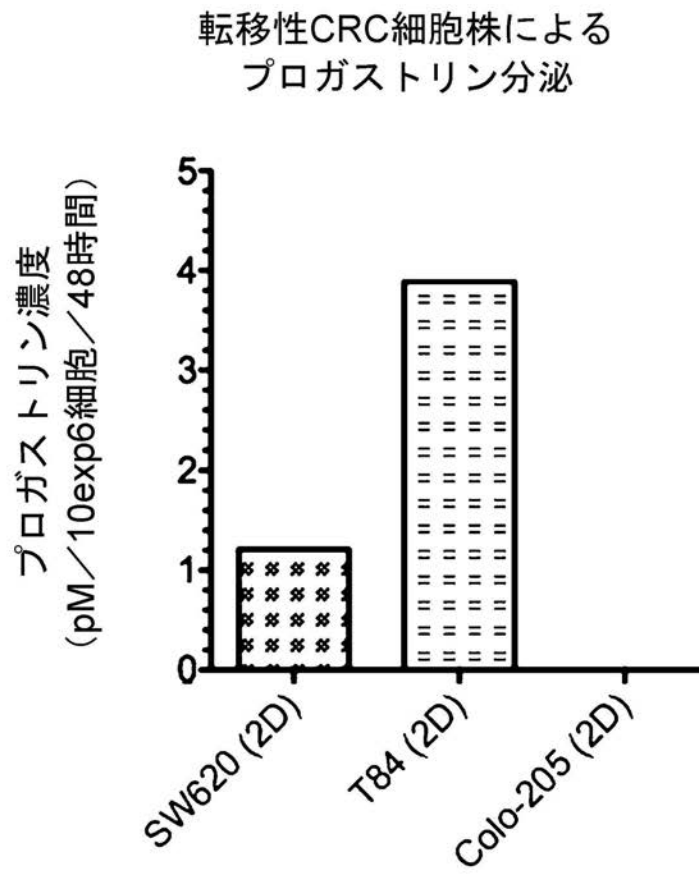


【 図 2 】

### CRC転移サンプルにおける 相対的GAST遺伝子発現

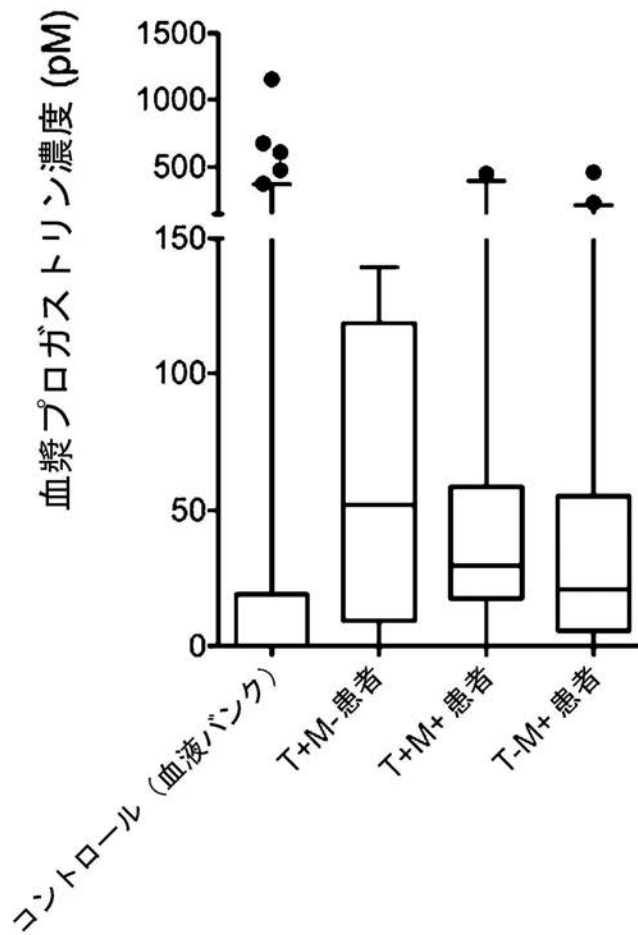


【 図 3 】



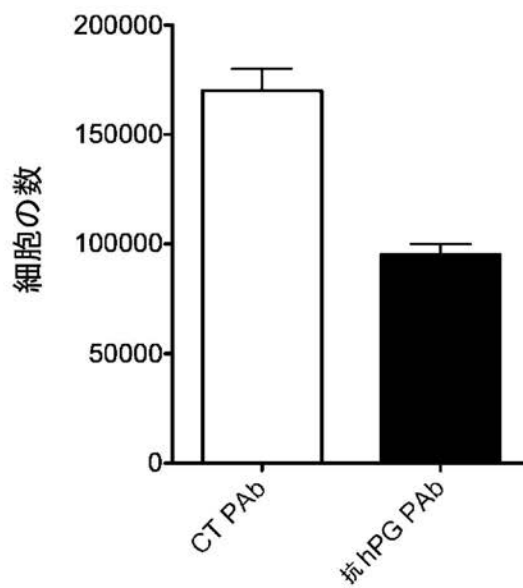
【 図 4 】

CRC患者におけるプロガストリン濃度

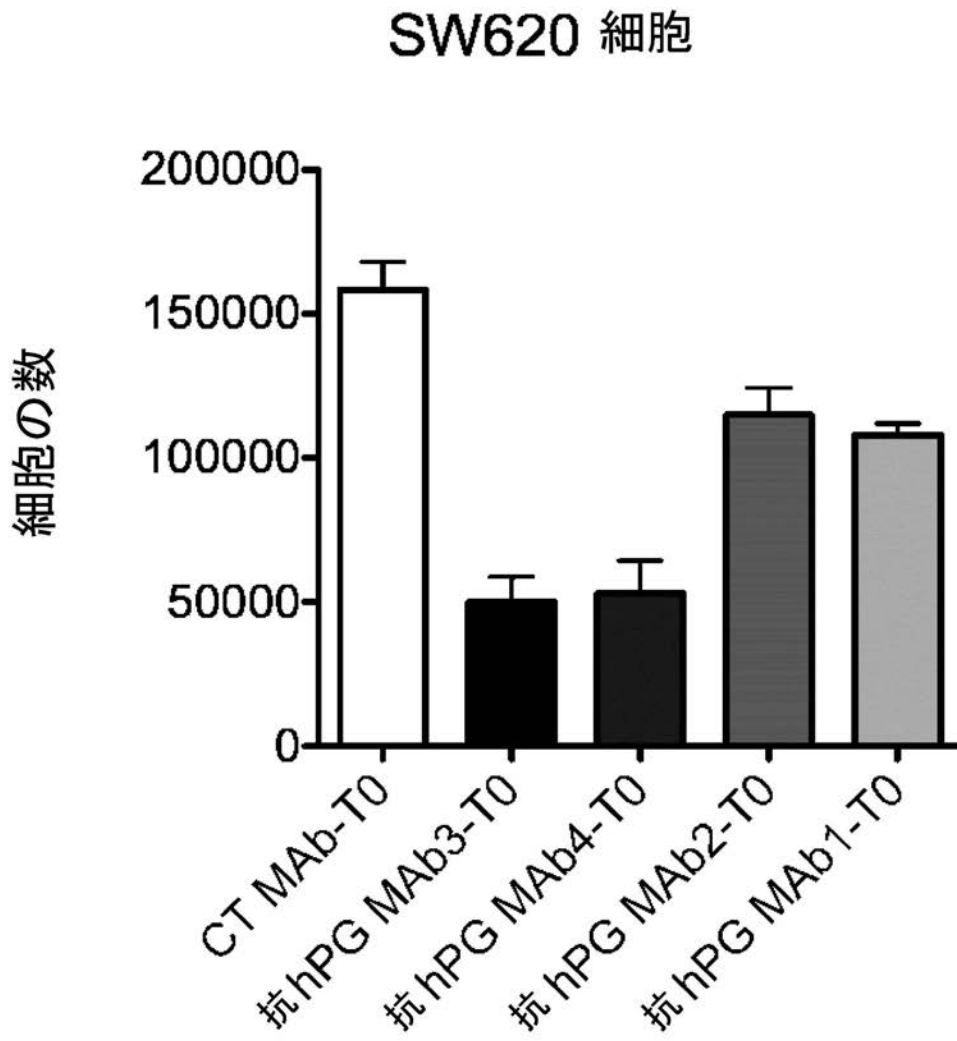


【 図 5 】

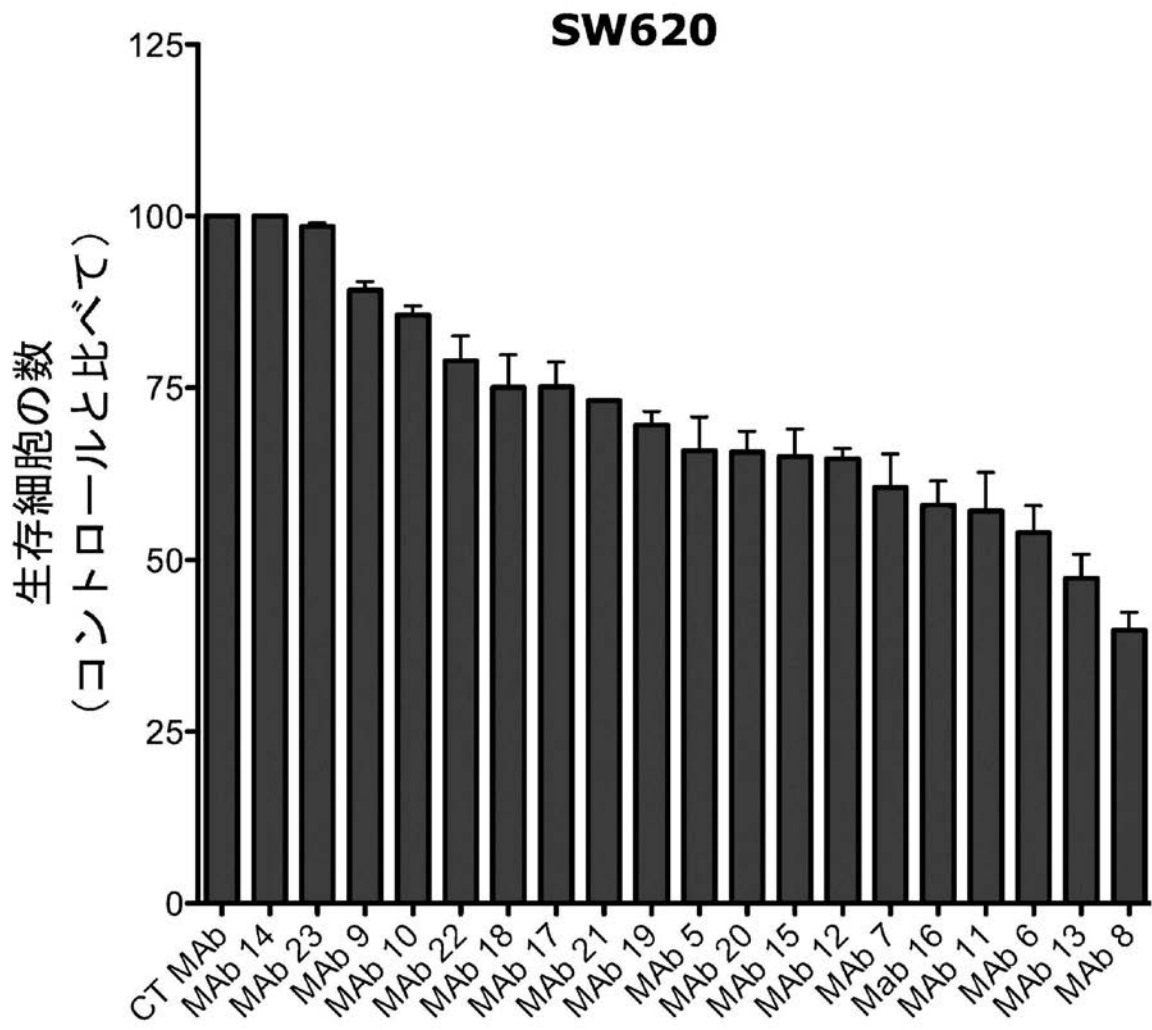
SW620細胞



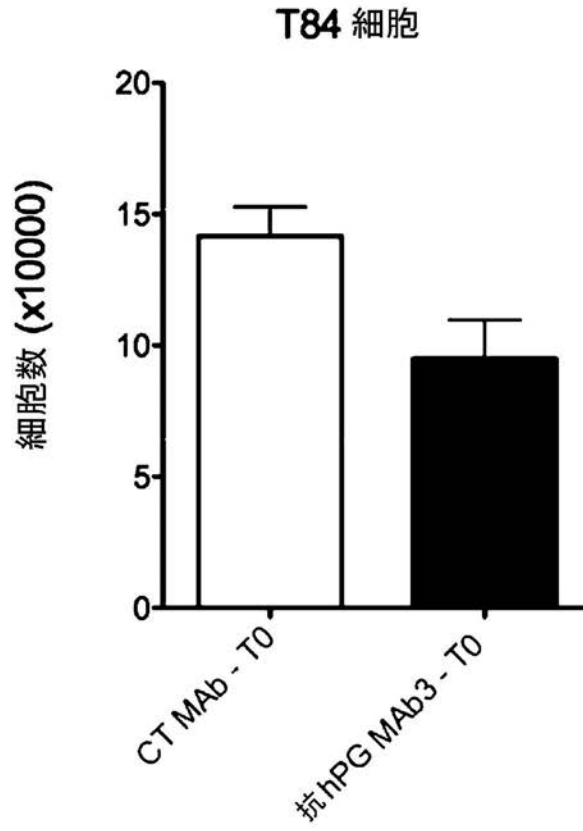
【図 6 A】



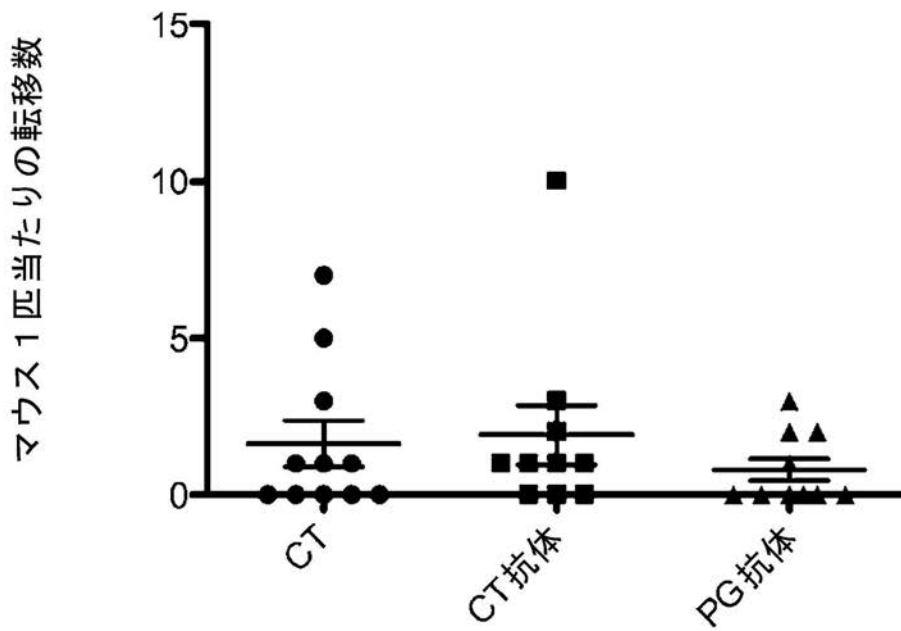
【 図 6 B 】



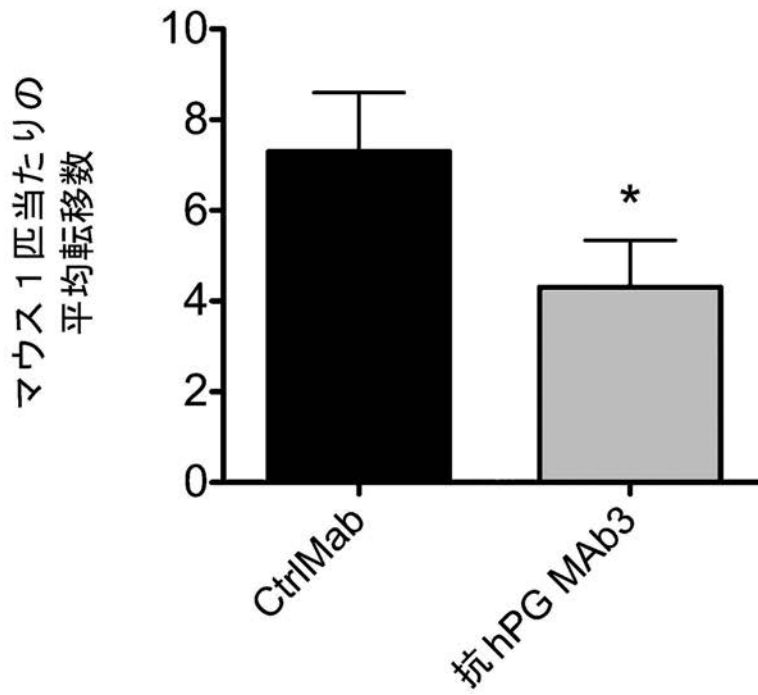
【 図 7 】



【 図 9 】

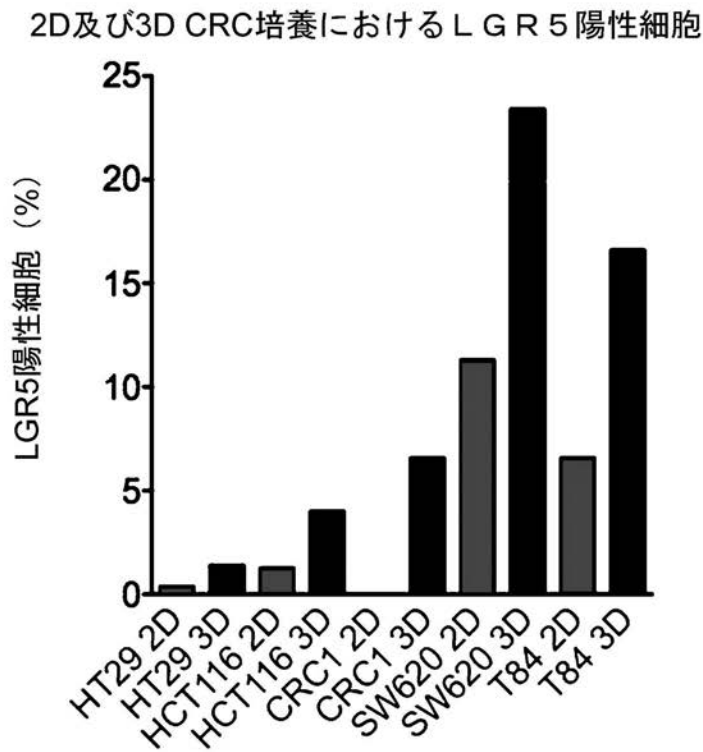


【図 1 1】



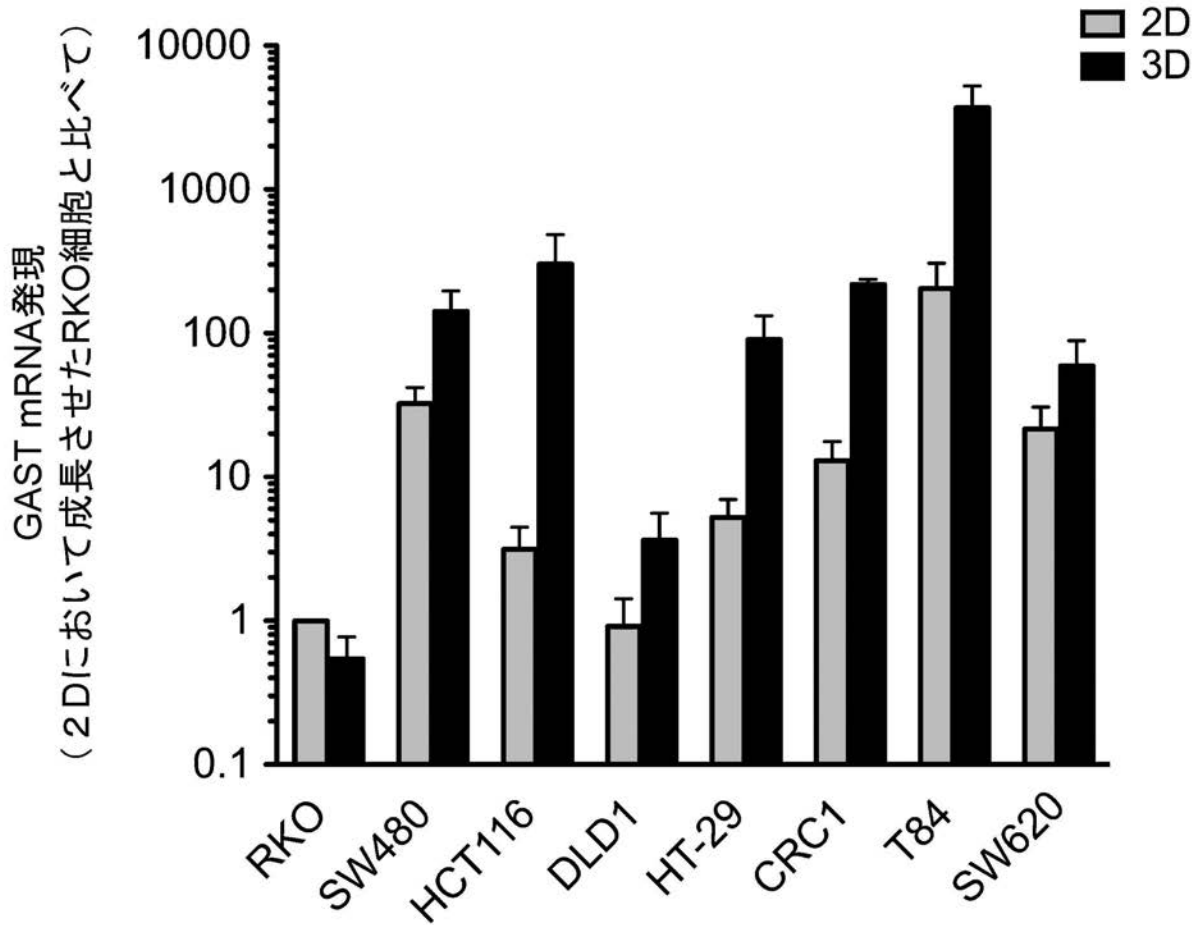
\*, p=0.0372, マンホイットニー検定, n= 10 群

【図 1 2】



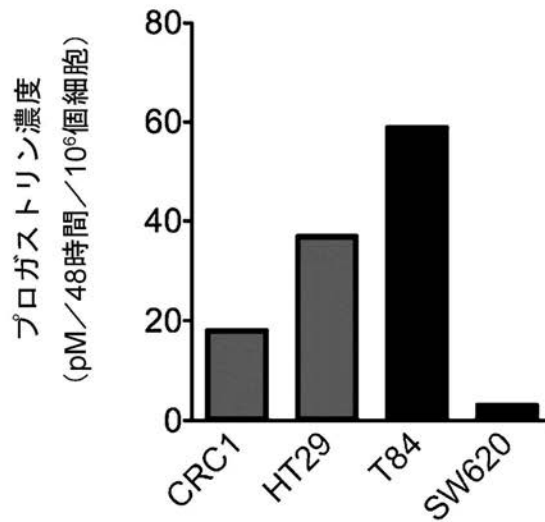
【 図 1 3 】

2D又は3Dにおいて成長させた原発性及び  
転移性CRC細胞におけるプロガストリンをコードする遺伝子の発現

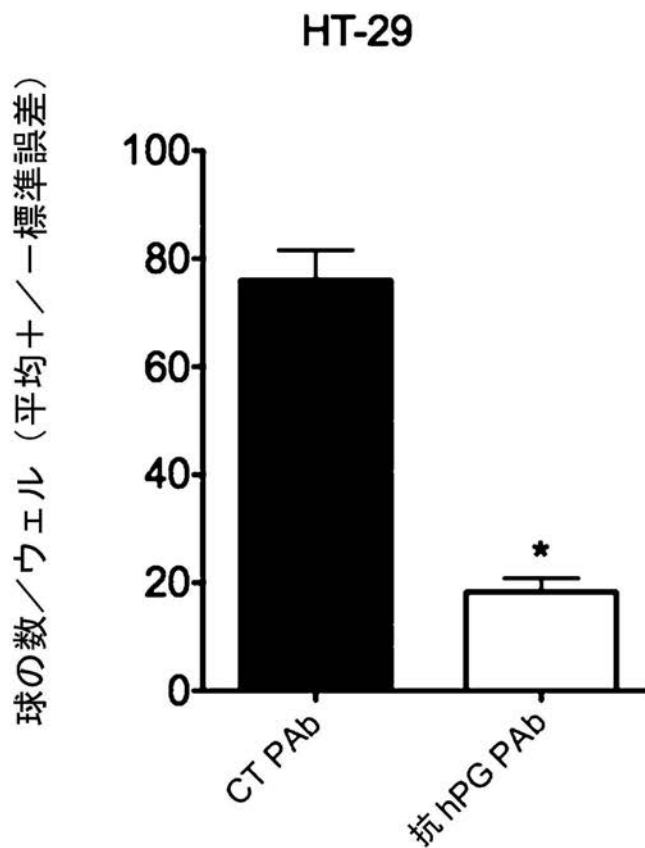


【 図 1 4 】

3Dにおける原発性及び転移性CRC細胞株  
によるプロガストリン分泌

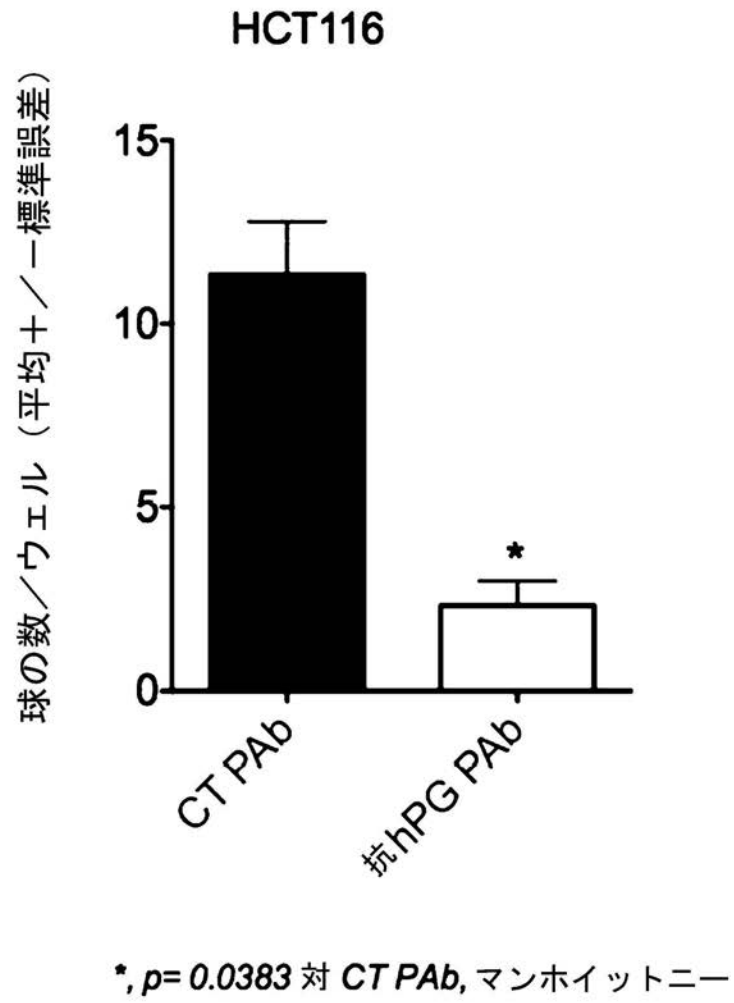


【 図 1 5 】



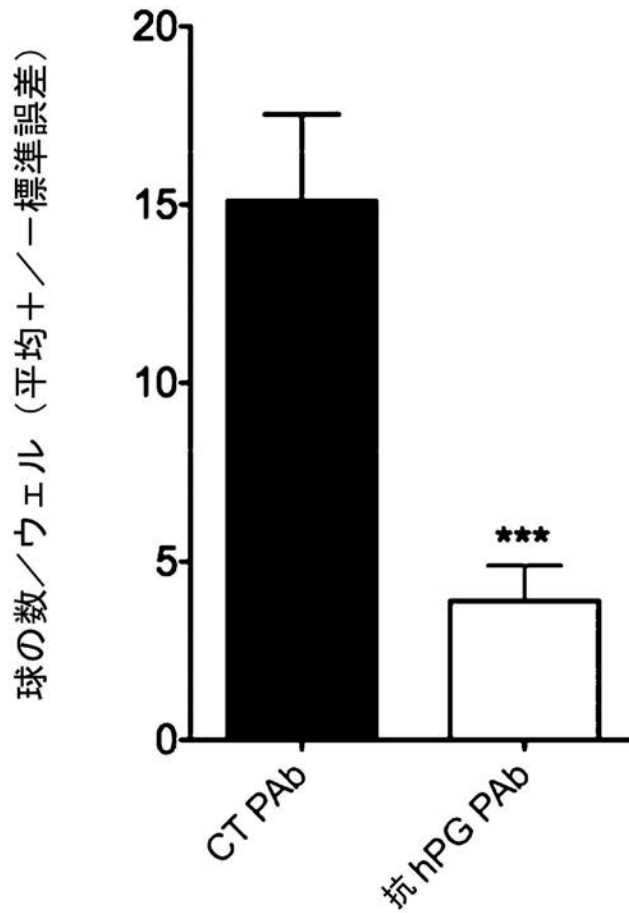
\*,  $p=0.0500$  対 CT PAb, マンホイットニー

【 図 1 6 】



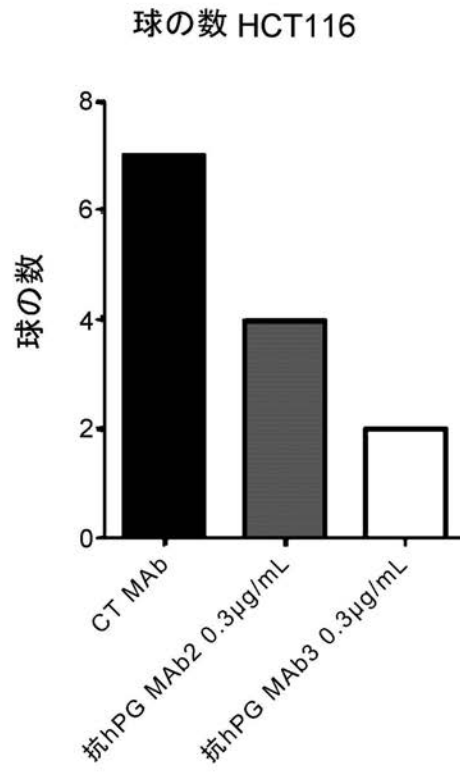
【 図 1 7 】

原発性ヒトCRC細胞 (CRC 1)

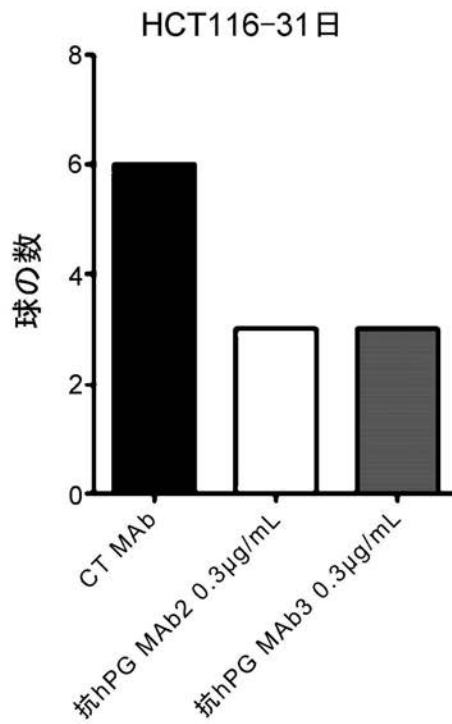


\*\*\*,  $p=0,0008$  対 CT PAb, マンホイットニー

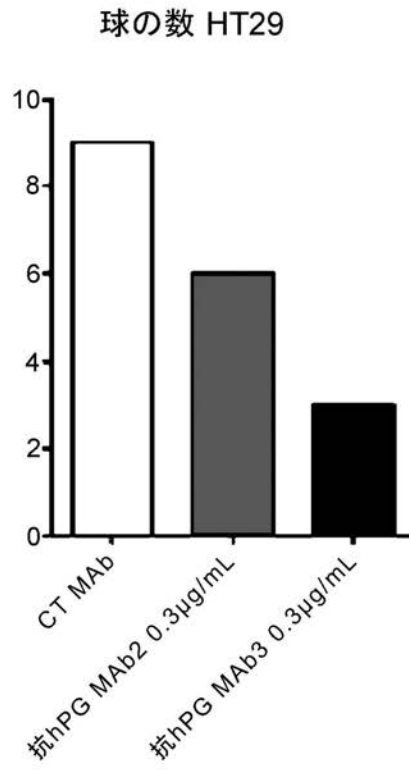
【 図 1 8 A 】



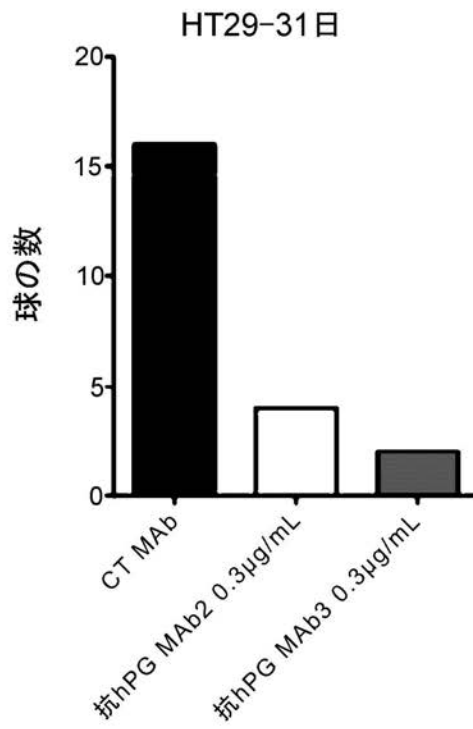
【 図 1 8 B 】



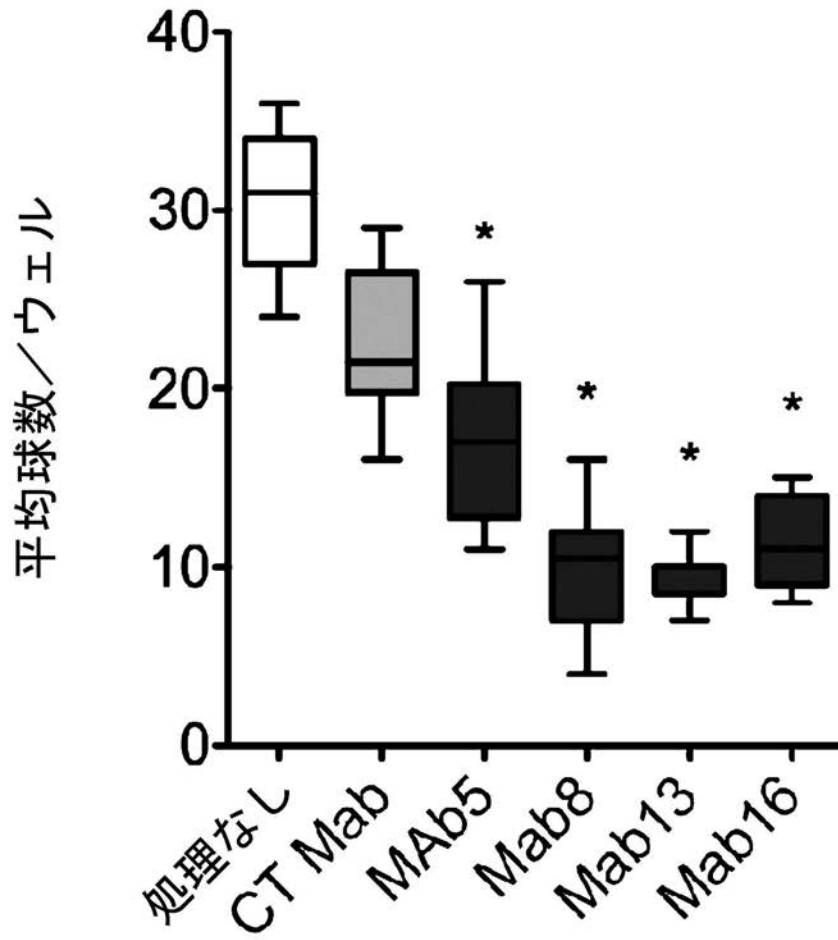
【図19A】



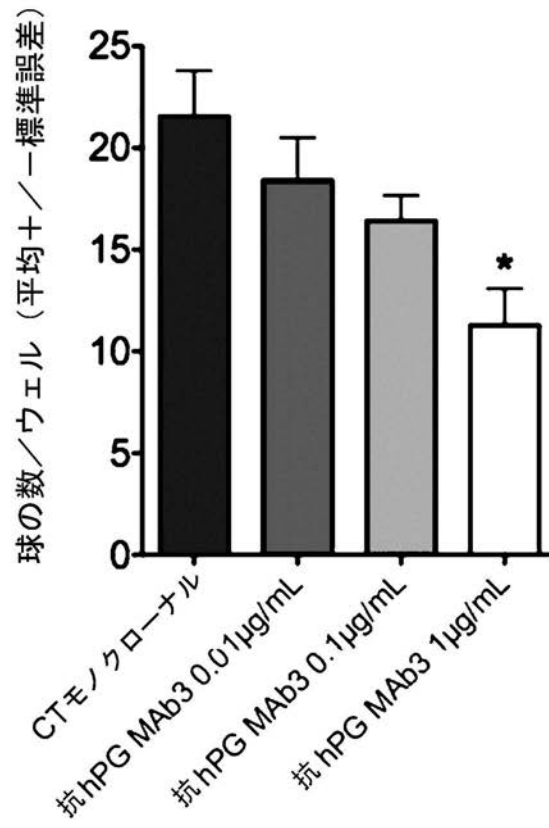
【図19B】



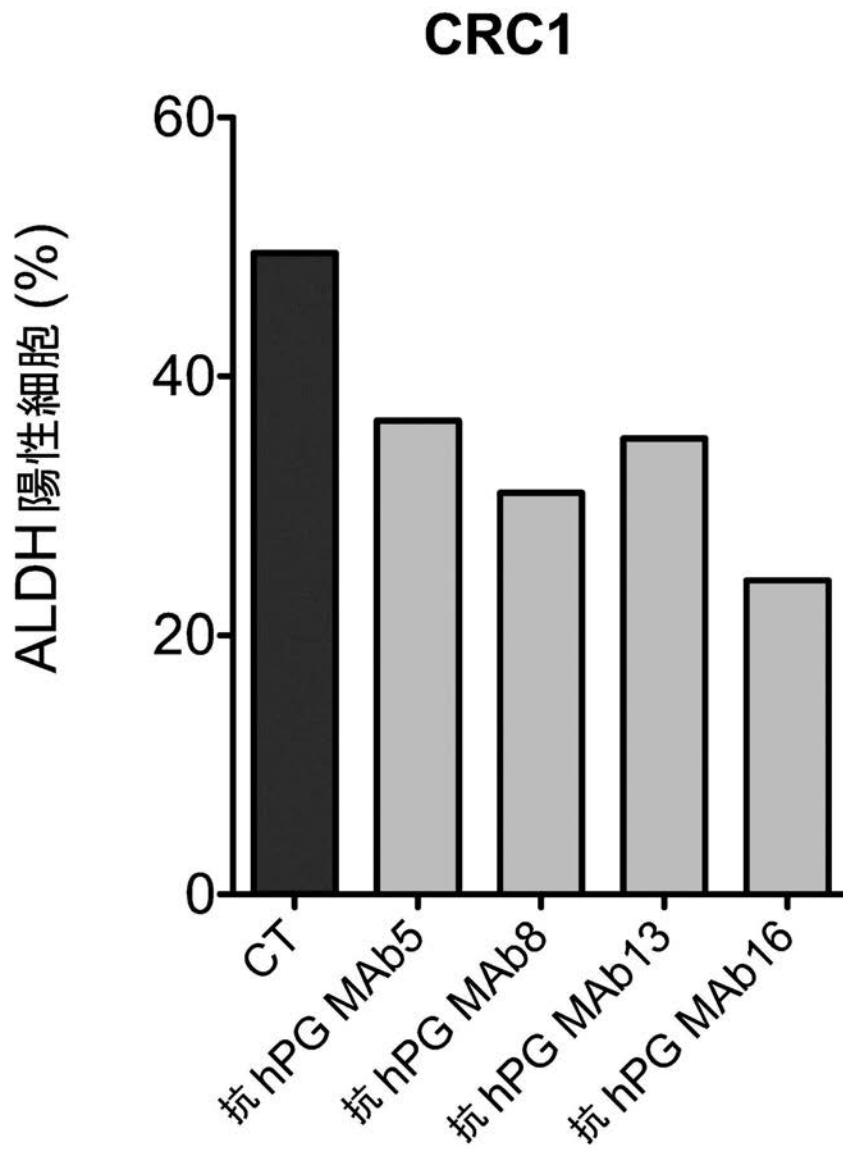
【 図 2 0 】



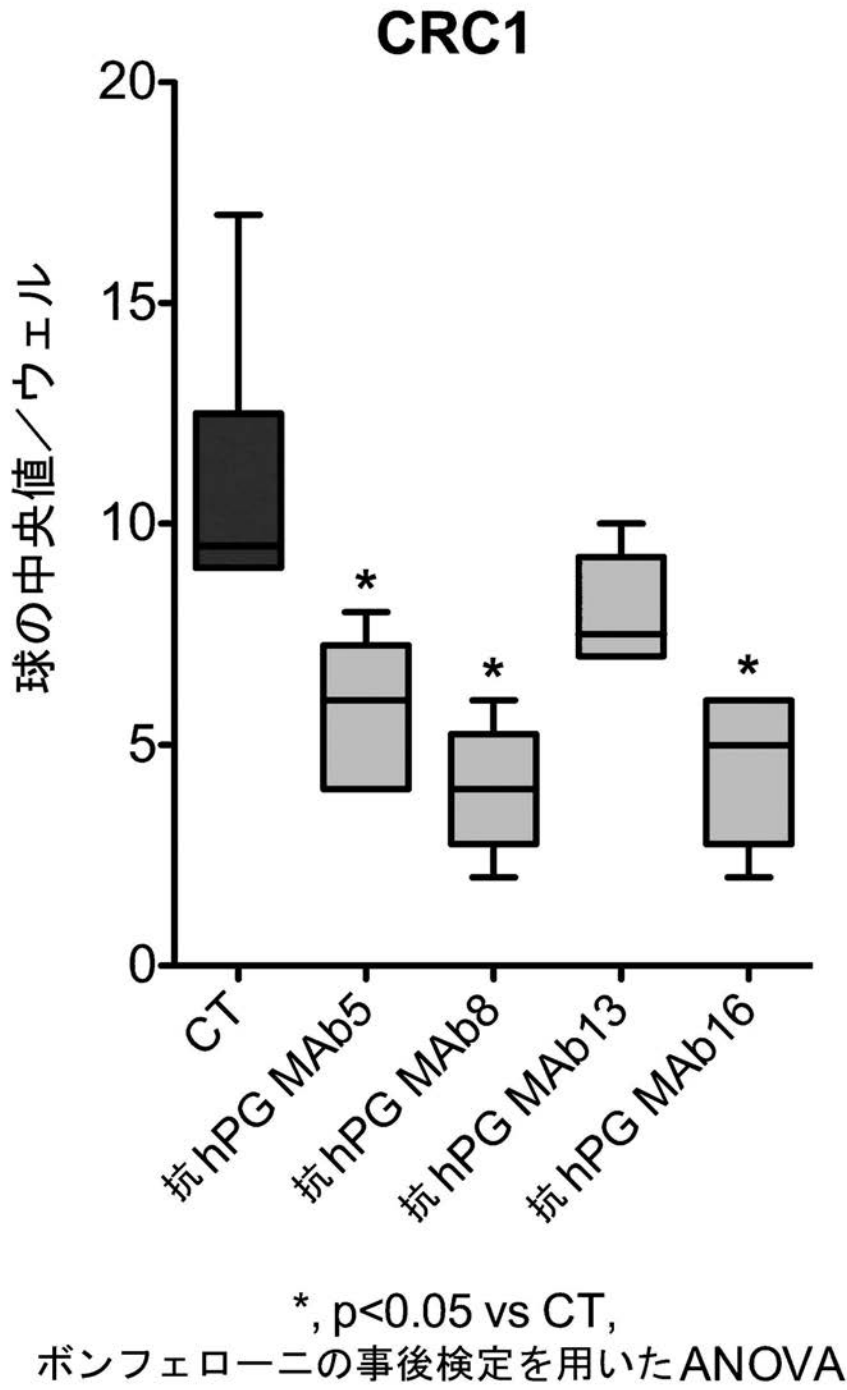
【 図 2 1 】

**T84 細胞 , ALDH-陽性集団**\*,  $p < 0.05$ , ANOVA + ボンフェローニ

【 図 2 2 】

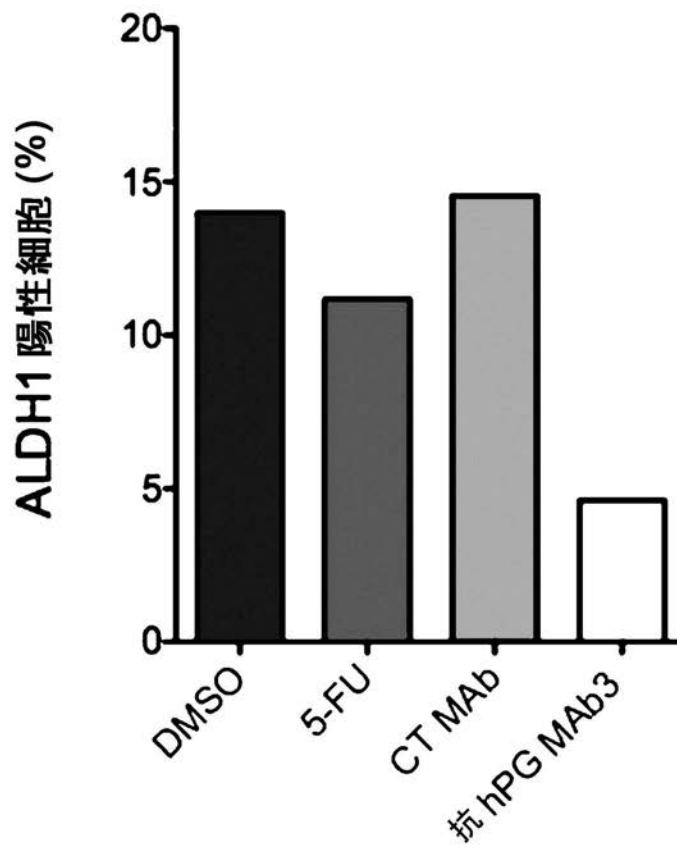


【 図 2 3 】



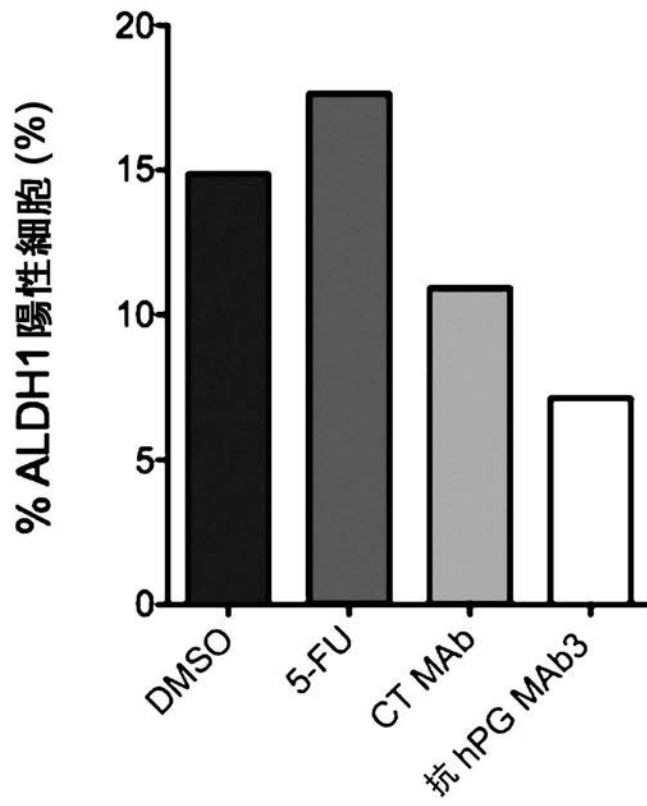
【 図 2 4 】

### T84\_2D / ALDH 陽性細胞

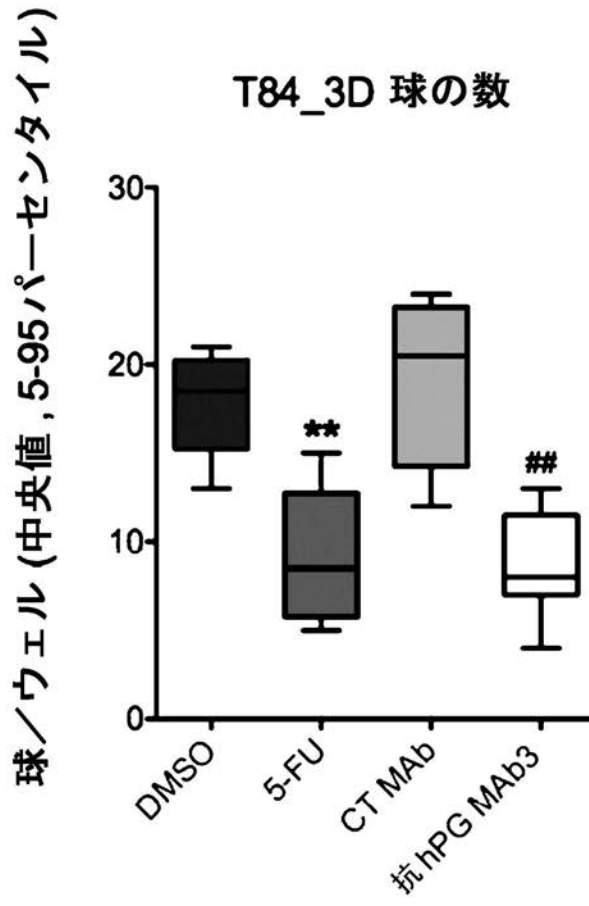


【 図 2 5 】

### SW620\_2D / ALDH 陽性細胞

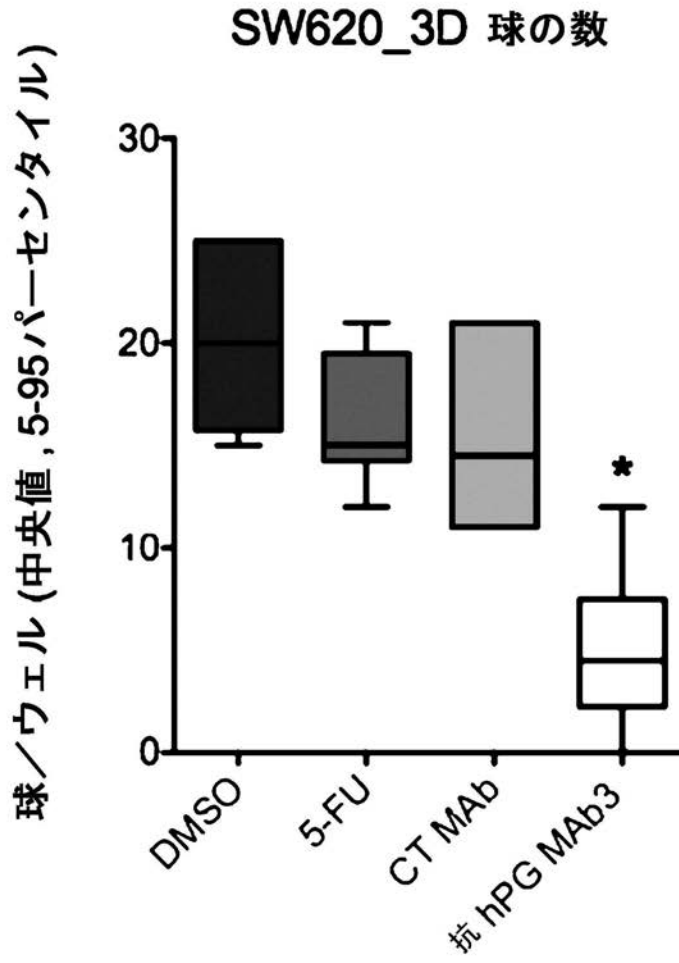


【 図 2 6 】



\*\* ,  $p=0.0043$  対 DMSO 及び ## ,  $p=0.0078$  対 CT MAb, 両側マンホイットニー

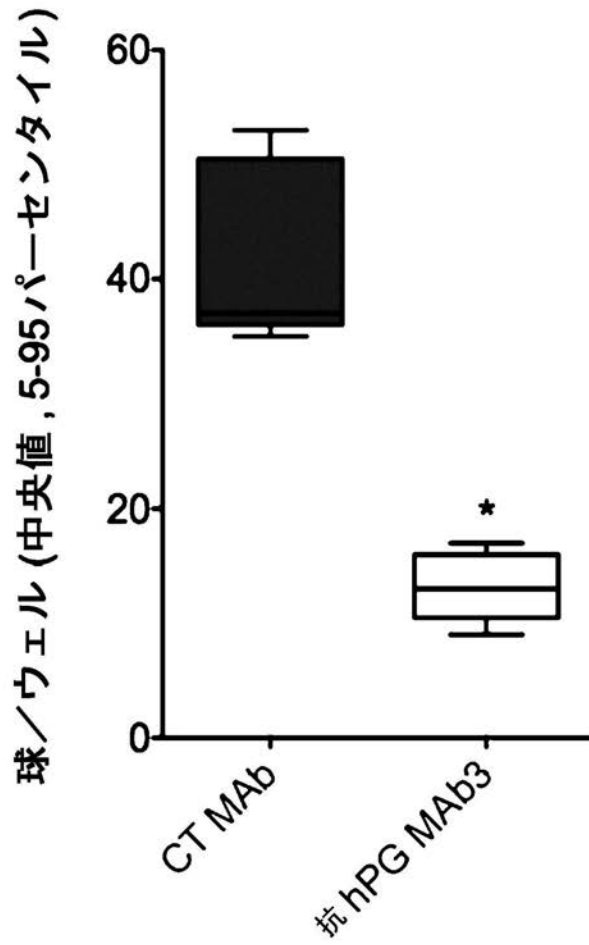
【 図 2 7 】



\*,  $p=0,0159$ , 両側マンホイットニー

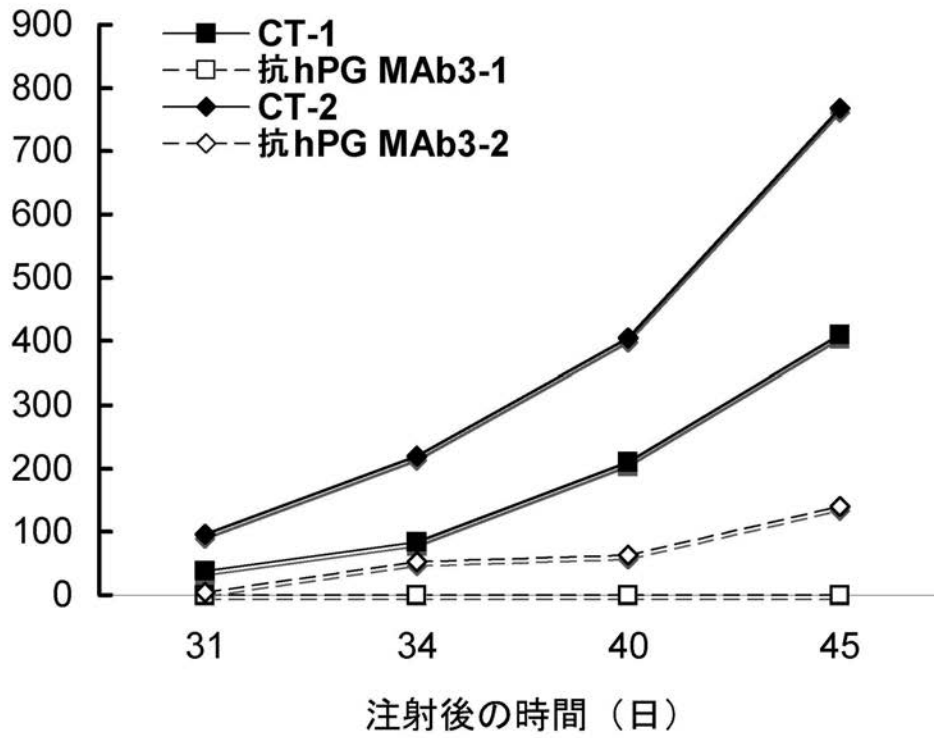
【 図 2 8 】

### SW620\_post in vivo 球の数



\*,  $p=0.0119$  vs CT MAb, 両側マンホイットニー

【 図 2 9 】



【 図 3 0 】

プレプロガストリン:  
 M QRLCVYVLI F ALALAAFSEA SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG  
 -21 -11 -1 +1 11 21

配列番号 100

PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN  
 31 41 51 61 71

プロガストリン:  
 SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG  
 +1 11 21

配列番号 101

PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN  
 31 41 51 61 71

**G34:**

SEQ ID NO:102

QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD F-NH<sub>2</sub>  
 41 51 61 71

**G34-Gly:**

配列番号 103

QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FG  
 41 51 61 71

**G17:**

配列番号 104

QGPWLE EEEEAYGWMD F-NH<sub>2</sub>  
 61 71

**G17-Gly:**

配列番号 105

QGPWLE EEEEAYGWMD FG  
 61 71

**CTFP:**

配列番号 106

SAEDEN  
 75

【 配列表 】

2013516437000001.app

【 手続補正書 】

【提出日】平成24年9月5日(2012.9.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

転移性結腸直腸癌を予防、再発予防又は処置するための方法において使用するための、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物であって、治療的に効果的な量の組成物がその処置を必要にある患者に投与される、組成物。

【請求項2】

転移性結腸直腸癌が、肝臓、肺、脳、又はリンパ節に位置する、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項3】

抗プロガストリン抗体組成物の投与が、転移性結腸直腸腫瘍の外科的切除の前又は後に遂げられる、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項4】

抗プロガストリン抗体組成物の投与が、転移性結腸直腸腫瘍の放射線治療の用量の投与の前又は後に遂げられる、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項5】

抗プロガストリン抗体組成物の投与が、転移性結腸直腸腫瘍を処置するための化学療法剤の投与の前、同時又は後に遂げられる、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項6】

抗プロガストリン抗体組成物の投与が、プロガストリン以外についての特異性を有する第2の治療用抗体の投与の前、同時又は後に遂げられる、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項7】

第2の抗体がVEGF又はEGFRに特異的に結合する、請求項6記載の使用のための組成物。

【請求項8】

抗プロガストリン抗体が、以下：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、及びIgM抗体からなる群の間より選択される、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項9】

抗体を成分に結合させる、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項10】

抗体が、少なくとも約0.001nM~少なくとも約5000nMのプロガストリン結合親和性を有する、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項11】

組成物が、プロガストリンの別のエピトープについての特異性を有する複数の抗体を含む、請求項1記載の使用のための組成物。

【請求項12】

プロガストリン特異的抗体が、以下：MAb1、MAb2、MAb3、MAb4、MAb5、MAb6、MAb7、MAb8、MAb9、MAb10、MAb11、MAb12、MAb13、MAb14、MAb15、MAb16、MAb17、MAb18、MAb19、MAb20、MAb21、MAb22、及びMAb23からなる群より選択されるモノクローナル抗体である、請求項1記載の使用のための組成物。

## 【請求項 13】

モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項 12 記載の 使用のための組成物。

## 【請求項 14】

プロガストリン特異的抗体が、

相補性決定領域 1 (CDR1) が  $V_H$  CDR 1.3、 $V_H$  CDR 1.4、 $V_H$  CDR 1.8、 $V_H$  CDR 1.13、 $V_H$  CDR 1.16、 $V_H$  CDR 1.19 より選択され、CDR2 が  $V_H$  CDR 2.3、 $V_H$  CDR 2.4、 $V_H$  CDR 2.8、 $V_H$  CDR 2.13、 $V_H$  CDR 2.16、 $V_H$  CDR 2.19 より選択され、CDR3 が  $V_H$  CDR 3.3、 $V_H$  CDR 3.4、 $V_H$  CDR 3.8、 $V_H$  CDR 3.13、 $V_H$  CDR 3.16、 $V_H$  CDR 3.19 より選択される、重鎖可変領域 ( $V_H$ )、及び / 又は

相補性決定領域 1 (CDR1) が  $V_L$  CDR 1.3、 $V_L$  CDR 1.4、 $V_L$  CDR 1.8、 $V_L$  CDR 1.13、 $V_L$  CDR 1.16、 $V_L$  CDR 1.19 より選択され、CDR2 が  $V_L$  CDR 2.3、 $V_L$  CDR 2.4、 $V_L$  CDR 2.8、 $V_L$  CDR 2.13、 $V_L$  CDR 2.16、 $V_L$  CDR 2.19 より選択され、CDR3 が  $V_L$  CDR 3.3、 $V_L$  CDR 3.4、 $V_L$  CDR 3.8、 $V_L$  CDR 3.13、 $V_L$  CDR 3.16、 $V_L$  CDR 3.19 より選択される、軽鎖可変領域 ( $V_L$ )

を含むモノクローナル抗体である、請求項 1 記載の 使用のための組成物。

## 【請求項 15】

抗プロガストリン抗体が約 0.001 mg/kg ~ 約 250 mg/kg の用量で投与される、請求項 1 記載の 使用のための組成物。

## 【請求項 16】

抗プロガストリン抗体の用量が、複数の時間間隔の投与にわたり投与される、請求項 15 記載の 使用のための組成物。

## 【請求項 17】

結腸直腸癌幹細胞の成長の阻害を必要とする患者に、該結腸直腸癌幹細胞を阻害するために効果的な量で、プロガストリンに特異的に結合する抗体を含む組成物を投与する工程を含む、患者において結腸直腸癌幹細胞の成長を阻害するための方法。

## 【請求項 18】

患者において転移性結腸直腸癌のための処置の効力をモニターするための方法であって、以下の工程：(i) 転移性結腸直腸癌のための処置前に患者から得られた第 1 サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定すること、及び、(ii) 該第 1 サンプル中のプロガストリンの濃度を、転移性結腸直腸癌のための処置後に同じ患者から得られた第 2 サンプル中のそれと比較することを含み、ここで、該第 1 サンプルと比較した、該第 2 サンプル中のプロガストリンの濃度における低下は、処置が効果的であったことを示す、方法。

## 【請求項 19】

患者において結腸直腸癌の存在を診断するための方法であって、以下の工程：(i) 結腸直腸癌を有することが疑われる患者から得られたサンプルにおけるプロガストリンの濃度を決定すること、及び、(ii) 該サンプル中のプロガストリンの濃度を所定値と比較することを含み、ここで、所定値と比較した、サンプル中のプロガストリンの上昇レベルは、該患者における結腸直腸癌の存在を示す、方法。

## 【請求項 20】

サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定する工程が、プロガストリンに特異的に結合する抗体を用いたアッセイを使用して遂げられる、請求項 18 及び 19 記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP2011/000046
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/000046

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/26 A61K39/395 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/135542 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV MONTPE) 29 November 2007 (2007-11-29)	1, 16-18, 35
Y	the whole document in particular, pages 5-6, 8 and 13-15	2-15, 19-34, 36, 85-102, 121, 123-133, 135, 136
Y	----- WO 2008/076454 A1 (UNIV TEXAS [US]) 26 June 2008 (2008-06-26) the whole document in particular, pages 9-12 and 16-17 ----- -/--	2-15, 19-34, 36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 August 2011		26/08/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Pérez-Mato, Isabel

6

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/000046

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/032980 A1 (APHTON CORP [US]; GRIMES STEPHEN [US]) 30 March 2006 (2006-03-30)	117-120, 122,134
Y	the whole document in particular, pages 3-4 and 7-8	2-15, 19-34, 36, 85-116, 121, 123-133, 135,136
Y	----- SIDDHESHWAR R K ET AL: "Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma", GUT, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, UK, vol. 48, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 47-52, XP002398546, ISSN: 0017-5749, DOI: DOI:10.1136/GUT.48.1.47 the whole document	2-15, 19-34,36
Y	----- SINGH P ET AL: "GASTRIN GENE EXPRESSION IS REQUIRED FOR THE PROLIFERATION AND TUMORIGENICITY OF HUMAN COLON CANCER CELLS", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER REREARCH, US, vol. 56, no. 18, 15 September 1996 (1996-09-15), pages 4111-4115, XP008057032, ISSN: 0008-5472 the whole document	2-15, 19-34,36
Y	----- PANNEQUIN ET AL: "beta-Catenin/Tcf-4 Inhibition After Progastrin Targeting Reduces Growth and Drives Differentiation of Intestinal Tumors", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 133, no. 5, 24 October 2007 (2007-10-24), pages 1554-1568, XP022407062, ISSN: 0016-5085, DOI: DOI:10.1053/J.GASTRO.2007.08.023 the whole document	2-15, 19-34,36
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/000046

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOLLANDE FRÉDÉRIC ET AL: "Adherens junctions and tight junctions are regulated via different pathways by progastrin in epithelial cells", JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 116, no. Pt 7, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 1187-1197, XP002511534, ISSN: 0021-9533, DOI: DOI:10.1242/JCS.00321 the whole document	2-15, 19-34,36
Y	SINGH POMILA ET AL: "Development of progastrin (PG) specific monoclonal antibodies (MAbs) and PG specific vaccine for attenuating growth factor effects of autocrine and endocrine PG-like peptides on colon cancer cells and colon carcinogenesis, respectively.", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 48, April 2007 (2007-04), page 845, XP9146815, & 98TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; LOS ANGELES, CA, USA; APRIL 14 -18, 2007 ISSN: 0197-016X abstract	2-15, 19-34,36
Y	CICCOTOSTO G D ET AL: "Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma.", GASTROENTEROLOGY OCT 1995 LNKD-PUBMED:7557079, vol. 109, no. 4, October 1995 (1995-10), pages 1142-1153, XP002631233, ISSN: 0016-5085 the whole document	2-15, 19-34,36
Y	SINGH POMILA ET AL: "Mice overexpressing progastrin are predisposed for developing aberrant colonic crypt foci in response to AOM", 20000301, vol. 278, no. 3 part 1, 1 March 2000 (2000-03-01), pages G390-G399, XP002188103, the whole document	2-15, 19-34,36

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/000046

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SINGH P ET AL: "PROGASTRIN EXPRESSION PREDISPOSES MICE TO COLON CARCINOMAS AND ADENOMAS IN RESPONSE TO A CHEMICAL CARCINOGEN", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 119, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 162-171, XP001053110, ISSN: 0016-5085, DOI: DOI:10.1053/GAST.2000.8527 the whole document</p> <p>-----</p>	2-15, 19-34,36
Y	<p>HECHT J RANDOLPH: "Current and emerging therapies for metastatic colorectal cancer: applying research findings to clinical practice", AMERICAN JOURNAL OF HEALTH-SYSTEM PHARMACY, AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, UNITED STATES, vol. 65, no. 11, suppl. 4, 1 June 2008 (2008-06-01), pages S15-S24, XP009126612, ISSN: 1079-2082, DOI: DOI:10.2146/AJHP080102 the whole document</p> <p>-----</p>	2-15
Y	<p>AKIHIRO TAMIYA ET AL: "Safety of bevacizumab treatment in combination with standard chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a retrospective review of 65 Japanese patients", INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, SPRINGER-VERLAG, TO, vol. 14, no. 6, 5 December 2009 (2009-12-05), pages 513-517, XP019763960, ISSN: 1437-7772, DOI: DOI:10.1007/S10147-009-0911-6 the whole document</p> <p>-----</p>	11-14
Y	<p>JEAN GARY W AND SHAH SACHIN R: "Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer", PHARMACOTHERAPY, BOSTON, US, vol. 28, no. 6, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 742-754, XP008123162, ISSN: 0277-0008 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	11-15

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/000046

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PETKOVA STEFKA B ET AL: "Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 18, no. 12, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 1759-1769, XP002539987, ISSN: 0953-8178, DOI: DOI:10.1093/INTIMM/DXL110 the whole document	19,20
X	US 2001/039017 A1 (WALDMAN SCOTT A [US] ET AL) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document in particular, page 12, paragraphs 142-153	37-62
X	WO 2009/099649 A1 (PONIARD PHARMACEUTICALS INC [US]; MARTELL RONALD A [US]; KARLIN DAVID) 13 August 2009 (2009-08-13) the whole document in particular, page 11, lines 23-29	63-84
Y	US 2009/275546 A1 (SIGNORE MICHELE [IT] ET AL) 5 November 2009 (2009-11-05) the whole document	85-102
Y	WO 2004/090547 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; WILSON KIETH E [US]; RAO SUNIL J [US]; M) 21 October 2004 (2004-10-21) the whole document in particular, page 4, lines 5-18	103-116

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/000046

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007135542 A2	29-11-2007	AU 2007252986 A1	29-11-2007
		CA 2652768 A1	29-11-2007
		CN 101460196 A	17-06-2009
		EP 2040753 A2	01-04-2009
		JP 2009537627 A	29-10-2009
		US 2010209426 A1	19-08-2010
-----	-----	-----	-----
WO 2008076454 A1	26-06-2008	US 2008187577 A1	07-08-2008
-----	-----	-----	-----
WO 2006032980 A1	30-03-2006	AU 2005286164 A1	30-03-2006
		CA 2580965 A1	30-03-2006
		CN 101048659 A	03-10-2007
		EP 1794586 A1	13-06-2007
		JP 2008513536 A	01-05-2008
		KR 20070100236 A	10-10-2007
-----	-----	-----	-----
US 2001039017 A1	08-11-2001	US 2005164267 A1	28-07-2005
		US 2005196793 A1	08-09-2005
		US 2009215089 A1	27-08-2009
		US 2011086064 A1	14-04-2011
-----	-----	-----	-----
WO 2009099649 A1	13-08-2009	AU 2009210654 A1	13-08-2009
		AU 2009210656 A1	13-08-2009
		AU 2009210734 A1	13-08-2009
		CA 2715329 A1	13-08-2009
		CA 2715348 A1	13-08-2009
		CA 2715353 A1	13-08-2009
		CN 102006875 A	06-04-2011
		CN 102014624 A	13-04-2011
		CN 101998851 A	30-03-2011
		EP 2249644 A2	17-11-2010
		EP 2249827 A1	17-11-2010
		EP 2244714 A1	03-11-2010
		JP 2011511071 A	07-04-2011
		JP 2011511072 A	07-04-2011
		JP 2011511074 A	07-04-2011
		US 2011052580 A1	03-03-2011
		US 2011052581 A1	03-03-2011
		US 2011053879 A1	03-03-2011
		WO 2009099634 A2	13-08-2009
		WO 2009099651 A1	13-08-2009
-----	-----	-----	-----
US 2009275546 A1	05-11-2009	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO 2004090547 A2	21-10-2004	US 2005074793 A1	07-04-2005
-----	-----	-----	-----

International Application No. PCT/ EP2011/ 000046

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-36

directed to a method of treating metastatic colorectal cancer comprising administering an antibody that specifically binds to progastrin and to a kit for said method.

---

2. claims: 37-84

directed to a method of preventing metastatic colorectal cancer or the recurrence of colorectal cancer comprising administering an antibody that specifically binds to progastrin.

---

3. claims: 85-102

directed to a method of inhibiting the growth of a colorectal cancer stem cell in a patient, comprising administering an antibody that specifically binds to progastrin.

---

4. claims: 103-116

directed to a method of monitoring the efficacy of a treatment for metastatic colorectal cancer in a patient comprising determining the concentration of progastrin in a sample from the patient before and after treatment.

---

5. claims: 117-135

directed to a method of diagnosing the presence of colorectal cancer in a patient comprising determining the concentration of progastrin in a sample obtained from said patient.

---

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	A 6 1 P	43/00	1 0 5
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	B
C 0 7 K 16/26 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K	16/26	
	C 1 2 N	15/00	A

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

- (71) 出願人 595040744  
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・シャンティフィック  
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
 フランス国、7 5 7 9 4 パリ・セデックス 1 6、リュ・ミシェル・アンジュ 3
- (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国
- (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇
- (74) 代理人 100131808  
 弁理士 柳橋 泰雄
- (74) 代理人 100119079  
 弁理士 伊藤 佐保子
- (74) 代理人 100135873  
 弁理士 小澤 圭子
- (74) 代理人 100141357  
 弁理士 鈴木 音哉
- (74) 代理人 100146422  
 弁理士 田中 聖
- (74) 代理人 100147533  
 弁理士 岡崎 祐一
- (74) 代理人 100181102  
 弁理士 後藤 孝明
- (74) 代理人 100116528  
 弁理士 三宅 俊男
- (72) 発明者 パネカン, ジュリー  
 フランス国、エフ - 3 4 2 0 0 セット、リュ・アンリ・バルピュス 1 3
- (72) 発明者 ウーウー, レイラ  
 フランス国、エフ - 3 4 0 9 0 モンペリエ、リュ・ルノ・ドゥ・ヴィルヌーヴ 2
- (72) 発明者 フラメリー, ベレニス  
 フランス国、エフ - 3 4 0 7 0 モンペリエ、リュ・ドゥ・ラ・ソルブ 1 4 6 9、パティマン・セ・レズィダンス・ラ・クロズリー・デュ・マ・ドゥ・テス、アパルトマン 5 1
- (72) 発明者 エルキリク, ネジラ  
 フランス国、エフ - 3 4 9 9 0 ジュヴィニャック、リュ・ドゥ・ラ・コンブ・デュ・ルナール

## 11、レズィダンス・ル・ドメーヌ・ドゥ・ラ・フォンテーヌ

(72)発明者 ジュベール, ドミニク

フランス国、エフ - 3 4 2 0 0 セット、リュ・ガブリエル・ペリ 10

(72)発明者 オランド, フレデリク

フランス国、エフ - 3 4 7 9 0 グラベル、リュ・デ・カブリエール 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA55 CA02

4C085 AA13 AA14 AA16 AA19 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37

BB41 BB43 BB44 CC02 CC22 CC23 EE01 EE03 GG01 GG02

GG03 GG04 GG06

4H045 DA75 EA20

专利名称(译)	治疗结肠直肠癌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013516437A</a>	公开(公告)日	2013-05-13
申请号	JP2012547492	申请日	2011-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	Biorearite 拜若提 法国国家健康医学研究院 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	Biorearite Anutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 中心法国国家，香提网络点击		
[标]发明人	パネカンジュリー ウーウーレイラ フラメリーベレニス エルキリクネジラ ジュベールドミニク オランドフレデリク		
发明人	パネカン,ジュリー ウーウー,レイラ フラメリー,ベレニス エルキリク,ネジラ ジュベール,ドミニク オランド,フレデリク		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 A61P35/04 A61P1/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/574 C07K16/26 C12N15/09		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 C07K5/1016 C07K16/26 C07K16/3046 C07K2317/24 C07K2317/73 C07K2317/76 G01N33/57419 G01N2333/595 G01N2800/52 A61K39/39558		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.E A61K39/395.T A61P35/00 A61P35/04 A61P1/00 A61P43/00.105 G01N33/53.B G01N33/574.A C07K16/26 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA01 4B024/BA55 4B024/CA02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085 /AA19 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085 /GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4H045/DA75 4H045/EA20		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 田中 圣 冈崎雄一 后藤孝明 三宅 俊男		
优先权	61/367855 2010-07-26 US 61/293612 2010-01-08 US		
其他公开文献	JP5930972B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本公开内容涉及使用包含抗前胃泌素抗体的组合物治疗和预防结肠直肠癌转移或结肠直肠癌复发的方法。

表 1A

N 聚体抗前胃泌素抗体

抗体 名称	抗体 ID	抗体 名称	抗体 ID	抗体 名称	抗体 ID
N1 HER011	M061	HER011	M061		
		HER012	M062		
		HER013	M063		
		HER014	M064		
N2 HER015	M065	HER015	M065		
		HER016	M066		
		HER017	M067		
		HER018	M068		
		HER019	M069		
		HER020	M070		
		HER021	M071		
		HER022	M072		
		HER023	M073		
		HER024	M074		
HER025	M075				
N3 HER026	M076	HER026	M076		
		HER027	M077		
		HER028	M078		
		HER029	M079		
		HER030	M080		
		HER031	M081		
		HER032	M082		
		HER033	M083		
		HER034	M084		
		HER035	M085		
N4 HER036	M086	HER036	M086		
		HER037	M087		
		HER038	M088		
		HER039	M089		
		HER040	M090		
		HER041	M091		
		HER042	M092		
		HER043	M093		
		HER044	M094		
		HER045	M095		