(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年10月14日(14.10.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/206078 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A61K 41/00* (2020.01)
A61K 31/409 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/014588

(22) 国際出願日： 2021年4月6日(06.04.2021)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2020-068071 2020年4月6日(06.04.2020) JP

(71) 出願人:株式会社ＰｈｏｔｏＱ３ **(PHOTOQ3 INC.)** [JP/JP]; 〒1020084 東京都千代田区２番町５番地２ ▲麹▼町駅プラザ９０１ Tokyo (JP).

(72) 発明者:戸田 奈緒子 **(TODA Naoko)**; 〒1020084 東京都千代田区２番町５番地２ ▲麹▼町駅プラザ９０１ 株式会社ＰｈｏｔｏＱ３内 Tokyo (JP). 須藤 幸夫 **(SUDO Yukio)**; 〒1020084 東京都千代田区２番町５番地２ ▲麹▼町駅プラザ９０１ 株式会社ＰｈｏｔｏＱ３内 Tokyo (JP). 浜窪 隆雄 **(HAMAKUBO Takao)**; 〒1020084 東京都千代田区２番町５番地２ ▲麹▼町駅プラザ９０１ 株式会社ＰｈｏｔｏＱ３内 Tokyo (JP).

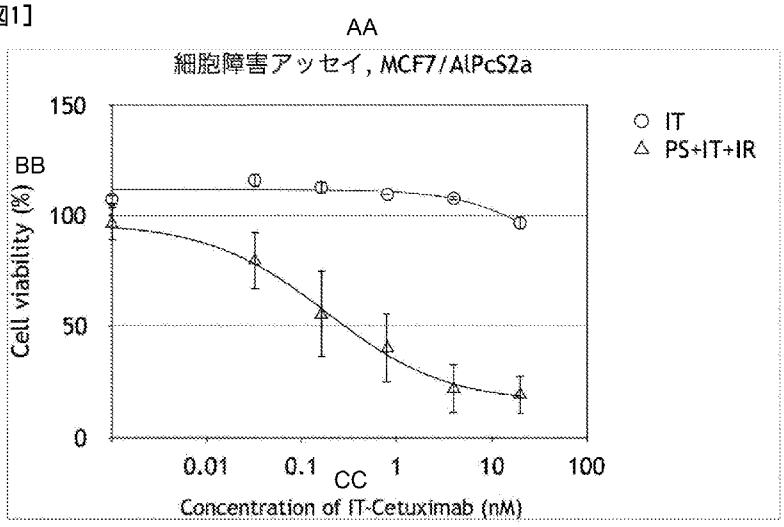
(74) 代理人:特許業務法人特許事務所サイクス **(SIKS & CO.)**; 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

(54) **Title:** MEDICINE FOR KILLING TUMOR CELLS

(54) 発明の名称： 腫瘍細胞を死滅させるための医薬

[図1]



AA Cytotoxicity assay, MCF7/AlPcS2a
BB Cell viability (%)
CC Concentration of IT-Cetuximab (nM)

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a medicine for killing tumor cells, said medicine having few side effects. According to the present invention, provided is a medicine, said medicine comprising a conjugate of a substance capable of binding to a target substance on the surface of tumor cells and a cytotoxin, and a photosensitive dye, and being for killing tumor cells in which the target substance is expressed in a small amount.

WO 2021/206078 A1

[続葉有]

HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：本発明の課題は、副作用の少ない、腫瘍細胞を死滅するための医薬を提供することである。本発明によれば、腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物；及び 光増感色素；を含む、該標的物質の発現量が少ない腫瘍細胞を死滅させるための医薬が提供される。

明　細　書

発明の名称 ： 腫瘍細胞を死滅させるための医薬

技術分野

[0001] 本発明は、腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物と、光増感色素とを含む、細胞表面上の標的物質の発現量の少ない腫瘍細胞を死滅させるための医薬に関する。

背景技術

[0002] 日本国内でがんで死亡する人は、年間37万人に上り、昭和56年より継続して死因の第一位である。これまでに、国内外で数多のがんに対する治療方法が開発されてきているが、特効薬は未だ生まれていない。

[0003] いわゆる低分子の抗癌剤（がん化学療法）が開発されてきているが、必ずしも薬効が強くないばかりか、強い副作用による患者への苦痛が大きく望ましい医薬とはいえない。抗体医薬は、がんへの特異性が強い特徴から、低分子抗癌剤にみられる強い副作用は軽減されることができ、広く使用されるようになってきているが、未だ固形がんに有効な、抗体医薬は数すくない。薬効を強化するために、ADC（抗体薬物複合体）が開発されてきているが、毒性面も含めて満足にいたってはいない。

[0004] また、新規の抗体医薬である免疫治療抗体（チェックポイント阻害剤）は、新規メカニズムで広いガン種に強い薬効をしめしているが、効果のある患者がかならずしも多くなく、かつ場合によっては死に至るような激烈な副作用を示すことがわかってきている。

[0005] しかし、ADCを含む抗体医薬には、抗体の結合する腫瘍細胞表面抗原の発現数が多くないと効果がでないというもう一つの本質的な欠点が存在し、通常は抗体の結合する標的物質は１細胞当たり約10万分子くらいはないと期待できる薬効が発揮できないと考えられている。

[0006] 腫瘍組織中での標的抗原の発現量は腫瘍細胞間で必ずしも均一ではなく、発現量の少ない腫瘍細胞には効果が発揮できなくなる。また、患者により標

的の発現数が異なり、発現量の多い一部の患者しか効果が発揮できなくなる。これらの本質的な欠点は、奏効率が想定より低いという結果となる。

[0007] 別のアプローチとして、治療部位を限局化し副作用を軽減するという考えから、エンドゾーム膜に局在化しやすい光増感色素とイムノトキシンの組み合わせにより、光増感色素に光を照射することによりエンドゾームに取り込まれたイムノトキシン（またはその断片を）を細胞質内に放出することにより、腫瘍細胞を破壊する方法も考案されている。しかし、これまでにはイムノトキシンの結合する腫瘍細胞表面上の標的が高発現していなければ効果が認められていなかった。例えば、腫瘍細胞表面標的がEGFRの場合でも、標的が高発現している細胞株での薬効の発現例しか報告されていない（非特許文献１）。通常の抗体医薬同様に腫瘍細胞表面標的の発現量が少ない腫瘍細胞には効果がないと考えられている。

[0008] このように、腫瘍細胞を死滅させるために抗体を使用する場合は、該腫瘍細胞上に該標的物質が高発現していることが必須要件であった。一方、臨床的には、腫瘍細胞表面上の標的物質の発現量は、患者間、患者内（原発部位と転移部位）、癌組織内でも不均一なことが多く、この結果として、治療の効果の出る範囲が狭まってくるという問題を生じさせていた。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Targeted Delivery and Enhanced Cytotoxicity of Cetuximab-Saporin by Photochemical Internalization in EGFR-Positive Cancer Cells： Wai Lam Yip,† Anette Weyergang,† Kristian Berg,† Hanne H. Tonnesen,‡ and Pal K. Selbo*,† MOLECULAR PHARMACEUTICS 2007 (VOL. 4), NO. 2, 241-251

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明者らは、そのような状況下で、標的抗原の発現量が少ない腫瘍細胞

に対する、副作用の少なく、薬効の強い医薬品の開発の必要性を感じ、本開発に至った。本発明は、標的抗原の発現量が少ない腫瘍細胞に対する、副作用の少ない、腫瘍細胞を死滅するための医薬を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 我々は、標的抗原の発現量が少ない腫瘍細胞に対する医薬品を考えた場合、薬効の生じる範囲を限局化するため腫瘍部位に光を照射して薬効を生じさせる方法を考えた。

この発明における標的抗原の発現量が少ないとは、通常の抗体医薬（ADCを含む）では、薬効の発揮しづらい１細胞あたり20,000分子以下の発現を想定している。

[0012] エンドゾーム膜に局在化しやすい光増感色素とイムノトキシンを組合わせた腫瘍細胞を破壊する方法も考案されてきている。この方法では、エンドゾーム膜に光増感色素を集積させこれに光を照射することによりエンドゾーム膜を破壊することにより、エンドゾーム膜内に取り込まれているイムノトキシン（またはその断片）を細胞質内に放出し腫瘍細胞を破壊すると考えられている方法である。局所的な光照射と、腫瘍細胞に結合するイムノトキシンの特異性により特異的な効果が期待されている。

[0013] しかしながら、この手法においても、前述したようにイムノトキシンの結合する細胞表面上の標的物質の発現量が多くなければ、効果がないと考えられていた。

[0014] 我々は、これまでの問題を解決するために、鋭意努力した結果、光増感色素と、腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物を、腫瘍細胞に接触させ、光照射量・時間等を調節することにより、該腫瘍細胞表面の標的物質の発現量が従来認められていたよりも著しく低い場合でも概腫瘍細胞に対する細胞障害性が発生することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0015] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

＜１＞　腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物；及び光増感色素；

を含む、該標的物質の発現量が少ない腫瘍細胞を死滅させるための医薬。

＜２＞　該標的抗原の発現量が１細胞当たり２万分子以下である、＜１＞に記載の医薬。

＜３＞　標的物質の発現量が細胞当たり２万分子以下である腫瘍細胞を含む腫瘍細胞群を死滅させるための医薬である、＜１＞又は＜２＞に記載の医薬。

＜４＞　腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質が、抗体、抗体断片、 リガンド、又はペプチドである、＜１＞から＜３＞の何れか一に記載の医薬。

＜５＞　細胞毒が　サポリン、ゲロニン、または緑膿菌外毒素である、＜１＞から＜４＞の何れか一に記載の医薬。

＜６＞　光増感色素が　タラポルフィンナトリウム、ポルフィマーナトリウム、AlPcS2a　またはTPCS2a である、＜１＞から＜５＞の何れか一に記載の医薬。

＜７＞　腫瘍細胞が、細胞表面にEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR、ERBB1,ERBB2,ERBB3,ERBB4)， Mesothelin,Ephrin type-A receptor 2 (EphA2) ,Glypican3(GPC3),Cadherin17(CDH17)、又はRoundabout homolog 1 (Robo1) を発現している細胞である、＜１＞から＜６＞の何れか一に記載の医薬。

＜８＞　腫瘍細胞が、頭頚部がん、肺がん，肝がん、大腸がん、皮膚がん、食道がん、胃がん、子宮けいがん、子宮内膜がん、中皮腫、脳腫瘍、悪性黒色腫、乳がん、胆管がん、膵がん、卵巣がん、腎がん、膀胱がん、前立腺がん又は悪性リンパ腫、骨肉腫の何れかのがん細胞である、＜１＞から＜７＞の何れか一に記載の医薬。

＜９＞　（１）前記結合物を腫瘍細胞と接触させる工程；

（２）光増感色素を前記腫瘍細胞と接触させる工程；及び

（３）光増感色素を活性化させるのに有効な波長で前記腫瘍細胞を照射する

ことにより前記細胞を死滅させる工程：

により腫瘍細胞を死滅させる、＜１＞から＜８＞の何れか一に記載の医薬。

＜１０＞　（１）前記結合物と、光増感色素とを腫瘍細胞と接触させる工程、及び

（２）その後、光増感色素を活性化させるのに有効な波長で前記腫瘍細胞を照射することにより前記細胞を死滅させる工程：

により腫瘍細胞を死滅させる、＜１＞から＜９＞の何れか一に記載の医薬。

[0016] ＜Ａ＞（１）発現量の少ない腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物を腫瘍細胞に接触させる工程；

（２）光増感色素を前記腫瘍細胞と接触させる工程；及び

（３）光増感色素を活性化させるのに有効な波長で前記腫瘍細胞を照射することにより前記細胞を死滅させること工程：

を含む、標的物質の発現量が少ない腫瘍細胞を死滅させる方法。

[0017] ＜Ｂ＞（１）発現量の少ない腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物と、光増感色素とを前記腫瘍細胞と接触させる工程、

（２）その後、該光増感色素を活性化させるのに有効な波長で前記腫瘍細胞を照射することにより前記細胞を死滅させる工程：を含む、標的物質の発現量が少ない腫瘍細胞を死滅させる方法。

発明の効果

[0018]　本発明によれば、副作用の少ない、腫瘍細胞を死滅させるための医薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図１は、MCF7細胞にアルミニウムフタロシアニンを使用した細胞傷害性試験における細胞生存率を示す。

[図2]図２は、MCF7細胞にタラポルフィンナトリウムを使用した細胞傷害性試験における細胞生存率を示す。

発明を実施するための形態

[0020]　以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

＜本発明の概要＞

本発明者等は、薬効が強く副作用の少ない標的抗原の発現量の少ない腫瘍の治療方法を検討した結果、光による局所的に薬効を強くする、光増感色素とイムノトキシンを組合わせるの手法に可能性があるのではと考えた。しかしながら、これまでこの手法では標的細胞の発現量の少ない細胞に効果を示すとは考えられていなかった。

[0021] そこで、本発明者等は鋭意努力した結果、タラポルフィリンナトリウムやAlPcS2a 等の光増感色素と、イムノトキシンのような「腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物」と、「腫瘍への光照射」とを組み合わせることにより、該標的物質の発現量が少ない腫瘍細胞にも薬効が強くかつ副作用の懸念が少ない治療方法を見出し、本発明を完成するに至った。

[0022] つまり、本発明においては、腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物が、腫瘍に結合したのちエンドソームに内包される。別途（または同時に）加えた光増感色素に光を照射して、エンドソーム内のイムノトキシン（またはその分解物）等を細胞質内に放出させ。腫瘍細胞を死滅させることができると考えている。

[0023] ＜腫瘍細胞上の標的抗原の発現量＞

当発明において、腫瘍細胞上の標的抗原の発現量が少ないということは、細胞当たりの発現量が　20,000分子　以下のことを意味している。細胞当たりの発現量は、FACS、ELISA等の通常の方法で測定することが可能である。また、免疫染色、MSプロテオミクス解析などの手法も考えられる。

また、当発明において腫瘍細胞上の標的抗原の発現量が少ないものにも効果を発揮できることが特徴であるが、これよりも発現量の多い腫瘍細胞にも効果があることは自明のことである。また、発現量の異なる腫瘍細胞群にも効果が期待できる。

[0024] ＜細胞を死滅させる方法に関する形態＞

本発明における、腫瘍細胞を死滅させる方法としては、（１）腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物、（２）および光増感色素

の共存在下で、（３）光増感色素を活性化させる波長の光を照射する形態があげられる。

[0025] さらに具体的形態として、（１）腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物を投与後、（２）光増感色素を投与し、その後 、（３）光増感色素を活性化させる波長の光を照射する ことによっても達成できる。

[0026] また別の形態としては、（１）光増感色素を投与後、（２）腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物を投与し、その後、（３）光増感色素を活性化させる波長の光を照射する ことによっても達成できる。

[0027] また、別の形態として、（１）腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物と（２）光増感色素とを同時に投与し、その後、（３）光増感色素を活性化させる波長の光を照射する ことによっても達成できる。

[0028] ＜光増感色素＞

本発明に用いられる光増感色素は、光による活性化により、光化学的細胞内移行を誘起する増感剤であり、好ましくは光による活性化により一重項酸素を発生させるものが好ましい。本発明に使用される、光増感色素の例としては、PCI (Photochemical Internalization：光化学的内部移行または光化学的細胞内移行)や、PDT (PhotodynamicTherapy、光線力学的療法)に提案され、または使用されている光増感色素をあげることができる。

[0029] 本発明で使用される、光増感剤の具体的な態様としては、タラポルフィンナトリウム（レザフィリン（登録商標））、ポルフィマーナトリウム（フォトフィリン（登録商標））、5アミノレプリン酸（Levulan（登録商標））、5アミノレピリンメチルエステル（Metvix（登録商標））を挙げることができる。

さらに別の態様としては、テトラフェニルクロリン2スルフォン酸（TPCS2a)及びその塩、ジスルフォン化されたアルミニウムフタロシアニン（AlPcS2、AlPcS2a)及びその塩を挙げることができる。

また、スルフォン化されたテトラフェニルポルフィリン（例えば $TPPS_{2a}$, T

PPS_4, $TPPS_1$ and $TPPS_{2o}$、）ナイルブルー、クロリン誘導体、バクテリオクロリン、ケトクロリン、天然及び合成のポルフィリンを挙げることができる。

[0030] さらに別の具体的な例としてプロトポルフィリンIX、フォスキャン、クロリン、ウロポルフィリンI、ウロポルフィリンIII、ヘプタカルボキシルポルフィリンI、ヘプタカルボキシルポルフィリンIII、ヘキサカルボキシルポルフィリンI、ヘキサカルボキシルポルフィリンIII、ペンタカルボキシルポルフィリンI、ペンタカルボキシルポルフィリンIII、コプロポルフィリンI、コプロポルフィリンIII、イソコプロポルフィリン、ハルデロポルフィリン、イソハルデロポルフィリン、ヘマトポルフィリン、メソポルフィリン、エチオポルフィリン、ピロポルフィリン、デューテロポルフィリンIX、ペンプトポルフィリン、ＡＴＸｓ－１０、５アミノレプリン酸誘導体等を挙げることができる。

[0031] 本発明で、使用される光増感剤は、可視光を吸収して活性化されてもいいが、長波長の可視光や、近赤外光を吸収することも好ましい。

このような増感剤としては シリコンフタロシアニンや亜鉛フタロシアニンとその誘導体をあげることができる。さらなる具体的な例としては、IR700（登録商標）とその誘導体を挙げることができる。

[0032] ＜腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質＞

腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質としては、抗体、リガント、またはペプチドなどを挙げることができるが、特に限定されない。

[0033] 腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質としては抗体を使用する場合には、腫瘍細胞表面上の標的物質（例えば、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR、ERBB1,ERBB2,ERBB3,ERBB4),Mesothelin,Ephrin type-A receptor 2 (EphA2) ,Glypican3(GPC3),Cadhelin17(CDH17)、Cadherin3 (CDH3) ,Roundabout homolog 1 (Robo1) 、CD20 等のタンパク質）に特異的に結合する抗体を使用することができる。

[0034] 本発明で用いる抗体の種類は特に制限されず、マウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、トリ抗体等や、ヒトに対

する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体 、例えば、キメラ抗体 、ヒト化抗体等の何れでもよい。遺伝子組換え型抗体 は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体 の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体 の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体 のCDRとヒト抗体 のフレームワーク領域（framework region；FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体 定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（EP 239400号公報 、国際公開WO96/02576号公報など）。

[0035] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をｉｎｖｉｔｒｏで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばＵ２６６と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体　を得ることもできる（特公平１－５９８７８参照）。また、ヒト抗体　遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体　を取得することができる（ＷＯ９３／１２２２７、ＷＯ９２／０３９１８、ＷＯ９４／０２６０２、ＷＯ９４／２５５８５、ＷＯ９６／３４０９６、ＷＯ９６／３３７３５参照）。さらに、ヒト抗体 ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体 を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体 の可変領域を一本鎖抗体 （scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたフ

ァージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体 の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／２０７９１、ＷＯ９３／０６２１３、ＷＯ９３／１１２３６、ＷＯ９３／１９１７２、ＷＯ９５／０１４３８、ＷＯ９５／１５３８８を参考にすることができる。

[0036] 腫瘍細胞に結合する抗体とは、好ましくはヒト化またはヒト抗体であるがそれに限定されるものではない。

[0037] また、これらの抗体は 腫瘍細胞表面上の抗原遺伝子によってコードされる蛋白質の全長または一部を認識する特性を失わない限り、抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。抗体の断片とは、ROBO1への結合能力を保持している抗体の部分である。抗体断片の具体例としては、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、Ｄｉａｂｏｄｙ、一本鎖抗体フラグメント（ｓｃＦｖ）などを挙げることができる。このような抗体断片を得るには、これら抗体 断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい。抗体 の修飾物として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体 を使用することもできる。

[0038] モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、慣用な方法（例えば、モノクローナル抗体 の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）により容易に単離、配列決定できる。ハイブリドーマ細胞はこのようなＤＮＡの好ましい出発材料である。一度単離したならば、ＤＮＡを発現ベクターに挿入し、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞または形質転換されなければ免疫グロブリンを産生しないミエローマ細胞等の宿主細胞へ組換え、組換え宿主細胞からモノクローナル抗体を産生させることができる。

[0039] 腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質として、リガントを使用すること

ができる。腫瘍細胞表面上の標的物質が、例えば、Epidermal Growth Factor Receptor（EGFR、ERBB1,ERBB2,ERBB3,ERBB4),Mesothelin,Ephrin type-A receptor 2（EphA2）などレセプターの場合には、上記レセプターに対するリガンドを使用することができる。

[0040] 腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質として、ペプチドを使用することもできる。腫瘍細胞表面の標的物質に結合するペプチドは、当業者であれば、設計及び製造することが可能である。

[0041] ＜細胞毒＞

細胞毒は、細胞毒性をもつ蛋白質が好ましいが、これに限定されるものではなく、ブレオマイシンのような合成・天然の抗癌作用を有する化合物や、ADCで使用される化合物であってもいい。

細胞毒性をもつ蛋白質の好ましい態様としては、サポリン、ゲロニン、緑膿菌外毒素、リシンＡ鎖、脱糖鎖リシンＡ鎖、リボゾーム不活性化タンパク質、アルファサルシン、アスペルギリン、リストリクトシン、リボヌクレアーゼ、エポドフィロトキシン、ジフテリアトキシン、シガトキシン及びその変異体、遺伝子組換体を挙げることができる。

また、エンドゾーム内から細胞質内に移行しづらい抗がん剤も使用することができる。

[0042] ＜腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物＞

腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒とは、直接または間接的に結合していなければならない。

腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質として抗体またはその断片を使用する場合、これと細胞毒とを直接化学的に結合させる方法は、既知のADC（Antibody Drug Conjugate；抗体薬物複合体）で用いられる結合方法を使用できる。また、細胞毒が蛋白質である場合には、2官能性の架橋剤を用いることも可能である。

[0043] また、細胞毒が蛋白質である場合は、トキシンと抗体またはその断片を遺伝子組換え的に融合した蛋白質とすることによりイムノトキシンを作成する

ことも可能である。

また別の方法として、抗体またはその断片と細胞毒とを、第二の結合対を用いて間接的に結合する手法を使用することも可能である。第２の結合対の例としては、アビジン-ビオチン、抗体-ハプテン等の利用が可能である。

[0044] また、本発明では抗体と毒素の結合したイムノトキシンの代わりに、腫瘍細胞表面の標的物質に結合するペプチド又はリガンドと、毒素との結合物を使用することも可能である。

[0045] ＜投与方法及び投与量＞

本発明の医薬を、腫瘍（例えば、がんなど）を有する被験体に投与する際の投与方法は特に限定されない。

腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物は、例えば、静脈投与、動脈投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、または経口投与により、投与することができる。

また、腫瘍組織及びその周辺に局所注射、塗布、噴霧などの方式で投与する方法もある。

光増感色素は、例えば、静脈投与、動脈投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、または経口投与により、投与することができる。また、腫瘍組織及びその周辺に局所注射、塗布、噴霧などの方式で投与するなどの方法もある。

[0046] 腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合の投与量は、特に限定されないが、例えば、１μｇ／体重ｋｇ～１００ｍｇ／体重ｋｇ、好ましくは１０μｇ／体重ｋｇ～１０ｍｇ／体重ｋｇで投与することはできる。

タラポルフィンナトリウムまたはポルフィマーナトリウムの投与量は、特に限定されないが、例えば、１μｇ／体重ｋｇ～１００ｍｇ／体重ｋｇ、好ましくは１０μｇ／体重ｋｇ～１０ｍｇ／体重ｋｇで投与することはできる。

[0047] 投与回数は特に限定されず、１回以上複数回（１回から２０回、好ましく

は１回から１０回）行うことができ、例えば、２～４週間毎に、又は１～２カ月毎に行うことができる。また、光照射回数も特に限定されず、１回以上複数回行う事ができる。

[0048] ＜対象となる細胞・疾患＞

本発明の医薬の投与の対象となる腫瘍は、Epidermal Growth Factor Receptor（EGFR、ERBB1,ERBB2,ERBB3,ERBB4),Mesothelin,Ephrin type-A receptor 2（EphA2）,Glypican3(GPC3),Cadhelin17(CDH17)、Cadhelin3（CDH3）,またはRoundabout homolog 1 （Robo1） 、CD20 等を表面に発現している腫瘍である。

[0049] 具体的には頭頚部がん、肺がん，肝がん、大腸がん、皮膚がん、食道がん、胃がん、子宮けいがん、子宮内膜がん、中皮腫、脳腫瘍、悪性黒色腫、乳がん、胆管がん、膵がん、卵巣がん、腎がん、膀胱がん、前立腺がん又は悪性リンパ腫、骨肉腫等のがんをあげることができる。

[0050] 以下に示す実施例は、EGFRの発現量が細胞当たり約15,000分子である腫瘍細胞株MCF7でも、EGFRが細胞当たり約30万分子である腫瘍細胞株A431と同様な効果がみられることを示しており、本発明を実証していることになる。

実施例

[0051] 実施例１：MCF7細胞にアルミニウムフタロシアニンを使用した細胞傷害性試験

＜材料の入手＞

EGFRの低発現株として、MCF7（ヒト乳腺癌細胞）を株式会社ケーエーシー（京都、日本）から入手した。光増感色素としてアルミニウムフタロシアニン（AlPcS2a）はFrontier Scientific社（ユタ）より購入したものを使用した。抗EGFR抗体のCetuximab、650 nm にピーク波長を持つLEDランプ（54 W）をKing Do Way (18PCS E27, Amazon.co.jp)より購入した。

[0052] ＜細胞培養＞

MCF7はイーグル培地最小必須培地（EMEM）に１０％のウシ胎児血清と非必須アミノ酸 を添加した培地を用い、37℃、CO2濃度5%の条件下にて培養を行

った。

[0053] ＜イムノトキシン調整＞

PBS(-)に溶解させたCetuximabと超純水に溶解させたEZ-LINK スルホ-NHS-LC-ビオチン化試薬（Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州）を1:40のモル比となるように混合、反応させたのち、PD SpinTrap G-25 （GE Healthcare Life Sciences、イングランド）を用いて精製した。得られたビオチン化Cetuximabとstreptavidin-saporin（Biotin-Z Internalization Kit [KIT-27-Z], Advanced Targeting Systems, カリフォルニア）を当量ずつ混ぜ、30分間室温にて反応させることでサポリンを結合したCetuximab（IT-Cetuximab）を得た。

[0054] ＜細胞障害性アッセイ＞

96ウェルプレートにMCF7を1ウェル当たり7.5×10^3個 播種し一晩培養した後以下の３つの条件の通り、イムノトキシンや光増感剤の添加及び光照射を行い、各条件の置ける細胞障害の程度を比較した。

条件１：0.032 - 20 nM の 濃度のIT-Cetuximabのみを添加

条件２：0.032 - 20 nM の 濃度のIT-Cetuximab及び1 μMのAlPcS2aを添加後、光照射（650 nm、18.8 m J/cm^2）

[0055] 各条件に沿ってIT-Cetuximab 及びAlPcS2aを添加し、16時間後に細胞をPBS（-）を用いて一度洗浄し、新たに薬剤無添加の培地を加えた。条件２の細胞群には、さらに４時間後、650 nmの光を 18.8 m J/cm^2となるように光照射を行った。

[0056] 72時間培養した後、CCK-8 キット溶液 を、各ウェルに10 μlずつ加え、１時間から２時間反応させた後、各々の450 nmの吸収を測定した。実施例１と同様に得られた吸光度より、細胞生存率（図２）及び、50%生存率を示すIT-Cetuximab濃度を算出した（表１）。

[0057] 実施例２：MCF7細胞にタラポルフィンナトリウムを使用した細胞傷害性試験

＜材料の入手＞

EGFRの低発現株として、MCF7（ヒト乳腺癌細胞）を株式会社ケーエーシー

（京都、日本）から入手した。抗EGFR抗体のCetuximab、光増感色素のタラポルフィンナトリウム、650 nm にピーク波長を持つLEDランプは比較例１で使用したものと同じものを使用した。

[0058] ＜細胞培養＞

MCF7は実施例１と同様の方法にて培養を行った。

[0059] ＜イムノトキシン調整＞

サポリンを付加したCetuximab（IT-Cetuximab）は、比較例１で作成したものと同じものを使用した。

[0060] ＜細胞障害性アッセイ＞

96ウェルプレートにMCF7を1ウェル当たり7.5×10^3 個 播種し一晩培養した後以下の３つの条件の通り、イムノトキシンや光増感剤の添加及び光照射を行い、各条件の置ける細胞障害の程度を比較した。

条件１：0.032 - 20 nM の 濃度のIT-Cetuximabのみを添加

条件２：0.032 - 20 nM の 濃度のIT-Cetuximab及び20 μMのTalaporfin sodiumを添加

条件３：0.032 - 20 nM の 濃度のIT-Cetuximab及び20 μMのTalaporfin sodiumを添加後、光照射（650 nm、37.6 m J/cm^2）

[0061] 各条件に沿ってIT-Cetuximab 及びTalaporfin sodiumを添加し、16時間後に細胞をPBS（-）を用いて一度洗浄し、新たに薬剤無添加の培地を加えた。条件３の細胞群には、さらに４時間後、650 nmの光を 37.6 mJ/cm^2となるように光照射を行った。

[0062] 72時間培養した後、CCK-8 キット溶液 を、各ウェルに10 μlずつ加え、１時間から２時間反応させた後、各々の450 nmの吸収を測定した。実施例１と同様に得られた吸光度より、細胞生存率（図３）及び、50%生存率を示すIT-Cetuximab濃度を算出した（表１）。

[0063]

[表1]

各実施例における IT-Cetuximab の EC50

	細胞種類	条件	EC50
実施例１	MCF7	IT-Cetuximab＋AlPcS2a＋光照射	0.29 nM
実施例２	MCF7	IT-Cetuximab＋タラポルフィンナトリウム＋光照射	0.61 nM

[0064] 標的分子であるEGFRの細胞当たりの発現量は A431で約300,000分子、MCF7で約15,000分子である（非特許文献２及び３）。

非特許文献２：Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines.,Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, Touge H, Makino H, Takata M, Miyata M, Nakamoto M, Burioka N, Shimizu E. Clin Cancer Res 2007, 13(5), 1552-61.

非特許文献３：ear infrared fluorescence imaging of EGFR expression in vivo using IRDye800CW-nimotuzumab.,Bernhard W1, El-Sayed A1, Barreto K1, Gonzalez C1, Hill W1, Parada AC2, Fonge H3,4,5, Geyer CR1., Oncotarget, 2018, 9(5), 6213-6227

[0065] 光増感色素AlPcS2aを使用し、MCF７細胞株への障害実験を行った（実施例１）。MCF７はEGFRが低発現であり、イムノトキシンを結合したCetuximabを20 nMの濃度で添加しても細胞障害効果は得られなかった。しかしながら、AlPcS2aをIT-Cetuximabと同時に添加し光照射によって細胞内在化効率を向上することによって、EC50＝0.29 nMと十分な細胞障害効果を得ることができた。

[0066] 光増感色素タラポルフィンナトリウムを使用して、MCF７に対する細胞障害実験を行った（実施例２）。この場合も、MCF7にIT-Cetuximabとタラポルフィンナトリウムを添加しさらに光照射を行うことで、十分な細胞障害活性を示すことがわかった（EC50＝0.61 nM）

[0067] 実施例１及び２よりEGFR低発現株でも腫瘍細胞障害活性が発現することがわかった。

請求の範囲

[請求項1] 腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質と細胞毒との結合物；及び光増感色素；

を含む、該標的物質の発現量が少ない腫瘍細胞を死滅させるための医薬。

[請求項2] 該標的抗原の発現量が１細胞当たり２万分子以下である、請求項１に記載の医薬。

[請求項3] 標的物質の発現量が細胞当たり２万分子以下である腫瘍細胞を含む腫瘍細胞群を死滅させるための医薬である、請求項１又は２に記載の医薬。

[請求項4] 腫瘍細胞表面の標的物質に結合する物質が、抗体、抗体断片、 リガ ンド、又はペプチドである、請求項１から３の何れか一項に記載の医薬。

[請求項5] 細胞毒が　サポリン、ゲロニン、または緑膿菌外毒素である、請求項１から４の何れか一項に記載の医薬。

[請求項6] 光増感色素が　タラポルフィンナトリウム、ポルフィマーナトリウム、AlPcS2a　またはTPCS2a である　請求項１から５の何れか一項に記載の医薬。

[請求項7] 腫瘍細胞が、細胞表面にEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR、ERBB1,ERBB2,ERBB3,ERBB4)， Mesothelin,Ephrin type-A receptor 2 (EphA2) ,Glypican3(GPC3),Cadherin17(CDH17)、又はRoundabout homolog 1 (Robo1) を発現している細胞である、請求項１から６の何れか一項に記載の医薬。

[請求項8] 腫瘍細胞が、頭頚部がん、肺がん，肝がん、大腸がん、皮膚がん、食道がん、胃がん、子宮けいがん、子宮内膜がん、中皮腫、脳腫瘍、悪性黒色腫、乳がん、胆管がん、膵がん、卵巣がん、腎がん、膀胱がん、前立腺がん又は悪性リンパ腫、骨肉腫の何れかのがん細胞である、請求項１から７の何れか一項に記載の医薬。

[請求項9] （１）前記結合物を腫瘍細胞と接触させる工程；

（２）光増感色素を前記腫瘍細胞と接触させる工程；及び

（３）光増感色素を活性化させるのに有効な波長で前記腫瘍細胞を照射することにより前記細胞を死滅させる工程：

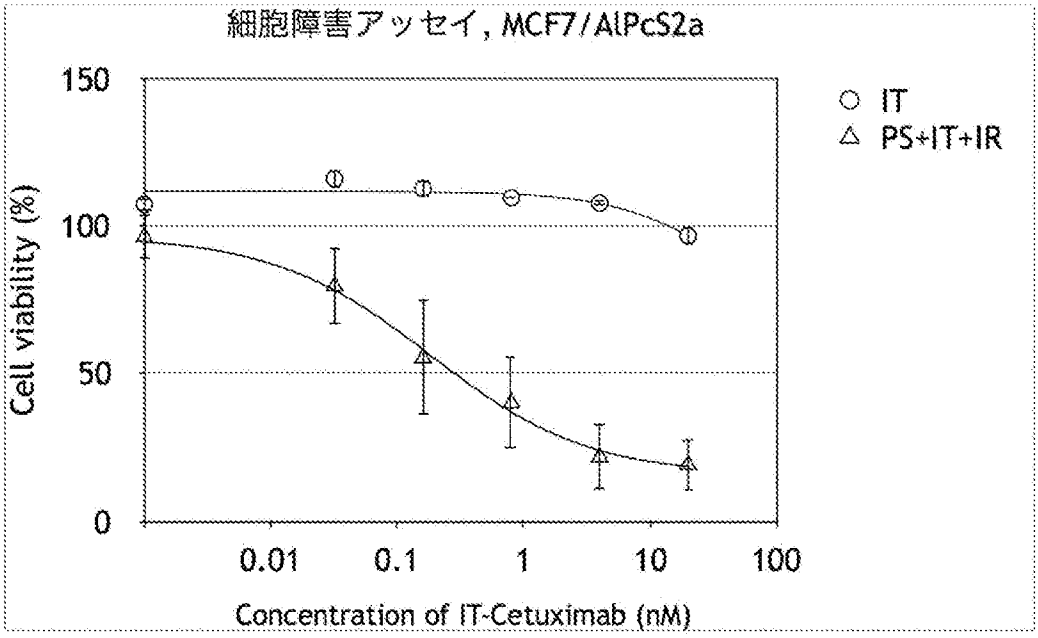
により腫瘍細胞を死滅させる、請求項１から８の何れか一項に記載の医薬。

[請求項10] （１）前記結合物と、光増感色素とを腫瘍細胞と接触させる工程、及び

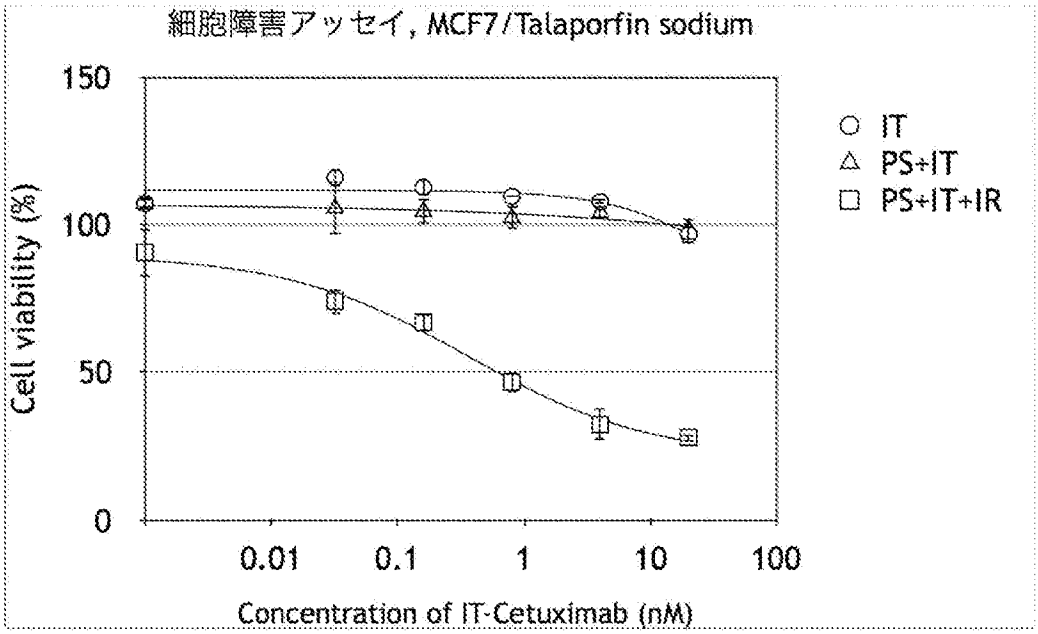
（２）その後、光増感色素を活性化させるのに有効な波長で前記腫瘍細胞を照射することにより前記細胞を死滅させる工程：

により腫瘍細胞を死滅させる、請求項１から９の何れか一項に記載の医薬。

[図1]


細胞障害アッセイ, MCF7/AlPcS2a
Cell viability (%)
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
Concentration of IT-Cetuximab (nM)
IT
PS+IT+IR

[図2]


細胞障害アッセイ, MCF7/Talaporfin sodium
Cell viability (%)
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
Concentration of IT-Cetuximab (nM)
IT
PS+IT
PS+IT+IR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/014588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/409(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 41/00(2020.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i
FI: A61K45/00; A61P35/00; A61K39/395 T; A61K39/395 E; A61K38/16; A61K41/00; A61K31/409; A61K47/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K45/00; A61K31/409; A61K38/16; A61K39/395; A61K41/00; A61K47/68; A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OLSEN, E. Cathrine et al., "Design, Characterization, and Evaluation of scFvCD133/rGelonin: A CD133-Targeting Recombinant Immunotoxin for Use in Combination with Photochemical Internalization", J Clin Med., 26 December 2019, vol. 9, article no. 68, pp. 1-16 abstract, sections "2.1., 3.2., 3.4., 4."	1-10
Y	abstract, sections "2.1., 3.2., 3.4., 4."	6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 April 2021 (26.04.2021)	18 May 2021 (18.05.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/014588

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YIP, Wai Lam et al., "Targeted delivery and enhanced cytotoxicity of cetuximab saporin by photochemical internalization in EGFR Positive cancer cells", Mol. Pharmaceutics, 2007, vol. 4, no. 2, pp. 241-251 abstract, sections "Drugs and Chemicals, Selective EGPR Targeting and Cellular Uptake of Cetuximab, Cytotoxic Effects in EGFR-Negative Cells"	1-5, 7-10
Y	abstract, sections "Drugs and Chemicals, Selective EGPR Targeting and Cellular Uptake of Cetuximab, Cytotoxic Effects in EGFR-Negative Cells"	6

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/014588

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/409(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 41/00(2020.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i
FI: A61K45/00; A61P35/00; A61K39/395 T; A61K39/395 E; A61K38/16; A61K41/00; A61K31/409; A61K47/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K45/00; A61K31/409; A61K38/16; A61K39/395; A61K41/00; A61K47/68; A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	OLSEN, E. Cathrine et al., Design, Characterization, and Evaluation of scFvCD133/rGelonin: A CD133-Targeting Recombinant Immunotoxin for Use in Combination with Photochemical Internalization, J Clin Med., 2019.12.26, Vol. 9, Article No.68, p. 1-16 要約、「2.1.」、「3.2.」、「3.4.」、「4.」の項	1-10
Y	要約、「2.1.」、「3.2.」、「3.4.」、「4.」の項	6
X	YIP, Wai Lam et al., Targeted delivery and enhanced cytotoxicity of cetuximab saporin by photochemical internalization in EGFR Positive cancer cells, Mol. Pharmaceutics, 2007, Vol. 4, No. 2, p. 241-251 要約、「Drugs and Chemicals」、「Selective EGFR Targeting and Cellular Uptake of Cetuximab」、「Cytotoxic Effects in EGFR-Negative Cells」の項	1-5,7-10
Y	要約、「Drugs and Chemicals」、「Selective EGFR Targeting and Cellular Uptake of Cetuximab」、「Cytotoxic Effects in EGFR-Negative Cells」の項	6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
26.04.2021	18.05.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
大島　彰公 4U 4869
電話番号 03-3581-1101 内線 3439