

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C08G 65/32
A61K 47/48



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98119512.1

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 22 日 [11] 授权公告号 CN 1207323C

[22] 申请日 1998.9.17 [21] 申请号 98119512.1 [30] 优先权 [32] 1997. 9.17 [33] JP [31] 251624/1997 [32] 1997. 9.17 [33] JP [31] 251625/1997 [71] 专利权人 三菱化学株式会社 地址 日本东京 [72] 发明人 田川俊明 铃木勉 矢田信久 长池一博 平川容子 细川齐子 审查员 李 丽	[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 代理人 章鸣玉
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 8 页	

[54] 发明名称 二价反应性水溶性高分子衍生物及包含该衍生物的复合体

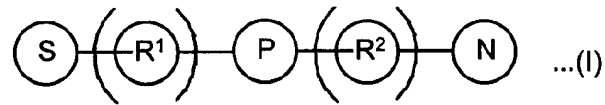
[57] 摘要

本发明涉及可连接配体和脂质体活性物质的水溶性高分子衍生物，提供了能够减少配体活性的降低，减弱对活性物质的影响的二价反应性水溶性高分子衍生物。 本发明还涉及具有可与氨基反应的部位和巯基部分或 S - 乙酰基巯基部分的二价反应性水溶性高分子衍生物、通过该高分子衍生物使配体和活性物质结合的复合体、含有该复合体的医药·诊断剂组合物及上述复合体的制备方法。 此外，制备复合体时，不需要在热力学不稳定的活性物质中导入过量的高分子衍生物，即提供了对活性物质没有影响的制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种二价反应性水溶性高分子衍生物, 其特征在于, 具有可与氨基反应的部位及巯基部分或 S-乙酰基巯基部分。

- 5 2. 如权利要求 1 所述的水溶性高分子衍生物, 其特征还在于, 由下式 (I) 表示,



式中, S 表示巯基部分或 S-乙酰基巯基部分, P 表示水溶性高分子, N 表示可与氨基反应的部位, R^1 和 R^2 表示任意的连接基团, R^1 及/或 R^2 不是必须的。

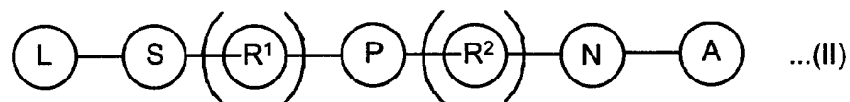
- 10 3. 如权利要求 1 或 2 所述的高分子衍生物, 其特征还在于, 水溶性高分子为生物分解性聚合物或聚乙二醇。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的高分子衍生物, 其特征还在于, 水溶性高分子为聚乙二醇。

- 15 5. 如权利要求 1 或 2 所述的高分子衍生物, 其特征还在于, 可与氨基反应的部位为琥珀酰亚胺基。

6. 一种复合体, 其特征在于, 通过权利要求 1~5 的任一项所述的高分子衍生物, 由配体和活性物质结合而成。

7. 如权利要求 6 所述的复合体, 其特征还在于, 由下式 (II) 表示,



- 20 式中, L 表示活性物质, A 表示配体, S、 R^1 、P、 R^2 和 N 如前所述。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的复合体, 其特征还在于, 所述的活性物质选自低分子药物、标记分子、蛋白质、微胶粒和脂质体。

9. 如权利要求 8 所述的复合体, 其特征还在于, 所述的活性物质为脂质体或微胶粒。

- 25 10. 权利要求 6 或 7 所述的复合体, 其特征还在于, 所述的配体为抗体。

11. 如权利要求 6 或 7 所述的复合体, 其特征还在于, 所述的活性物质上还结合了具有活性物质和反应性的一价水溶性高分子衍生物。

12. 一种医药组合物, 其特征在于, 它含有通过权利要求 1~5 的任一项所述的高分子衍生物、由配体和活性物质结合而成的复合体。

13. 一种诊断剂组合物，其特征在于，它含有通过权利要求 1~5 的任一项所述的高分子衍生物、由配体和活性物质结合而成的复合体。

14. 如权利要求 6~11 的任一项所述的复合体的制备方法，其特征在于，首先使权利要求 1~5 的任一项所述的二价反应性水溶性高分子衍生物与配体结合，
5 然后在上述水溶性高分子衍生物的另一端与活性物质结合。

15. 如权利要求 14 所述的制备方法，其特征还在于，包括进一步结合具有活性物质和反应性的一价反应性水溶性高分子衍生物的步骤。

16. 如权利要求 14 所述的制备方法，其特征还在于，通过配体的氨基使二价反应性水溶性高分子衍生物与配体结合。

10 17. 如权利要求 14 的任一项所述的制备方法，其特征还在于，通过二价反应性水溶性高分子衍生物的巯基部分使二价反应性水溶性高分子衍生物和活性物质与微胶粒的巯基反应性部分结合。

二价反应性水溶性高分子衍生物及包含该衍生物的复合体

5 本发明涉及作为间隔基的配体(抗原、抗体等蛋白质, 激素等)和低分子药物、标记分子、蛋白质、微胶粒或脂质体等活性物质结合而成的杂合的二价反应性水溶性高分子衍生物、由此获得的复合体、含有该复合体的医药诊断剂组合物及该复合体的制备方法, 本发明所得的复合体可用于给药装置、诊断、检查等用途。

近年, 在多个领域进行了使抗原、抗体、铁传递蛋白等蛋白质和激素等配体
10 与医药品、同位素、标记物质等结合, 赋予它们以特异性的研究开发。

特别是使抗体等蛋白质与抗癌剂等医药品、放射性同位素、毒素等蛋白质结合, 作为部位特异的治疗药品和特异性较高的诊断剂使用更是人们所期待的。此外, 抗体和碱性磷酸酯酶等酶结合而成的复合体也被当作鉴定试剂使用。

上述复合化可以是直接结合, 也可以通过脂质体等载体结合。以抗体为例,
15 有将抗体糖链氧化成醛, 与具有酰肼基的活性物质(酶、脂质体等)进行结合的方法; 有在抗体的氨基上导入马来酰亚胺基, 在活性物质中导入巯基, 再进行结合的方法; 有利用还原剂还原内源性二硫化物, 生成巯基, 使其进行反应的方法; 有通过抗生物素蛋白·生物素进行结合的方法等(总论, 酶免疫测定法, 第3版, 石川等著, 医学书院(1987))。

20 另一方面, 大家都知道聚乙二醇(以下, 也称为“PEG”)是一种柔性水溶性高分子, 将其作为蛋白质修饰剂已对许多例子进行了探讨。PEG的毒性和免疫性都较低, 而且, 已经知道, 通过PEG修饰有大大改善蛋白质在血中滞留性的效果(《DDS的进步1995-1996》, 中山书店, P82-94(1995))。

最近, 对将PEG作为上述间隔基使用的情况也进行了研究, 特别是对在脂质体领域, 将PEG部分作为间隔基的抗体结合脂质体的研究更为活跃。
25

具有极性基团的脂质和既亲水又亲油的脂质体等能形成脂质微胶粒、高分子微胶粒、脂质体、脂质微胶粒封闭链二重相等微粒。

近年, 这些微粒作为药物和核酸等的载体试用的机会逐渐增多。在脂质体中, 能够将脂溶性物质封入脂质体的脂质相中, 将水溶性物质封入内部水相中,
30 不仅能够荷载低分子化合物, 还能够荷载蛋白质等高分子物质, 所以, 对将其作为药物、蛋白质、核酸等的DDS用载体使用进行了大量研究。近年, 不仅对封入药物以降低其毒性等的效果进行了研究, 在脂质体表面结合抗体、糖链等以赋

予其靶向功能等的脂质体的实用化研究方面也取得了进展。

另一方面, 针对脂质体的一般缺陷, 如易凝集, 在肝脏、脾脏等网状组织中的非特异性捕捉, 公知的技术是在脂质体中导入聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、聚甘油等水溶性高分子以改善上述缺陷, 特别是对聚乙二醇的修饰作用进行了大量的研究, 通过聚乙二醇的修饰能够有效地抑制网状组织内的非特异性捕捉, 这一点也是公知的。

而且, 为了能使脂质体既具有靶向功能又在网状组织内具备回避效果, 所以还揭示了在经过聚乙二醇修饰的脂质体的聚乙二醇末端再结合了抗体等靶向配体的脂质体。

10 即, 以具有官能团的聚乙二醇-脂质衍生物为中介, 使抗体和脂质体复合体化的方法, 其例如下所示: Klibanov 等, J. Liposome Res. 2 (1992) 321, 日本专利公开公报平 6-126152 号, 日本专利公开公报平 6-220070 号, WO94/22429, Hansen 等, BBA 1239(1995)133, Shahinian 等 BBA 1237(1995)99,

也就是在有机溶剂中使脂质和聚乙二醇衍生物反应, 合成具有脂质-PEG-官能团型化合物。然后, 与其他结构的脂质一起脂质体化后的抗体结合, 获得抗体-PEG-脂质体型复合体。

作为具体的聚乙二醇脂质衍生物, 日本专利公开公报平 6-126152 号揭示了脂肪族碳氢化合物-PEG-羰基咪唑; 日本专利公开公报平 6-220070 号、BBA 1237(1995)99 揭示了磷脂乙醇胺(PE)-PEG-马来酰亚胺; WO94/22429、Hansen 20 等的 BBA 1239(1995)133 揭示了使用 PE-PEG-NH₂-生物素、二硬脂酰磷脂二乙醇胺(DSPE)-PEG-酰肼(Hz)、DSPE-PEG-3-(2-吡啶基巯基)丙酰基(PDP)的抗体结合脂质体。

上述复合体使抗体的结合率有所提高, 而且, 还可改善其在血液中的动态。

但是, 同时也指出了几个问题。即, 使用 DSPE-PEG-Hz 的方法中, 在处理 25 抗体的过程中抗体活性有所降低, 而且, 抗体的结合率几乎没有得到改善; 使用 DSPE-PEG-PDP 的方法中, 脂质体化之后需要进行还原处理, 这就可能会对封入的药物产生影响, 且操作麻烦; 使用 PE-PEG-NH₂-生物素的方法是通过抗生物素蛋白/生物素为中介进行结合的, 在用于生物体时需要考虑作为异种蛋白的免疫源性的问题; 使用脂肪族碳氢化合物-PEG-羰基咪唑的方法中, PEG 衍生物被封入, 30 可能会与药物的氨基发生反应。

要十分有效地结合抗体, 就必须在脂质体中导入对应于抗体的过量 PEG 脂质衍生物, 所以, 即使在抗体结合后, 具有活性基团的 PEG 部分还在能够容易地

与其他部分(体内给药时为生物体成分)反应的领域残存。而且,这些量的脂质-PEG-官能团衍生物导入脂质体时,会加速封入脂质体内的药物的漏出(BBA 1237(1995)99)。

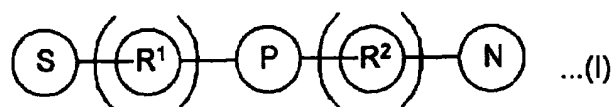
从上述观点看,以往技术还不能十分令人满意。

- 5 本发明者们为解决上述以往问题而进行的研究的结果是,将杂合的二价反应性水溶性高分子作为间隔基使用,能够改善以往的不足之处,上述高分子的特征在于它们是合成水溶性高分子的衍生物,具有可与氨基进行反应的部位,还具有巯基或潜在的巯基 S-乙酰基巯基。

- 10 此外,还发现了能够容易地制备配体结合体的方法,即杂合的二价反应性水溶性高分子衍生物首先与配体结合,然后利用另一端与微胶粒等活性物质结合,接着,如有必要,还可与具有活性物质和反应性的一价水溶性高分子结合。

即,本发明有如下要点:

1. 一种二价反应性水溶性高分子衍生物,其特征是具有可与氨基反应的部位及巯基部分或 S-乙酰基巯基部分。
- 15 2. 下式(I)表示的上述水溶性高分子衍生物,



(式中, S 表示巯基部分或 S-乙酰基巯基部分, P 表示水溶性高分子, N 表示可与氨基反应的部位。此外, R^1 和 R^2 表示任意的连接基团, R^1 及/或 R^2 不是必须的)。

- 20 3. 水溶性高分子为生物分解性聚合物或聚乙二醇的上述高分子衍生物。
4. 水溶性高分子为聚乙二醇的上述高分子衍生物。
5. 可与氨基反应的部位为琥珀酰亚胺基的上述高分子衍生物。
6. 通过上述高分子衍生物,由配体和活性物质结合而成的复合体。
7. 下式(II)表示的上述复合体,



25

(式中, L 表示活性物质, A 表示配体, S、 R^1 、P、 R^2 和 N 如前所述)。

8. 活性物质选自低分子药物、标记分子、蛋白质、微胶粒和脂质体的上述复合体。

9. 活性物质为脂质体或微胶粒的上述复合体。

10. 配体为抗体的上述复合体。

11. 在活性物质上再结合具有活性物质和反应性的一价水溶性高分子衍生物的复合体。

12. 含有上述复合体的医药组合物。

5 13. 作为抗肿瘤剂使用的上述医药组合物。

14. 含有上述复合体的诊断剂组合物。

15. 上述复合体的制备方法，其特征是，使上述二价反应性水溶性高分子衍生物与配体结合，然后通过上述水溶性高分子衍生物的另一端结合活性物质。

10 16. 上述制备方法还包括在上述高分子衍生物上再结合具有活性物质和反应性的一价反应性水溶性高分子衍生物的步骤。

17. 通过配体的氨基使二价反应性水溶性高分子衍生物与配体结合的上述制备方法。

18. 通过二价反应性水溶性高分子衍生物的巯基部分使二价反应性水溶性高分子衍生物和活性物质与微胶粒的巯基反应性部分结合的上述制备方法。

15 即，本发明的水溶性高分子(以下称为“本高分子化合物”或“本水溶性高分子”)首先与具有氨基的配体结合，获得具有巯基的 PEG-配体复合体(为 S-乙酰基巯基时，在适当的条件下脱去乙酰基)，然后，和具有巯基反应性部位的脂质体等活性物质混合，使它们进行反应，就能够容易地获得配体-PEG-活性物质结构的复合体。

20 这样，就不需要可能会造成抗体等配体活性降低的氧化和还原。而且，还可采用通过对活性物质影响较小的巯基进行反应的方法来形成复合体。

令人惊奇的是，比较通过本高分子化合物使抗体和脂质体结合的方法和通过没有高分子部分而与前述高分子化合物具有相同官能团的低分子化合物使两者结合的方法发现，前者对靶细胞显现出高结合活性。而且，还发现具备可减少以往指出的内封物漏出的效果。

25 此外，本方法中，由于首先形成了抗体等的配体-PEG 衍生物，所以，不需要象以往方法那样在热力学不稳定的活性物质中导入具有过量官能团的 PEG 脂质衍生物，就能够形成配体-PEG 结合体。因此，不会有以往具有官能团的 PEG 脂质可能造成的影响，充分利用脂质体等活性物质制备技术、药物封入技术等以往技术就可形成活性物质。

此外，也不会出现以往方法中即使在配体结合后，具有活性基团的 PEG 部分还在能够容易地与其他部分(体内给药时为生物体成分)反应的领域残存的问题。

题。

又,通过使用杂合的二价反应性水溶性高分子衍生物,就不需要可能导致抗体等配体的活性降低的氧化和还原。

以下,对本发明进行详细说明。

- 5 本发明的水溶性高分子衍生物是二价反应性的。本发明中,二价反应性是指能够与同一分子内的某个官能团进行反应的基团有2个,且它们是不同的。

本发明所用的水溶性高分子为聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸等合成高分子,较好的是聚乙二醇,此外,适用的还有聚醇等生物分解性聚合物。分子量较好为约500~20000,更好的是1500~

- 10 10000,特别好的是2000~6000。

本发明的水溶性高分子衍生物在上述水溶性高分子的一端具有巯基部分或S-乙酰基巯基部分,在另一端具有可与氨基反应的部位。

巯基或S-乙酰基巯基可直接加成到水溶性高分子上,也可通过中间作为连接基团的亚烷基、羰基、酯基、酰胺基进行结合。

- 15 作为可与氨基反应的部位是指羧基或羟基的能够与氨基进行缩合反应的部位。具体来讲可使用琥珀酰亚胺酯、异硫氰酸酯、磺酰氯、羰基咪唑等,较好的是琥珀酰亚胺酯。此外,可与氨基反应的部位同样可以直接加成到水溶性高分子上,也可通过上述连接基团进行结合。

- 对本发明的水溶性高分子衍生物没有特别的限定,例如,利用经N-羟基琥珀酰亚胺酯活化的聚乙二醇和巯基乙醇反应就可获得,或使具有氨基的聚乙二醇与S-乙酰基巯基乙醇酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SATA)、S-乙酰基巯基丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯或S-乙酰基巯基乙酸水合物反应而获得的高分子衍生物。

利用上述所得的本发明的二价反应性水溶性高分子衍生物能够形成配体和活性物质结合的复合体。

- 25 配体较好是具有氨基,能够和本水溶性高分子的氨基的反应部位结合。作为配体包括植物凝血素、抗原、抗体、激素、传导物质等,较好的是抗体。此外,还可使用后述的制备方法中提到的配体。

- 具有氨基的配体和本水溶性高分子的结合可通过在水溶液中混合配体和本水溶性高分子,并在常温下使它们反应而进行。高分子衍生物与配体的较好的摩尔比是约0.3~50,更好的是0.8~30。

此外,作为水溶性高分子,如果使用的是具有S-乙酰基巯基的高分子,则如上所述,在与配体结合后,脱去乙酰基,成为巯基后,可与下述活性物质结合。

脱乙酰基时的条件如果对配体实质上是稳定且温和的, 则对其没有特别的限定, 较好的是在使用羟胺的中性缓冲液中, 在常温下进行反应, 使最终浓度在约 20mM ~ 200mM 的范围内。

如上所述, 与配体结合后, 可在本水溶性高分子的另一端结合活性物质。

- 5 作为活性物质可使用甲氨喋呤、丝裂霉素 C、阿霉素、道诺霉素等低分子药物, 氨基荧光素、荧光素尸胺、荧光素黄尸胺、过氧化物酶、碱性磷酸酯酶等标记分子, 新制癌菌素、白喉毒素 A 链、细胞溶素 A 链、尿激酶、弹性硬蛋白酶、精氨酸酶、冬酰胺酶、超氧化歧化酶、纤维蛋白溶酶原激活剂、インタ-ロイキン 2、TNF 等蛋白质, 内啡肽、降钙素、缓激肽、与 CRF 有关的肽等肽微胶粒,
- 10 脂质体等, 本发明中较好的是微胶粒、脂质体。而且, 微胶粒、脂质体中可封入医药品和诊断剂。微胶粒将在后面进行说明。

- 作为可封入其中的医药品包括阿霉素、道诺霉素、长春碱、顺铂、丝裂霉素、争光霉素、放线霉素、5-FU(氟脲嘧啶)等抗肿瘤剂, 噻吗心安等肾上腺素阻滞剂, 氯压定等高血压治疗剂, 普鲁卡因酰胺等制吐剂, 氯喹等抗疟疾剂, 两性霉素等
- 15 抗生素, 以及它们的药学上允许的盐和衍生物, 细胞溶素和白喉毒素等毒素蛋白质及它们经过编码的 DNA、TNF 等细胞遗传因子、アンチセンス DNA 等核苷酸等。作为上述抗肿瘤剂等的药学上允许的盐, 较好的是与多价阴离子性物质形成的盐, 例如, 柠檬酸盐、酒石酸盐、谷氨酸盐。特别好的是抗肿瘤剂。

- 此外, 作为诊断剂包括放射性元素, 例如, 铟、镓等图象调整剂, 辣根过氧
- 20 化物酶、碱性磷酸酯酶等酶, 甾衍生物, 羧基荧光素等荧光体, N-甲基吡啶衍生物等荧光体等。

将这类医药品和诊断剂导入微胶粒、脂质体可使用已知的常用方法。例如, 在形成微胶粒、脂质体时, 形成 pH 梯度等当的浓度梯度, 将该电势作为动力导入可离子化的药物的方法(Cancer Res. 49 5922 (1989))。

- 25 所用的活性物质是利用已知方法使活性物质具备可与巯基反应的部位的物质。即, 可使用选自马来酰亚胺基、卤化烷基、氮丙啶基、吡啶基二巯基等的反应基。较好的是马来酰亚胺基。但对其没有特别的限定, 具体例子有按照公知的方法, 使马来酰亚胺己酰二棕榈酰磷脂乙醇胺(日本专利公开公报平 4-346918 号)和马来酰亚胺苯基丁酰基磷脂乙醇胺等具有马来酰亚胺基部分的脂质和磷脂胆
- 30 碱及胆固醇一起脂质体化(脂质体, 第 2 章, 野岛等编, 江南堂(1988)), 就可获得具有马来酰亚胺基的脂质体。作为脂质体可使用 MLV、LUV、SUV 等各种脂质体, 较好的是 LUV。

此外,使 N-琥珀酰亚胺基-6-马来酰亚胺己酰酯和蛋白质反应也可获得具有马来酰亚胺部分的蛋白质。还可使用马来酰亚胺荧光素、曙红马来酰亚胺等荧光色素。

在近中性的缓冲液中混合这些具有巯基反应性基团的活性物质和以上获得的具有巯基的本水溶性高分子-配体复合体就能够容易地复合体化,获得作为目的产物的配体-PEG-活性物质型复合体。如有必要,可采用超滤、凝胶过滤色谱法-离子交换色谱法等方法精制。

下面,对本发明的复合体的制备方法进行详细说明。

本发明的制备方法的主要内容如图 5 所示。图中高分子 1 由具有可与配体中的官能团 A 反应的 A'部分和可与活性物质中的反应性部分 B 结合的 B'部分组成,也就是前述的二价反应性水溶性高分子衍生物高分子 2 具有与 B 结合的 B"。B'和 B"可以是同样的残基。本发明中,还可结合具有活性物质和反应性的一价反应性高分子。

本发明的制备方法有以下特征,首先,杂合的二价反应性水溶性高分子 1 与配体结合,然后,在另一端与活性物质结合,如有必要,还可与具有活性物质和反应性的一价高分子 2 结合。

作为配体中的 A 可使用氨基、羧基、糖链部分,较好的是使用氨基。作为氨基反应性基团的 A'如前所述。

B 和 B'的组合实质上不需要 B 和配体进行反应,而是选择特异性的 B-B'组合,较好的是 B'为巯基、B 为可与巯基反应的基团的组合。巯基如前所述,可使用反应前被保护起来的潜在的巯基,即 S-乙酰基巯基,这种情况下,在反应时脱去保护基后即可使用。

本发明所用的配体除了前述的之外,还可使用选自铁传递蛋白、GEF、甲胎蛋白(AFP)等蛋白质,胰岛素等肽或多克隆抗体、单克隆抗体等的抗体,可使用其整体,也可使用通过酶处理等获得的碎片。用于治疗各种疾病时,较好的是鼠和人的嵌合体抗体和人体抗体。

水溶性高分子 1 和 2 可使用前面列举的水溶性高分子。高分子 1 和 2 可以是不同的组合,也可以是相同的组合。

配体和本高分子的反应如前所述。

如前所述,使用具有 S-乙酰基巯基的高分子时,在配体结合后,脱去乙酰基就可获得巯基。

本发明中,作为活性物质可使用前述的物质,但特别好的是微胶粒和脂质

体。所以，以下作为复合体，以微胶粒和脂质体为代表例对本发明进行说明，但活性物质不仅限于微胶粒。微胶粒由既亲水又亲油的分子构成，作为构成微胶粒的既亲水又亲油的分子，只要包含亲水性部分和疏水性部分，利用已知的常用方法能够形成微胶粒即可，其中较好的既亲水又亲油的分子是脂质。

- 5 本发明中可形成微胶粒的脂质包括天然磷脂胆碱如卵黄磷脂胆碱(EYPC)等，磷脂胆碱(PC)如二棕榈酰磷脂胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰磷脂胆碱(DMPC)、二硬脂酰磷脂胆碱(DSPC)、二油酰磷脂胆碱(DOPC)等，天然磷脂乙醇胺如卵黄磷脂乙醇胺(EYPC)，磷脂乙醇胺(PE)如二棕榈酰磷脂乙醇胺(DPPE)、二油酰磷脂乙醇胺(DOPE)等，磷脂甘油(PG)如二棕榈酰磷脂甘油(DPPG)等，磷脂丝氨酸(PS)，磷脂肌醇(PI)，磷脂酸(PA)等磷脂；神经鞘糖脂质；甘油糖脂质等。这些脂质可单独使用，也可2种以上或与胆固醇等非极性物质组合使用。

- 本发明的微胶粒除了上述脂质和非极性物质之外，还包括用于结合配体-高分子1复合体和高分子2的脂质衍生物。这些脂质衍生物可使用包含在微胶粒中的反应性部分B，即具有作为巯基反应性部位的选自马来酰亚胺基、卤化烷基、吡啶基、吡啶基二联硫基的反应基团的磷脂衍生物，但较好的是马来酰亚胺基，对其没有特别的限定，具体可使用马来酰亚胺基己酰二棕榈酰磷脂乙醇胺(日本专利公开公报平4-346918号)和马来酰亚胺基苯基丁酰基磷脂乙醇胺等具有马来酰亚胺基部分的脂质。

- 所用的上述脂质衍生物与形成微胶粒的既亲水又亲油的分子的组成比为0.1~8mol%，较好的是0.5~3mol%，更好的是1~3mol%。所用的胆固醇和形成微胶粒的既亲水又亲油的分子的组成比为0~100mol%，较好的是40~70mol%。

- 本发明的微胶粒可用任何方法制备，采用上述原料通过已知的常用制备技术即可获得。例如，可使用在附着于玻璃壁上的脂质薄膜中加水溶液，机械振荡后形成的多层状脂质体(MLV)；或使用通过超声波处理法，乙醇注入法，フレンチプレス法获得的小的单层脂质体；或使用通过表面活性剂除去法，逆相蒸发法(脂质体，砂本顺三等，南洪堂1988)，用具有均匀孔径的膜加压、压制出MLVのイクストル-ジョン法获得的大的单层脂质体(LUV)(Liposome Technology, Vol. 1, 2nd Edition)。

- 30 还可在微胶粒中封入医药品和诊断用药物。

能够封入微胶粒的医药品和诊断剂如前所述。

温度约为4℃~40℃，在中性缓冲液中将配体-高分子1复合体和上述脂质

体、微胶粒混合，即可使它们进行反应。而且，巯基被保护的情况下，在反应前可进行前述的脱保护基操作。

反应时的 pH 较好约为 5 ~ 8，更好的是 5.5 ~ 7.0。反应时还可添加 1mM 左右的 EDTA。

5 用于反应的配体-高分子 1 复合体量少于微胶粒中反应性脂质的量。只要少量的配体就能够获得所需靶向性能的情况下，不需要大量结合配体，在残存的微胶粒上的反应性基团中添加高分子 2，可使反应继续进行。此外，通过添加高分子 2，在微胶粒-高分子 1-配体复合体作为医药品、诊断剂使用时，能够维持其在血液中的滞留性。

10 本发明所用的高分子 2 如前所述，高分子 2 实质上只具有与微胶粒共有的结合部位。

对高分子 2 没有特别的限定，可使用具有 2,4-双(聚乙二醇)-6-氯-S-三嗪和脒氨酸形成的具有巯基的 PEG 衍生物(日本专利公开公报平 4-346918 号)、N-丙酯酯-3-(巯基)甲氧基聚氧乙烯烷胺(J. Controlled Release 28(1994) 155)等。

15 高分子 2 可在微胶粒和配体-高分子 1 复合体的反应后进行反应，也可在精制微胶粒-配体-高分子 1 复合体后再添加。

添加量与微胶粒中的反应性脂质相同，0.2 ~ 5mol，较好的是 0.5 ~ 2mol。在中性缓冲液中，温度约为 4℃ ~ 40℃ 的条件下混合，就能够容易地进行反应。

20 反应时的 pH 较好约为 5 ~ 8，更好的是 5.5 ~ 7.0。反应时还可添加 1mM 左右的 EDTA。

如有必要，可采用超滤、凝胶过滤色谱法-离子交换法等方法对本发明所得的结合了配体的微胶粒进行精制。

以下，通过实施例进行更为详细的说明，只要不超出本发明的要旨，对其没有特别的限定。

25

实施例 1

30 在 1g 溶于 10ml 二氯甲烷的聚(乙二醇)-双- ω -氨基- α -羧酸酯(ポリ(エチレングリコール)-ビス- ω -アミノ- α -カルボキシル)(PEG 平均分子量为 3400, Shearwater polymers, Inc)中添加 74.8mg S-乙酰基硫甘醇酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(Sigma)和 41 μ l 三乙胺 k。搅拌溶解后，再添加 10mg S-乙酰基硫甘醇酸 N-羟基琥珀酰亚胺，于室温搅拌 3.5 小时，进行反应。通过 TLC(氯仿/甲醇 = 85/10，碘显色，以下的 TLC 也在此条件下进行)进行检测，如果添加的聚(乙二醇)-双- ω -氨基

- α -羧酸酯(ポリ(エチレングリコール)-ビス- ω -アミノ- α -カルボキシル)的低 Rf 斑点转移到高 Rf(约 0.6), 则可确认反应的进行。

- 在氮气氛围下除去溶剂后的反应物中添加 10ml 氯仿, 溶解。然后添加到用氯仿膨润过的 sep-pak(SILICA PLUS Wates 公司)中, 用氯仿/甲醇(4/1(v/v))溶出,
- 5 对试样进行前处理。再次在氮气氛围中除去溶剂, 溶于氯仿后, 注入硅胶柱(罗渤柱 LiChroprep Si60 25 × 310cm 关东化学公司)。用氯仿洗净后, 以氯仿/甲醇(85/15(v/v))为展开剂洗脱, 引出 TLC 的 Rf 约为 0.6 的主生成物, 并对其进行精制。在氮气氛围中除去溶剂, 获得 543mg 生成物。将 583mg 生成物溶于约 2ml 经过脱水的二氯甲烷中, 添加乙醚, 使其沉淀, 滤取, 用真空泵减压干燥, 溶于
- 10 5ml 经过脱水的二氯甲烷后, 添加 17.8mg N-羟基琥珀酰亚胺(Sigma), 搅拌 10 分钟。再添加 31.9mg N,N'-二环己基碳二亚胺, 在氮气氛围中, 室温下搅拌一晚, 使其反应。滤去沉淀物后, 在氮气氛围中除去溶剂, 溶于少量脱水二氯甲烷中。加乙醚滤去析出的沉淀, 用真空泵减压干燥, 通过 TLC 获得 337mg 单一的目的产物(以下记为“Ac-S-PEG-Suc”)。最后用 $^1\text{H-NMR}$ 确认目的产物的生成。

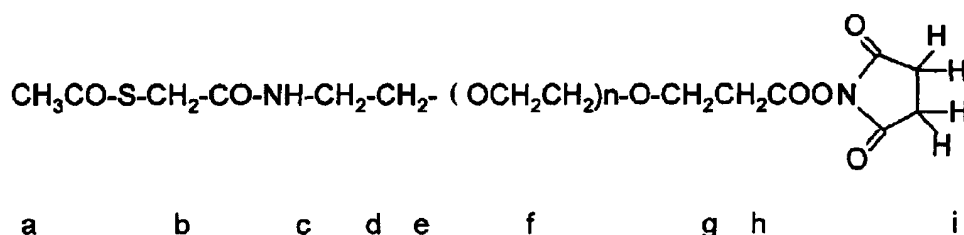


表 1

ppm			归属
2.38	s	3H	a
2.80 ~ 2.85	m	4H	i
2.88	t	2H	h
3.40	dd	2H	d
3.52	dd	2H	e
3.55	s	2H	b
3.60	-	-	f
3.82	t	2H	g
6.65	s	1H	c

然后，通过与人体 γ 球蛋白的结合试验来确认目的产物的生成。

即，在 0.9ml 溶有人体 γ 球蛋白(IgG、F(ab')₂)(4.7mg/ml)的 50mM 磷酸缓冲液(pH7.0)和 1mM EDTA 组成的缓冲液中添加溶于脱水甲醇的 30mg/ml Ac-S-PEG-Suc，添加量以摩尔比计为抗体的 0 ~ 8 倍，调整添加量与 PEG 导入量的关系。添加 Ac-S-PEG-Suc，于 25℃ 反应 1 小时后，使用セファクリル S100(ファルマシア公司)，通过上述缓冲液展开，用凝胶色谱法精制，分离未反应的 Ac-S-PEG-Suc(PEG 分子量为 3.4K)和抗体(分子量为 100K)。

用羟胺使一部分所得的修饰抗体脱去保护基。即在 0.9ml 抗体溶液中添加 0.1ml 羟胺溶液(0.5M 羟胺、0.5M HEPES、25mM EDTA，pH 为 7.0)，于 25℃ 反应 10 分钟，脱去乙酰基后，用经过 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.0)和 1mM EDTA 平衡化的 PD-10(ファルマシア公司)除去低分子，获得具有巯基的抗体。以使用 4,4'-二巯基吡啶(Sigma 社)的方法为基准测定导入抗体的巯基(续生化学实验讲座 5 p109 日本生化学编)。作为对照，同样测定没有用羟胺进行脱保护基处理的各修饰抗体的巯基含量。其结果是，如图 1 所示，经过 Ac-S-PEG-Suc 修饰的人体 γ 球蛋白具有通过羟胺的脱保护基处理而生成的潜在的巯基，即 S-乙酰基巯基，可确认它们随着 Ac-S-PEG-Suc 添加量的增大而增多。

实施例 2

与实施例 1 同样，使所得抗 CEA 鼠モノクローナル抗体(IgG₁ F(ab')₂)与 Ac-S-PEG-Suc 反应，获得修饰抗体后，利用阳离子交换树脂精制抗体蛋白。即在反应液(3.4mg/ml 2ml)中添加 0.1M 的乙酸，将 pH 调整为 4，添加到用 pH4.0 的 0.1M 乙酸缓冲液平衡化的 2ml 柱床的 SP 琼脂糖(ファルマシア公司)中。用上述缓冲液 4ml 洗净后，再用 50mM 磷酸缓冲液(pH7.5)溶出蛋白质。用セントリコン 30(アミコン社)超滤器将缓冲液调整为 50mM 磷酸缓冲液(pH7.0)、1mM EDTA 后，与实施例 1 同样，添加羟胺，脱保护基。通过 PD-10 使具有 SH 基团的抗体脱盐，并添加到 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.0)、1mM EDTA 溶液中，用于下述的与脂质体的结合。此外，相当于 Ac-S-PEG-Suc 和 Ac-S-PEG-Suc 的水解物的 Ac-S-PEG-COOH(实施例 1 中琥珀酰亚胺化前的化合物)在本条件下没有与 SP 琼脂糖结合。

作为对照，用 S-乙酰基和琥珀酰亚胺基间没有 PEG 部分的 S-乙酰基硫甘醇酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(Sigma)(以下，也称为“SATA”)来代替 Ac-S-PEG-Suc 与本抗体进行反应，用 PD-10 脱盐后，用羟胺脱保护基，用 PD-10 脱盐(0.1M 磷酸缓冲液(pH6.0)、1mM EDTA)，同样调整具有巯基的抗体。

封入荧光色素羧基荧光素,对具有可与巯基反应的马来酰亚胺化磷脂作为膜成分的脂质体与上述抗体的结合进行探讨。

即,在100mg由二棕榈酰磷脂胆碱(DPPC)/胆固醇(CHOL)/马来酰亚胺己酰二棕榈酰磷脂乙醇胺(日本专利公开公报平4-346918号)18/10/0.5(摩尔比)组成的脂质混合液中添加1ml 0.1M的羧基荧光素水溶液(pH7左右),水合,制得多层状脂质体。然后通过挤压机(LIpes Biomembranes)用0.1 μ m的聚碳酸酯膜整粒。

抗体和脂质体的结合是在pH为6的0.1M柠檬酸缓冲液中,于25℃反应1小时而进行的,使抗体最终浓度为48mg/ml,脂质体的最终浓度(作为脂质)为19mg/ml,反应后利用琼脂糖CL6B(ファルマシア公司),通过凝胶过滤色谱分离法分离除去未反应抗体和没有封入的羧基荧光素。

制得的各免疫脂质体的活性可通过以下方法测定,即测定内封入固定了抗原的96孔塑料板上的结合量的羧基荧光素的荧光量。也就是在96孔板(ファルマシア公司)上以50 μ l/孔的标准添加20 μ g/ml抗原CEA,于37℃固定化2小时。除去CEA后用PBS洗净,再用5%的牛血清白蛋白封闭。用PBS洗净后,以50 μ l/孔的标准,添加用1%牛血清白蛋白稀释至各浓度的脂质体溶液,于4℃反应90分钟。用PBS洗净后,以100 μ l/孔的标准添加2%含有triton $\times$ 100的PBS,于37℃培养30分钟,使羧基荧光素从脂质体中溶出。取一部分用PBS稀释,在激发波长492nm、荧光波长520nm进行荧光测定,比较与抗原板结合的脂质体量。

其结果如图2所示,使用Ac-S-PEG-Suc将SH导入抗体而制得的免疫脂质体显示出较高的结合活性。

实施例3

用含有马来酰亚胺的荧光色素荧光素马来酰亚胺(フナコシ)代替实施例2的脂质体,制成复合体。即,在0.35ml的2.5mg/ml荧光素马来酰亚胺中添加3.8mg/ml DMSO溶液,取5 μ l一边添加到实施例2所示的SH-PEG-抗CEA抗体(0.1M磷酸缓冲液pH6.0,1mMEDTA溶液)中一边搅拌,于25℃反应30分钟。

反应后,利用经过PBS平衡化的PD-10(ファルマシア公司),通过凝胶过滤除去未反应的荧光素马来酰亚胺。算出495nm和280nm时荧光素马来酰亚胺的导入率,相当于1分子抗体导入0.9分子的荧光素马来酰亚胺。在人体胃癌细胞株MKN45中添加本荧光标识抗体,将50 μ g/ml上述混合物在冰冷条件下混合入人体血清中,历时1小时。用PBS充分洗净后,通过荧光测定计观察其与癌细胞的结合。其结果如图3所示,本复合体与癌细胞结合而显现出荧光。

实施例 4

将 20mg(4 μ mol)PEG 二琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(日本油脂 サンプライト 4001 PEG 平均分子量 5000)溶于 1ml 氯仿中。一边搅拌 PEG 溶液一边在其中滴加 4 μ mol 溶于脱水甲醇的巯基乙胺盐酸盐(Sigma)。然后添加 72mM 三乙胺(脱水甲醇
5 中)56 μ l。在氮气氛围中于室温下反应 7 小时后,通过茚三酮反应可确认消耗了氨基,它与茚三酮为负反应的二琥珀酰亚胺 PEG 发生了反应。在氮气流下干燥所得的 SH-PEG-琥珀酰亚胺,再将其溶于 1ml 脱水甲醇。过滤不溶物,用于以下与抗体的反应。

将 3.9mg/ml 人体 γ 球蛋白溶于 50mM 磷酸缓冲液(pH7.5)、1mM EDTA 中,
10 取 0.5ml,在其中边搅拌边添加 48.7 μ lPEG 衍生物,于 37 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时。通过使用经过 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.0)、1mM EDTA 平衡化的セファデックス G75 柱的凝胶过滤色谱法对未反应的 PEG 衍生物和抗体进行处理。用上述缓冲液展开,收集最初溶出的抗体部分,与实施例 1 同样对导入的巯基量进行定量。其结果是,1mol 抗体中导入了 0.75mol 巯基。

15 与实施例 2 同样,与脂质体结合,用 SDS 电泳法对所得脂质体进行解析,确认其与抗体的结合。

实施例 5

羧基荧光素漏出比较

20 与实施例 2 同样,制得结合了抗体,并封入了 0.1M 羧基荧光素的脂质体,使其再与巯基化的聚乙二醇(日本专利公开公报平 4-346918 号)反应,制得结合了抗体和聚乙二醇的免疫脂质体。用经过 20mM 磷酸缓冲液、0.3M NaCl 平衡化的 PD-10 柱进行凝胶过滤,除去未封入的羧基荧光素。然后在 37 $^{\circ}$ C 培养,测定从脂质体中漏出的羧基荧光素量。

25 羧基荧光素的漏出由 Shahinian 等(BBA 1239(1995)157)发明的方法进行定量。即,培养后,在一定时间后从脂质体中取样,用上述缓冲液稀释,测定荧光量(激发波长为 492nm,荧光波长为 520nm)。同时,将脂质体加入 2% SDS 中,测定可溶化(破坏)后的荧光量。被封入的羧基荧光素可以自身消光,荧光强度反映了从脂质体中漏出的羧基荧光素量,因此通过两者的比可算出漏出量。

30 如图 4 所示,抗体-PEG-脂质体与非修饰的脂质体(EMC-脂质体)显现出同等的稳定性,甚至更好。

Shahinian 等发明的方法(BBA 1239(1995)157)显示在 PEG 前端导入马来酰亚

胺基的脂质体(马来酰亚胺-PEG-脂质体或抗体结合-PEG-脂质体)比没有 PEG 部分的 EMC-PE 脂质体的漏出更多, 但本方法制得的脂质体与 EMC-脂质体的稳定性相当, 甚至更好。

5 实施例 6

与实施例 2 同样, 制得封入了羧基荧光素的抗体结合脂质体。在脂质体反应液中添加使用分子量为 6000 的 PEG 制得的巯基化的聚乙二醇(日本专利公开公报平 4-346918 号)。然后, 在 100mg 脂质中添加溶于 0.1M 磷酸缓冲液(pH6.0)、1mM EDTA 中的巯基化的聚乙二醇 2.5 μ mol, 于 10℃反应 1 晚。反应后, 通过琼脂糖
10 CL6B(ファルマシア公司)采用凝胶过滤色谱分离法分离除去巯基化的聚乙二醇和未封入的羧基荧光素。

然后, 与实施例 2 同样, 测定内封入固定了抗原的 96 孔塑料板上的结合量的羧基荧光素的荧光量。其结果是, 经过巯基化的聚乙二醇编码的抗体结合脂质体如图 6 所示, 作为通过 Ac-S-PEG-Suc 在抗体中导入 SH 制得的免疫脂质体,
15 现出较高的结合活性。

实施例 7

除了使用以下所示的封入了阿霉素的脂质体作为脂质体, 人体 IgG 作为抗体之外, 其他与实施例 5 同样制得结合了抗体和 PEG 的封入了阿霉素的脂质体(PEG
20 免疫脂质体)。作为对照, 制备只结合了巯基化的 PEG 的脂质体(PEG 脂质体)和两者都不结合的脂质体(脂质体)。

在 100mg 由二棕榈酰磷脂胆碱(DPPC)/胆固醇(CHOL)/马来酰亚胺基己酰二棕榈酰磷脂乙醇胺 18/10/0.5(摩尔比)组成的固形脂质混合物中添加 1ml 0.3M 柠檬酸缓冲液(pH4.0), 用涡流搅拌机水合, 制得多层状脂质体, 然后, 依次利用装有
25 孔径为 200nm 和 100nm 的聚碳酸酯膜的挤压机(日油脂质体)于 60℃加温, 加压过滤, 制得经过整粒的脂质体。接着, 用 1M NaOH 中和所得的脂质体溶液后, 添加脂质重量的 1/10 重量的阿霉素(协和发酵), 封入 97% 以上的阿霉素就制得封入了阿霉素的脂质体。

为了比较各脂质体在血中的滞留性, 从雄性 BALB/c 鼠的尾静脉注入 2mg/kg
30 阿霉素, 经过不同的时间后处死, 取血浆, 通过 Konno 等的方法(Cancer Res. 47 4471(1987))用盐酸-乙醇萃取后, 通过荧光测定对阿霉素量进行定量。

此外, 游离的阿霉素在给药后迅速从血浆中消失, 在上述条件下不能够检

出, 被检出的阿霉素量反映了各脂质体的情况。

其结果如图 7 所示, 本方法制得的结合了抗体和 PEG 的封入了阿霉素的脂质体在血液中显现出较高的稳定性。

5 实施例 8

从体外对封入阿霉素, 且使用了本发明的二价反应性水溶性高分子衍生物的免疫脂质体对肿瘤细胞的抗肿瘤活性进行验证。以对人体大肠癌具有反应性的人体抗体为例, 如下所示, 确认本免疫脂质体对靶细胞具有选择性的抗肿瘤效果。

· 大肠癌反应性 1-3-1 抗体

10 利用常用方法对 IgG 进行种类转换, 将 CHO 细胞中发现的日本专利公开公报平 5-304987 号记载的人体大肠癌反应性人体单克隆抗体 1-3-1 通过胃蛋白酶的消化(参考日本专利公开公报平 4-346918 号)作为 F(ab')片断使用。

为了确认抗体的反应性, 用 FITC 制备上述荧光标识的抗体, 通过荧光测定计测定其对人体大肠癌细胞 DLD-1(大日本制药株式会社制)和作为正常细胞的来源于人体脐带血管内的皮细胞的 SV-3T 细胞(Agrec. Biol. Chem. 55 (11), 2847-
15 2853, 1991)的反应性。

即, 用 BSA 溶液(含有 1 % BSA 的 PBS)将本荧光抗体的浓度调整为 50 μ g/ml, 加入细胞中, 在冰上反应 1 小时。用 BSA 洗涤 1 次后, 添加最终浓度为 2 μ g/ml 的 3,8-二氨基-5-[3-(二乙基甲基氨合)丙基]-6-苯基菲啶鎓二碘化物(PI), 用荧光测定计进行测定(FACScan ベクトンディッキンソン)。
20

用靶向操作选择生细胞, 即 PI 阴性细胞, 表示 FITC 的荧光强度的平均波道值与作为背景值的不含各种细胞的抗体时的值的差如图 8 所示。

可确认 1-3-1 抗体比 SV-3T 细胞对 DLD-1 细胞具有更高的反应性。

· 免疫脂质体的制作

25 与实施例 7 同样, 制得封入了阿霉素的 PEG 免疫脂质体。

· 细胞增殖抑制活性(Cytotoxicity)

用健康成人的血清依次稀释本免疫脂质体, 制得换算成阿霉素的浓度为 40 μ g/ml 的稀释系列。将它们加入细胞中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时后, 在培养基中洗涤 1 次, 于 37 $^{\circ}$ C 进行培养。在コンフルエント时间, 通过 MTT 试验(J. Immunol. Methods, 65 55(1983))计测没有添加脂质体的对照试样的细胞数。各脂质体浓度的
30 细胞数是相对于对照物的细胞数为 100 % 的数。

图 9 表示对人体 DLD-1 细胞和 SV-3T 细胞增殖的抑制活性。本免疫脂质体

对作为靶细胞的大肠癌 DLD-1 细胞显现出特异的抑制效果,即本免疫脂质体具有抗肿瘤效果。

将本发明的二价反应性水溶性高分子衍生物与配体和脂质体等活性物质混合,使它们反应就能够容易地获得配体-高分子-活性物质构型的复合体。本发明的水溶性高分子衍生物能够防止配体活性的降低,还能够减弱其对活性物质的影响。

本发明的制备方法是在抗体等配体与 PEG 等高分子衍生物结合后再结合微胶粒,不需要在热力学不稳定的微胶粒中导入过量的 PEG 等高分子衍生物,所以,不受到它们的影响,就能够制得配体结合体。

本发明中,在微胶粒中封入药物等的情况下,能够减少内封物的漏出,此外,还能够对抗原等标识分子显现出较高的结合活性。

图 1 表示在抗体中导入 Ac-S-PEG-Suc,通过脱保护基处理生成巯基。

横轴表示抗体与 Ac-S-PEG-Suc 反应时的摩尔比,纵轴表示由此生成的相当于 1 分子抗体的巯基分子数。白圈表示与 Ac-S-PEG-Suc 反应后用羟胺脱保护基的抗体,黑圈表示没有用羟胺进行脱保护基处理的抗体。

图 2 表示在抗 CEA 抗体中通过 Ac-S-PEG-Suc 或 SATA 导入巯基,与抗体结合,并封入了羧基荧光素的脂质体的结合活性。各免疫脂质体和没有结合抗体的脂质体在 CEA 固定化板上反应,洗净后通过荧光对结合在板上的脂质体量进行测定。横轴表示各脂质体量(脂质量),纵轴表示激发波长为 492nm、荧光波长为 520nm 时的荧光强度。

圆圈表示使用了通过 Ac-S-PEG-Suc 导入了巯基的抗体的免疫脂质体,正方形表示通过 SATA 导入了巯基的抗体的免疫脂质体,× 表示没有结合抗体的脂质体。

图 3 表示通过 Ac-S-PEG-Suc 导入了巯基的抗体和荧光素马来酰亚胺结合后的荧光抗体对 MKN45 癌细胞的结合活性。

与细胞反应后用荧光测定计解析。图中 a 表示未与荧光抗体反应的细胞群,b 表示与荧光抗体反应的细胞群。横轴表示荧光量。纵轴表示细胞数。

图 4 表示从使用了 Ac-S-PEG-Suc 的免疫脂质体(白圈)中漏出的内封羧基荧光素和从相应的非修饰脂质体(黑色正方形)中漏出的羧基荧光素的比较情况。

纵轴表示残存于脂质体的羧基荧光素的%,横轴表示培养时间。

图 5 表示本发明的结合了配体的微胶粒的制作方法。A 表示配体中的官能团,A'表示与 A 具有反应性的基团,B 与导入微胶粒粒子的反应性基团 B'和 B''

有特异的反应性。

图 6 表示在抗 CEA 抗体中通过 Ac-S-PEG-Suc 或 SATA 导入巯基, 与抗体结合, 然后封入经过巯基化的聚乙二醇编码的羧基荧光素形成的脂质体的结合活性。横轴表示各脂质体量(脂质量), 纵轴表示激发波长 492nm、荧光波长 520nm 时的荧光强度。圆圈表示使用通过 Ac-S-PEG-Suc 导入了巯基的抗体的免疫脂质体, 正方形表示使用通过 SATA 导入了巯基的抗体的免疫脂质体, × 表示没有结合抗体的脂质体。

图 7 表示血中浓度推移的变化。纵轴表示血浆中的阿霉素浓度, 横轴表示时间。各点表示一组四只老鼠的平均值和 SD 值。图中, 圆圈表示使用通过 Ac-S-PEG-Suc 导入了巯基的抗体的免疫脂质体, 正方形表示只结合了巯基化 PEG 的脂质体, × 表示连巯基化的 PEG 也没有结合的单脂质体。

图 8 表示 1-3-1 抗体对 DLD-1 细胞和 SV-3T 细胞的反应性。纵轴表示平均波道数与作为背景值的不含抗体时的值的差。

图 9 表示实施例 8 所得的免疫脂质体对 DLD-1 细胞和 SV-3T 细胞的细胞增殖抑制活性。纵轴表示添加脂质体试样时的细胞数(MTT 试验的吸光度), 以 100 % 为基准。横轴表示作为脂质体浓度的阿霉素浓度。□ 表示 DLD1 细胞的增殖率, ○ 表示 SV-3T 的增殖率。

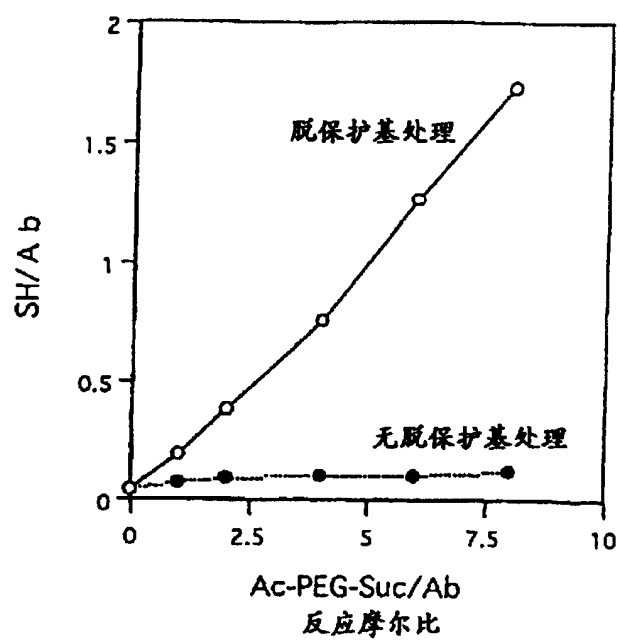


图 1

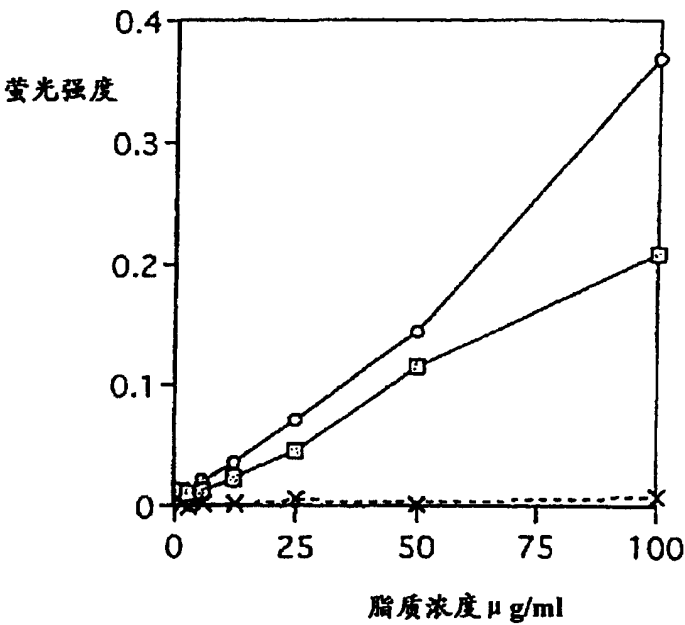


图 2

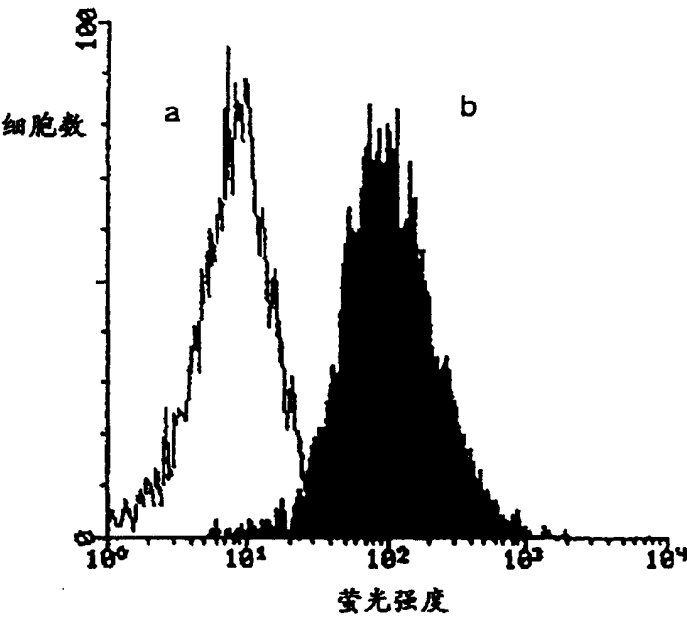


图 3

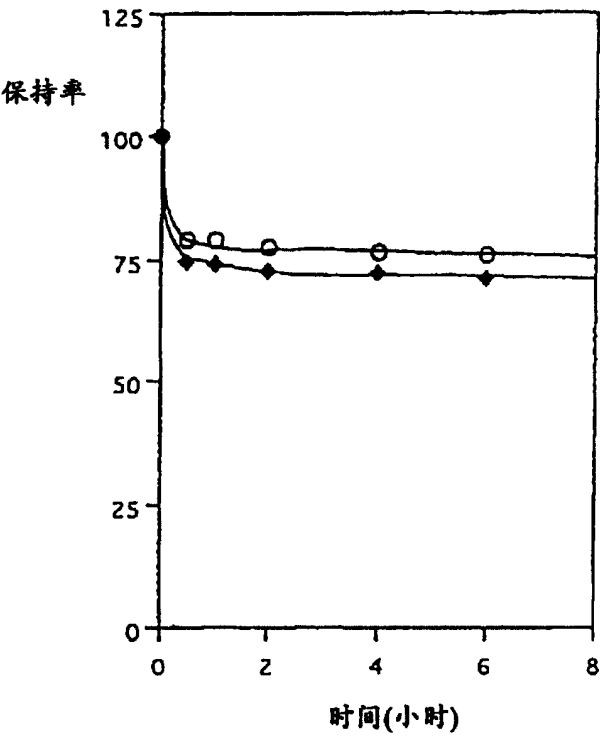


图 4

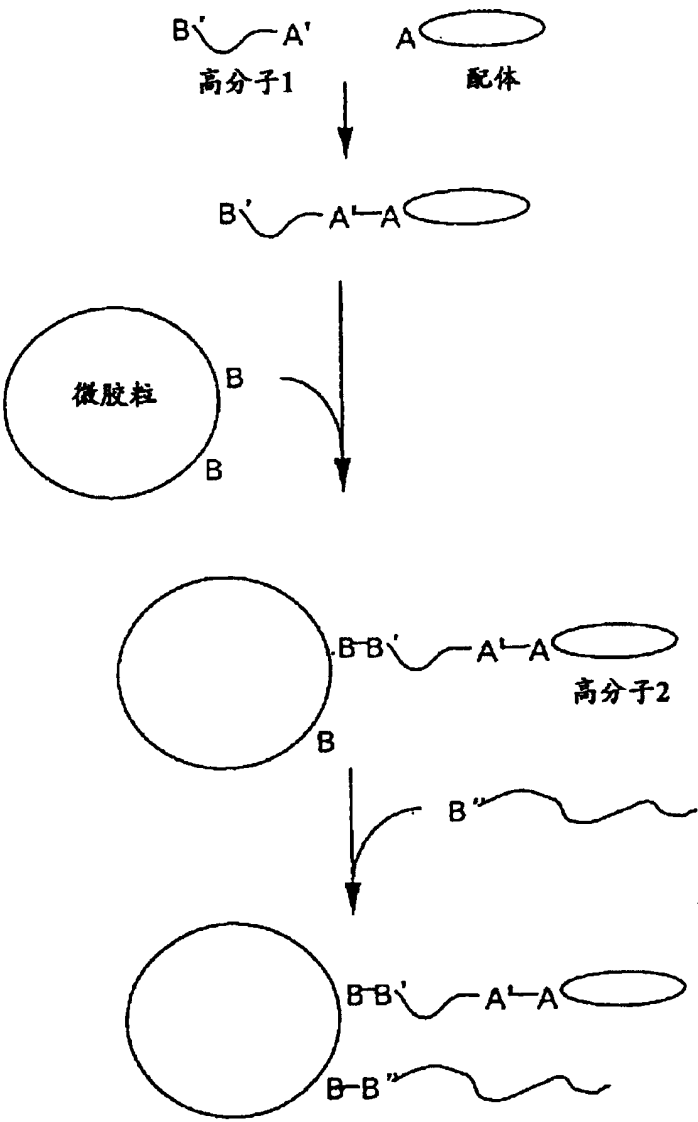


图 5

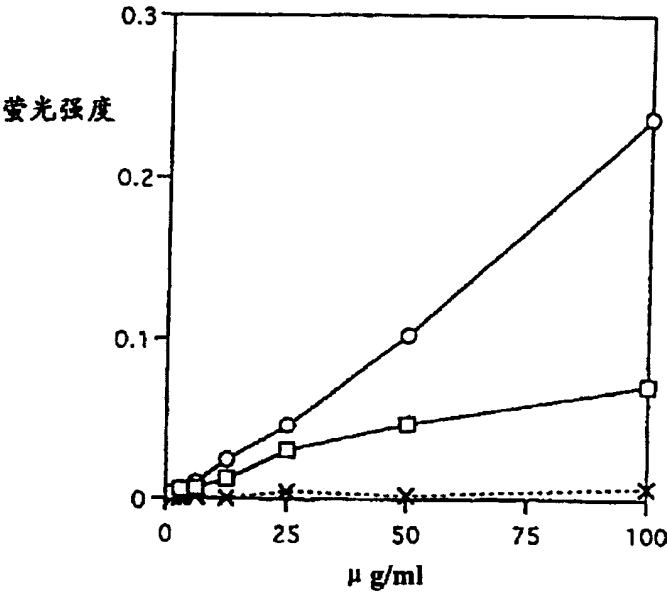


图 6

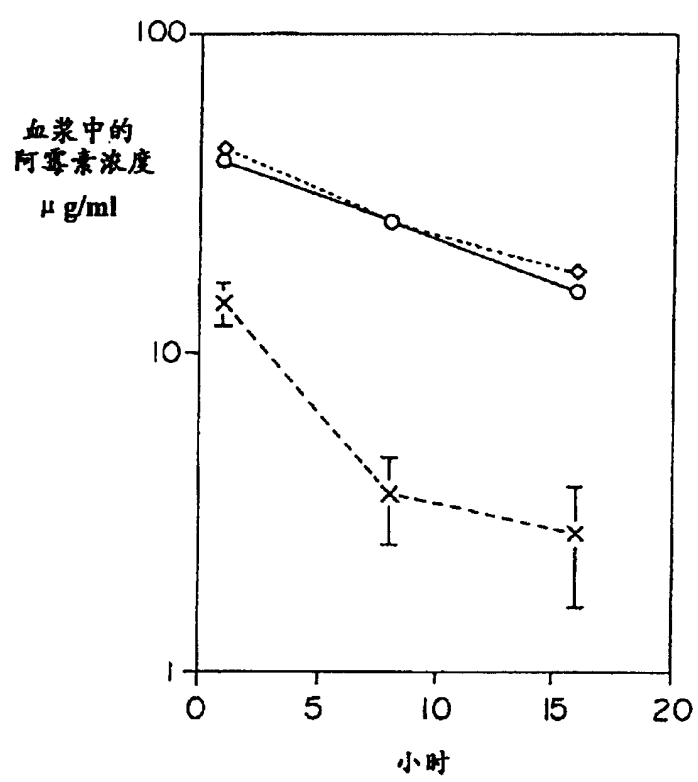


图 7

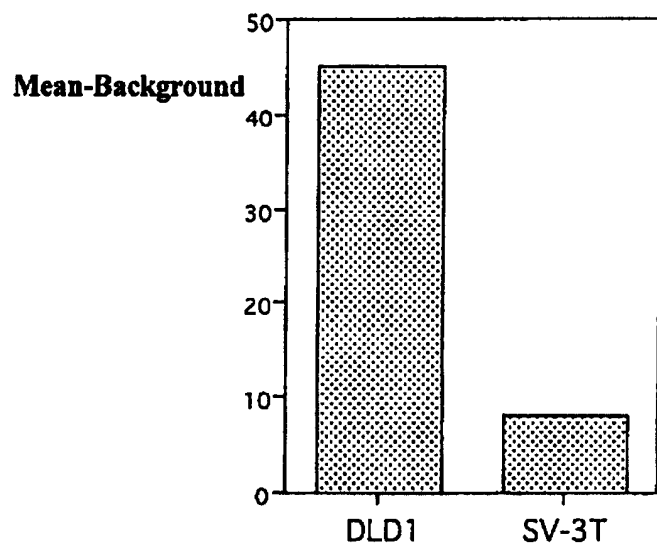


图 8

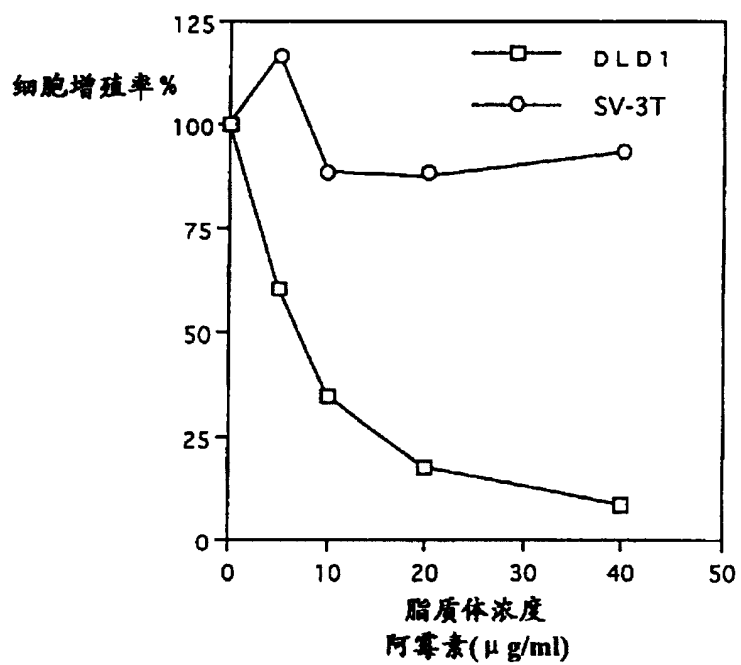


图 9