



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ³ : A61K 39/395, 37/02, 35/78	A1	(11) 国際公開番号 WO 83/ 00810 (43) 国際公開日 1983年3月17日 (17. 03. 83)
(21) 国際出願番号 PCT/ JP82/ 00356 (22) 国際出願日 1982年9月7日 (07. 09. 82) (31) 優先権主張番号 特願昭56-142158 (32) 優先日 1981年9月8日 (08. 09. 81) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/ JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1の40 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/ 出願人 (米国についてのみ) 中西俊博 (NAKANISHI, Toshihiro) [JP/ JP] 〒567 大阪府茨木市双葉町16番16号 サントリー社宅8号 Osaka, (JP) 吉栖 肇 (YOSHIZUMI, Hajime) [JP/ JP] 〒569 大阪府高槻市登町115番地-55A-36-208 Osaka, (JP) 今井浩三 (IMAI, Kozo) [JP/ JP] 〒065 北海道札幌市東区北十六条東二丁目 Hokkaido, (JP) 谷内 昭 (YACHI, Akira) [JP/ JP] 〒064 北海道札幌市中央区南十四条西十四丁目 Hokkaido, (JP) フェローネ ソルダノ (FERRONE, Soldano) [US/ US] 〒92307 カルフォルニア州 ラホヤ シニック ドライブ ノース 8936 California, (US)	(74) 代理人 門脇 清 (KADOWAKI, Kiyoshi) 〒532 大阪府大阪市淀川区東三国1丁目32番12号 リビース新御堂606号 Osaka, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: SELECTIVE CARCINOSTATIC AGENT (54) 発明の名称 選択性制癌剤 (57) Abstract A selective carcinostatic agent prepared by chemically bonding a monoclonal antibody for human cancer antigen yielded by hybridoma with a carcinostatic substance. As the carcinostatic substance, basic polypeptides of wheat such as SP₁, SP₂ and SPH, and carcinostatic antibiotics such as adriamycin and daunomycin are preferable. The chemical bond between the carcinostatic substance and the monoclonal antibody is formed by chemically reacting the amino, carboxyl or aldehyde group of the former with the free amino or carboxyl group of the latter. The agent of this invention shows a selective toxicity for cancer cells but scarcely affects normal cells. Accordingly, it provides an excellent carcinostatic effect in less dose than with conventional carcinostatic agents. (57) 要約 ハイブリドーマの産生したヒトの癌抗原に対するモノクロナル抗体と制癌作用物質とを化学的に結合せしめたる選択性制癌剤。 制癌作用物質としては、例えばSP₁, SP₂, SPHのような麦類の塩基性ポリペプチドやアドリアマイシン、ダウノマイシンなどの制癌性抗生物質が好ましい。これらの制癌作用物質とモノクロナル抗体との結合は、前者の持つアミノ基、カルボキシル基又はアルデヒド基を、後者の持つ遊離アミノ基又はカルボキシル基と化学的に反応させることにより行われる。 本発明に係る薬剤は、癌細胞に対し選択的に毒性を示すが正常細胞に対しては殆んど作用しないため、従来の制癌剤と比べて相対的に少ない用量で優れた制癌効果を奏するものである。		

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	KP	朝鮮民主主義人民共和国
AU	オーストラリア	LI	リヒテンシュタイン
BE	ベルギー	LK	スリランカ
BR	ブラジル	LU	ルクセンブルグ
CF	中央アフリカ共和国	MC	モナコ
CG	コンゴ	MG	マダガスカル
CH	スイス	MW	マラウイ
CM	カメルーン	NL	オランダ
DE	西ドイツ	NO	ノルウェー
DK	デンマーク	RO	ルーマニア
FI	フィンランド	SE	スウェーデン
FR	フランス	SN	セネガル
GA	ガボン	SU	ソビエト連邦
GB	イギリス	TD	チャード
HU	ハンガリー	TO	トーゴ
JP	日本	US	米国

(1)

明 細 書

発 明 の 名 称

選択性制癌剤

〔 技 術 分 野 〕

- 5 本発明は選択性制癌剤、殊にハイブリドーマの産生したヒトの癌抗原に対する単クローン性抗体（以下“MoAb”と略す）と制癌作用物質とが化学的に結合しているヒトの癌細胞に対し特異的に親和性を有す制癌剤に関する。

〔 背 景 技 術 〕

- 10 悪性腫瘍、即ち癌に対する治療薬としては、既に多数の細胞毒性物質が臨床的に実用又は試用されているが、これらはいずれも癌細胞に対し非特異的であって、正常細胞に対しても毒性を有するので、有効濃度に達するまで投与量を増加するのは不可能であるという本質的な欠点がある。このため、現在においても癌の化学療法剤に対する信頼性は乏しく、早期発見、外科手術というのが依然として癌治療の大道である。

- 20 そこで近年に至り、制癌作用や細胞毒性を有する物質を特殊なキャリアーに結合させ、これを選択的に癌細胞に伝達、作用させるというアイデアが生まれ、この線に沿って、癌細胞の持つ抗原に対する抗体の利用が研究されてきた。元来、同一個体の同種の又は異種の抗腫瘍抗体は、必ずしも癌細胞に対し傷害作用を発揮するという訳ではないが、高い確率をもって癌細胞に結合する性質を有する点では共通している。この性質を利用して、例えば、
- 25



(2)

- ダウノマイシン等の制癌剤と抗腫瘍免疫グロブリンの Fab' 二量体とを共有結合させた例 (特開昭 51-144723 号)、
 - ジフテリア毒素とウサギ SV₄₀ 抗体をグルタルアルデヒドで架橋した複合体 (F.L Moolten et al ; J Natl Cancer Inst., Vol. 55, pp. 473~477 (1975))、
 - ジフテリア毒素と抗リンパ球抗体とをクロラムブシルを介して結合した結合体 (Nature, Vol. 271, pp. 752~754 (1978))、
- 10 などが発表されており、この他、特開昭 55-136235、同 55-49321、同 56-16418、同 56-16417 などの発明も公開されている。

15 しかしながら、これらの文献で使用される抗体はどれも単一の抗体ではなく、正常細胞の抗原に対する抗体をも併せ含有するため、癌細胞に対する選択性が不充分であって、このため、薬剤が正常細胞に対しても傷害的に作用する可能性が高い。

[発明の開示]

20 しかるに、本発明者らは癌細胞に対してのみ選択的に作用しうる抗腫瘍薬剤の創製に努力した結果、細胞融合法により得られた融合細胞 (ハイブリドーマ) が産生する蛋白を精製することによりヒト癌細胞の抗原に対する MoAb を得ることに成功し、これを抗腫瘍薬剤又は細胞毒性物質と化学的に結合させることにより、ここに癌細胞
25 に対して特異性のある選択性制癌剤を得ることができ



(3)

た。

即ち、本発明の薬剤は、癌細胞の成長を抑制し又はこれを死滅させる作用を有する活性成分と、該活性成分を担持し、これを癌細胞に誘導する担体成分とから構成される。活性成分は、今日制癌剤として実用されていると
5 否とを問わず強力な細胞毒性作用を有するものが好ましく、例えばエンドキサン、ナイトロミン、サルコリシン、ミレラン、シクロホスファミドなどのアルキル化剤、ア
メトプテリン、8-アザグアニン、5-フルオロウラジ
10 ル、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリンなどの代謝拮抗物質；マイトマイシンC、アクチノマイシンD、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ザルコマイシンなどの抗生物質；ビンブラスチンなどのアルカロイド；
15 テリア毒素、ボツリヌス毒素、破傷風毒素、リシン(ricin)のような毒性蛋白又はペプチドが例示できる。

担体成分はヒト癌抗原に対する単一抗体であって発明の主要部を構成する。このものは、ヒトの癌細胞で感作された適当な実験動物、例えばBALB/cマウスの脾臓細胞
20 と、マウス由来の骨髓腫細胞(ミエローマ細胞)との融合細胞(ハイブリドーマ)で、これをクローニングすることにより、ヒト癌細胞の癌特異抗原と結合能のあるMoAbを産生する融合細胞を選択、分離し、次いでこの選択された癌特異抗原と結合能を有する抗体産能を有する融合
25 細胞を増殖させることにより得られる。

(4)

培養法又は動物体内で増殖した融合細胞（ハイブリドーマ）は採集され、それから適宜の手段で抗体が分離される。発明目的上、この癌抗体は可及的純粋でなければならず、理想的には電気泳動的に単一にまで純化されているのが好ましい。

精製された抗体は、次いで所望の抗腫瘍性薬剤又は細胞毒性物質と化学的に結合せしめられる。この結合は、抗体の有する遊離のアミノ基又はカルボキシル基と薬剤の持つアミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基などを化学的に反応させることにより行われるが、具体的には例えば以下の諸法がある。

(i) 薬剤が塩基性蛋白又はポリペプチドである場合 —

この場合、結合体の合成中に抗体・抗体、薬剤・薬剤、抗体・薬剤・薬剤などの副生物の生成を如何に防ぐかという点が重要である。さらに、結合体が抗体として特異性を有しなければならないのも当然である。しかし発明者は、薬剤中のアミノ基の大部分をグアニジル化した後、その遊離アミノ基を、抗体中の酸性アミノ酸部分のカルボキシル基とカルボジイミド試薬を用いて縮合させると、一般に良好な結果の得られることを確認した。この方法を適用しうる具体的な薬剤としては、例えば麦類の塩基性ポリペプチド（ SP_1 , SP_2 , $SP-H$ など）、マイトマイシン、ダウノマイシン、アドリアマイシン、ACNU、カルボコン、メルファラン、クロラムブチルなどが例示される。

(5)

(ii) 薬剤が糖を構成成分とする場合 —

この場合、薬剤の糖部分における隣接したヒドロキ
ル基（一部アミノ基の場合もある）の間をメタ過ヨウ
素酸ナトリウムを用い切断してアルデヒド基を生成さ
5 せた後、抗体の塩基性アミノ基との間に Schiff ベース
を形成させ、この Schiff ベースを水素化ホウ素ナトリ
ウムのような選択的還元試薬で還元して相当するアミ
ノメチル体とする。この方法により結合できる薬剤化
合物の具体例としては、例えばダウノマイシン、アド
10 リアマイシン、FT-207、シタウビン、チオイノシンな
どが例示される。

(iii) 薬剤がアミノ基を有する場合 —

この場合はグルタルアルデヒドの如き 2 価アルデヒ
ドにより薬剤と抗体のアミノ基とを交叉結合させる。
15 結合物は必要に応じ飽和化合物に還元される。

〔図面の簡単な説明〕

第 1 図は、SP-H・抗体結合反応生成物のセファデック
ス G-200 による分画状況を示すグラフ（溶出曲線図）、第
2 図は、SP-H・抗体結合体の Colo 38 細胞に対する選択的
20 吸着能を示すグラフ、第 3 図及び第 4 図は SP-H・MoAb 結
合体の Colo 38 細胞（メラノーマ細胞）及び Raji 細胞（
正常細胞）に対する阻害効果を示すグラフ、第 5 図及び
第 6 図は SP-H・MoAb 結合体の Colo 38 細胞及び Raji 細胞
に対するチミジン取りこみ阻害効果を示すグラフ、第 7
25 図はアドリアマイシン・MoAb 結合体の Colo 38 細胞に対す

(6)

る細胞障害効果を示すグラフ、第 8 図及び第 9 図は、本
発明に係る SP-H・MoAb 結合体の担癌マウスに対する延命
効果を示すグラフである。第 2 図～第 6 図を通じ実線は
Colo38 に対する結果を、点線は Raji 細胞に対する結果を
5 示し、また△、○、●、□、及び▲は夫々 MoAb 単独、結
合体 I (第 1 図 F-I)、合体 II (第 1 図 F-II)、フラ
クション III (第 1 図 F-III) 及び SP-H 単独 (物質番号 SUN
9102) を現わす。また、第 7 図中○はアドリアマイシン
・MoAb 合体、◎はアドリアマイシン単独、△は MoAb 単
10 独を、第 8 図及び第 9 図中▲は SP-H・MoAb 合体を、○
は MoAb 単独を、●は薬剤無投与を、△は SP-H 単独を示す。

[発明を実施するための最良の形態]

以下実施例により発明を実施するための最良の形態を具
体的に述べるが、もちろん説明は単なる例示であって、
15 発明思想の内包・外延を限るものではない。

実施例 1. (ハイブリドーマ (225,28S) の培養及び MoAb の精
製)

予めダルベッコ変法イーグル培地 ((Dulbecco's Modified
Eagle Medium)(D-MEM)、(10% の仔牛血清を含む)) 中で
20 培養したハイブリドーマ (225,28S) を BALB/c マウス (♀、
8～12 週令) の腹腔内に 5×10^6 個ずつ接種する。なお、
マウスには接種の 1 週間前にプリステイン (2, 6, 10, 14-
テトラメチルペンタデカン) を 0.3 ml ずつ腹腔内へ投与し、
ハイブリドーマが生育し易い状態にしておく。

25 ハイブリドーマの接種後 2 週間目よりマウスが斃死す



(7)

るまで腹水を収集する。この腹水を 3000 r.p.m., 10 分間遠心して赤血球及びプリスティンを除く。上清に飽和硫酸アンモニウム溶液を終濃度 33.3% になるように充分混合しながら加え、4℃で 1 時間以上放置する。生成した沈

5 澱を遠心分離する (10000 r.p.m., 10 分, 4℃)。集められた沈澱を少量のリン酸塩緩衝生理食塩水液 (Ca^{++} 及び Mg^{++} なし) (PBS) に溶かし、透析用チューブ (Cellophane Tubing-Seamless, 米国 Union Carbide 社製) 中に埋めて一夜 PBS に対し透析する。この間少くとも 4 回外液の

10 交換を行い、最後に M/100 トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対し透析した後、予め同一緩衝液で緩衝化された DE-52 カラム (2.5 × 16.5 cm) に負荷する。このカラムを同一の緩衝液を用い、但し該液中の食塩濃度が 0 ~ 0.5 M で直線的に変化するように食塩を添加して溶出する。溶出ピー

15 ク画分 (280 nm において) 中の MoAb 活性は ^{125}I -プロテイン A を用い、ヒト悪性黒色腫 (Human Malignant Melanoma) への結合 (binding) 量で測定する。活性画分を 4℃で濃縮後、セファデックス (Sephadex) G-200 カラム (1.5 × 90 cm) を通すと、280 nm の吸収パターンでは単一のピークにまで精製される。この MoAb は電気泳動的にも単一である。

20 このものは凍結乾燥するか又は凍結状態で保存できる。なお、以上の培養及び精製単離手段は、ハイブリドーマの産生する、ヒト悪性黒色腫抗原に対する他の MoAb、例えば 376.74, 376.96, 465.14, 47354, 65325 (以上の数値

25 はハイブリドーマとその産生する MoAb の種類を示す。) に

(8)

対しても適用される。各抗体は悪性黒色腫の抗原に対してのみ特異的に結合するが、抗体の種類により多少結合部位を異にするため、数種のMoAbと薬剤との結合体との混合物は、結合部位を異にする数種の抗体・薬剤結合体
5 によるカクテル療法の可能性を示唆する。

実施例 2. (薬剤・MoAb 結合体の製造, その 1)

O-メチルイソ尿素 2.582g (0.5 モル) を水 25 ml に溶かす。これを 10 N 苛性ソーダを用いて pH3.2 に調整後、SP-H (麦類中から本発明者らにより単離された塩基性ポリ
10 ペプチドで、4 本の -S-S- 鎖で結ばれた 45 ケのアミノ酸単位から構成される。特開昭 54-49342 号参照。) 300mg を添加、溶解させた後、さらに苛性ソーダ液を注加して pH 9.2 まで上げ、4℃で 48 時間放置する。次いで反応画分液をセファデックス G-10 を用いゲル濾過し、溶出液を凍
15 結乾燥すると、グアニジル化 SP-H の標品 299mg が得られる。この標品では、原 SP-H 中の 5 個の ϵ -リジンの遊離アミノ基のうち約 4 個がグアニジル化されているが、その抗腫瘍細胞活性は無処理の SP-H と殆んど変わらない。

以上のグアニジル化 SP-H 35mg と、前例で得た抗体の凍結乾燥品 10mg を 1.5 ml の PBS に溶解し、これに水溶性
20 カルボジイミド水溶液 60 μ l を添加した後、6 N 塩酸で pH 8.5 に調整し、室温下で 4 時間攪拌する。反応液は攪拌中止後、直ちにセファデックス G-200 カラム (1.5 $\times$ 90 cm) を用いてゲル濾過に附す。この際、溶離液として PBS を用
25 い、24 ml/時 の速度でカラム中を自然流下させ、溶出液

(9)

を 4 ml ずつ分画する。第 1 図に示す如く、溶出液は波長 280nm における吸光度を指標として F-I ~ F-III の 3 個のフラクションに分画される。後述の如く、フラクション F-I (チューブ 9 ~ 10) 及び F-II (チューブ 12 ~ 15) は所望の SP-H・MoAb 結合体である。これに対しフラクション F-III (チューブ 26 ~ 30) は、恐らく未反応のグアニジル化 SP-H であろうと考えられる。

実施例 3. (薬剤・MoAb 結合体の製造, その 2)

アドリアマイシン 40mg を 1 ml の PBS 中に溶解し、この溶液にやや過剰量のメタ過ヨウ酸ナトリウム (NaIO_4) を加え、暗所で 1 時間放置する。得られた反応液にグリセリン水 (IM) を終濃度 0.05 M になるように加えて過剰の過ヨウ素酸ソーダを分解する。この薬剤溶液に、0.15 M の炭酸カリウム溶液 1 ml 中に溶かした実施例 1 の抗体 20mg を加え (pH 9.5)、室温で 1 時間反応させる。この反応液に、水素化ホウ素ナトリウムを該反応液 1 ml 当り 0.3mg の割で加え、37℃ で 2 時間放置してからゲル濾過すると、アドリアマイシン・MoAb 結合体を得られる。

実施例 4. (薬剤・MoAb 結合体の製造, その 3)

実施例 1 で得た抗体 30mg とダウノマイシン 5 mg を PBS 3 ml に溶解し、これにグルタルアルデヒドを終濃度 0.1% になるように加え、室温で 15 分間放置する。得られた反応液をゲル濾過して精製すると、目的のダウノマイシン・MoAb 結合体を得られる。

[本発明物質の免疫学的性質]



(10)

以上各実施例で得られた薬剤・抗体結合体は標的癌細胞に対し選択的に結合する性質を有する。以下、本事実を証する実験事実を記載する。

(実験材料)

- 5 細胞 : Colo38 細胞 (ヒト悪性黒色腫細胞)、及び
 Raji 細胞 (B - 細胞由来のヒトリンホイド細胞)

培養液 : Colo38 用 - 10% 仔牛血清添加ダルベッコ変
 形イーグル培地 (前出)

- 10 Raji 用 - 10% 仔牛血清添加 RMPI1640 培地
 薬剤 : 実施例 2 記載の SP-H・MoAb 結合体、PBS に
 溶解して適用。なお、希釈には夫々の培地
 溶液を使用。

(実験方法)

- 15 Colo38 及び Raji 細胞を予め 3 日間培養し、各細胞
 を 5 回培養液と同組成の洗浄液で洗ってから、プラス
 チック製プレートに各プレート当り 10^5 個づつ細胞を散
 布する。これらのプレートに薬剤 (結合体) を終濃度
 として 1 ml 当り 0 ~ 100 μ g 添加し、4 °C で 1 時間攪拌
20 しながら放置する。次いで細胞を同様に 5 回洗い、黄
 色ブドウ状球菌 (Staph. aureus sp.) 由来の、 125 I で標
 識されたプロテイン A を適量加えて 1 時間放置し、同
 様に 5 回洗浄後、ガンマカウンタ (ベックマン社
 (米国) 製) を用いて 125 I の細胞に対する付着量を測
25 る。因みに、プロテイン A は結合体の Fc 部分に結合す

(II)

るため、細胞に結合体が結合しておればプロテイン A もそれに結合するので、放射能の測定により結合の有無及び程度が判る。

(実験結果)

- 5 以上の実験結果は第 2 図に示される。図示の如く癌特異抗原を持つ Colo38 は実線で、該抗原を持たない Raji は点線で示される。MoAb(225.28S)、結合体 I (F-I)、結合体 II (F-II) はその濃度に従って Colo 38 細胞に結合しているのが判る。これに反し適応抗原を有しない Raji
- 10 細胞に対しては、抗体 (225.28S)、結合体 I (F-I) 及び結合体 II (F-II) のいずれも全く結合していない。フラクション F-III は Colo 細胞に結合しないので、ゲル濾過時の挙動と併せて未反応の SP-H であろうと推測される。なお、対照とした未結合の薬剤単独 (SP-H)
- 15 は、抗体を有しないため当然のことながら Colo 及び Raji いづれの細胞に対しても結合しない。

[本発明物質の細胞障害効果 (その 1)]

- 本発明に係る薬剤・抗体結合体は抗原細胞に対し明らかに選択性を有する。以下、この結論を支持する実験事
- 20 実を示す。

(実験材料)

上掲実験と同じ。

(実験方法)

- 各細胞をプレート当たり 2×10^5 個ずつ分散させ、同時に各結合体を培地 1 ml 当たり 0 ~ 100 μ l ずつ添加して 37 °C
- 25



(12)

48時間培養した後、一部の細胞を採取してその生死を終濃度 0.05% のトリパンブルーに対する染色性の存否（染色されないものを“生”、染色されるものを“死”として判断）をチュルクービュルカー（Türk-Bürker）計算盤を用いて算定した。

（実験結果）

実験結果は添附第 3 図及び第 4 図に示される。前記結合体 I 及び II はメラノーマ抗原を有する Colo 38 細胞に対し細胞障害効果を示すが（第 3 図参照）、癌抗原を有しない Raji 細胞には殆んど障害効果を示さない（第 4 図参照）。これに反し対照として用いた MoAb(225. 28S) はいずれの細胞をも傷害せず、また薬剤単独（SP-H）及びフラクシオン，F-III はどの細胞に対しても強い障害作用を呈している。

〔本発明物質の細胞障害効果（その 2）〕

その 1 の実験を実施例 3 で得られたアドリアマイシン・MoAb 結合体を用いて反復した。結果を第 7 図に示す。図示の如く対照の抗体単独は Colo 38 細胞に対し全く致死効果を有しない。対照のアドリアマイシン及び本発明薬剤は共に同一細胞に対し強力な致死効果を有するが、後者は前者に比し一層強力である。

〔本発明物質の細胞生理作用〕

本発明物質が標的細胞に対し阻害効果を発揮する理由は、薬剤単独使用時と同様であろうと思われる。これを検証するため、細胞のチミジン取りこみ能を阻害する作



用があることが判っている SP-H と抗体との結合体につき以下の実験を行う。

(実験材料)

前掲各実験と同じ。

5 (実験方法)

各細胞をプレート当たり 2×10^5 個ずつ分散し、同時に各結合体及び対照物質を培地 1 ml 当たり 0 ~ 200 μ g ずつ添加して 37°C、8 時間培養する。その後、各プレートに 1 μ Ci の ^3H -チミジンを加え、16 時間経過後に夫々の細胞の取りこみチミジン量を測定する。

(実験結果)

第 5 図が示すとおり、結合体 I 及び II は、標的細胞の Colo 38 に対しその添加濃度に従ってチミジンの取りこみを阻害している。これに対し、第 6 図に示す適合抗原を持たない Raji 細胞では、チミジンの取りこみは全く影響を受けない。なお、対照である抗原単独及び SP-H 単独では、予想されたとおり、前者はチミジンの取りこみを全く阻害せず、後者は強い阻害を示す。

[本発明物質の実験動物に対する抗腫瘍効果 (その 1)]

20 前実験において、本発明物質が試験管内で標的細胞に対し選択的に細胞障害作用を奏する事実が確認されたので、次に実際の標的細胞 (ヒトメラノーマ, Colo38) をヌードマウスに接種し、これに本発明物質を投与して生体内での有効性を検討したところ、その効果を明らかに観察できた。以下、その実験事実を記載する。



(実験材料)

細胞 : Colo38 (ヒト悪性黒色腫細胞)

培養液 : 10% 仔牛血清添加

RMPI 1640 培地。

5 薬 剤 : 実施例 2 記載の SP-H・MoAb 結合体

動物 : BALB/cA (-nu/JCR) スードマウス♀ 6 週令。

ヒトメラノーマ細胞は各マウスに 3.6×10^6

個づつ皮下注射。薬剤及び対照 (抗体単独

及び SP-H 単独) は夫々 0.1mg/マウス、1mg

10 /マウス 及び 0.5mg/kg の割で 1, 3, 5 及び 20

日目に腹腔内注射。

(実験結果及び考察)

結果は第 8 図に示される。対照群のマウス (各 6 匹)

は 30 日以内に死亡した。即ち SP-H 単独又は抗体単独

15 の注射はマウスの生存を延長できなかったが、本発明

薬剤投与群 (各 6 匹) は対照群に比べて明らかに生存

日数が延長され、37 日後まで生存した。

[本発明薬剤の実験動物に対する腫瘍効果 (その 2)]

その 1 の実験において、標的細胞を腹水型の Colo 38 に

20 代えて同様の実験を反復した結果を第 9 図として示す。

図示の如く対照群のマウスは 20 日までに全部死亡したが、

本発明薬剤投与群のマウスは早くとも 25 日間生存し、1

匹は 60 日後もなお生存した。従って本発明薬剤の効果は

前例に比べ一層明瞭である。

25 本発明物質は臨床的に血管内又は筋肉内注射の形で投



(15)

与されるか又は癌組織に対し直接適用されるのが最適であろう。先の実験結果が示すとおり、結合体は標的癌細胞の癌特異抗原と結合し、その後、癌細胞の食作用 (phagocytosis) 及び飲作用 (pinocytosis) により内部に取りこ
5 まれる結果、当該細胞に致死効果を奏するものと推定される。この際、適応抗原を有しないその他の正常細胞にはこの結合体が結合しないため、当然致死作用が表われないものと考えることができる。

[産業上の利用可能性]

10 以上各実験が示す如く、本発明に係る薬剤・MoAb 結合体は、適合抗原を持つ特定の癌細胞に対してのみ強い親和性を現わし、当該癌細胞を死滅させ又はその増殖を阻止する効果を有する反面、正常細胞に対しては殆んど影響を与えないので、選択的癌治療剤としての人類の癌克
15 服への貢献が囑望される。

(16)

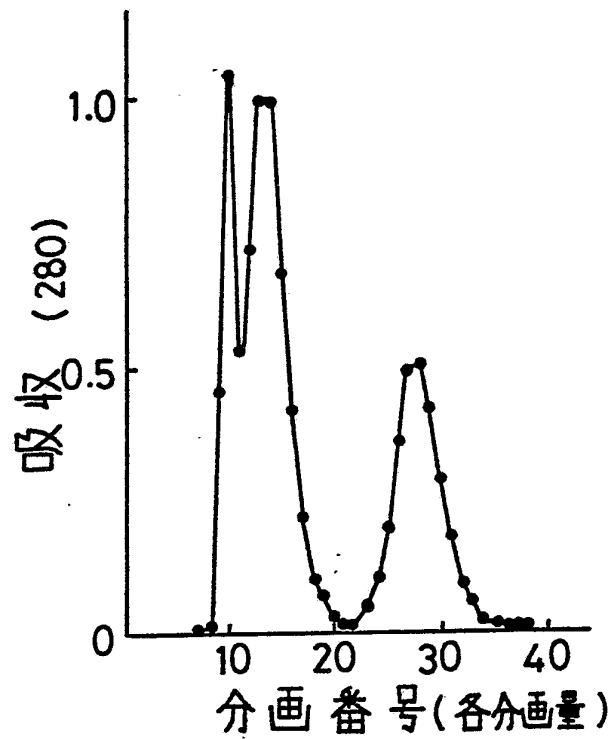
請 求 の 範 囲

- (1) ハイブリドーマの産生したヒトの癌抗原に対する単クローン性抗体と制癌作用物質とが化学的に結合している選択性制癌剤。
- 5 (2) ハイブリドーマが、ヒト悪性黒色腫で感作した動物（BALB/cマウス）の脾臓細胞と動物の骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）との融合細胞である特許請求の範囲第(1)項記載の制癌剤。
- 10 (3) 制癌作用物質が麦由来の細胞毒性を有する塩基性ポリペプチドである特許請求の範囲第(1)項又は第(2)項記載の制癌剤。
- 15 (4) 抗体中の酸性アミノ酸の遊離カルボキシル基と、制癌作用物質中のε-リジンのアミノ基とが酸アミドを構成して結合している特許請求の範囲第(3)項記載の制癌剤。
- (5) 抗体中の塩基性アミノ酸の遊離アミノ基と、制癌作用物質中の遊離カルボキシル基とが酸アミドを構成して結合している特許請求の範囲第(1)項又は第(2)項記載の制癌剤。
- 20 (6) 抗体中の塩基性アミノ酸の遊離アミノ基が、糖を構成要素とする制癌剤の骨核炭素原子と結合している特許請求の範囲第(1)項又は第(2)項記載の制癌剤。
- (7) 抗体中の塩基性アミノ酸の遊離アミノ基が制癌作用物質と飽和2価アルデヒドを介して交叉結合している
- 25 特許請求の範囲第(1)項又は第(2)項記載の制癌剤。

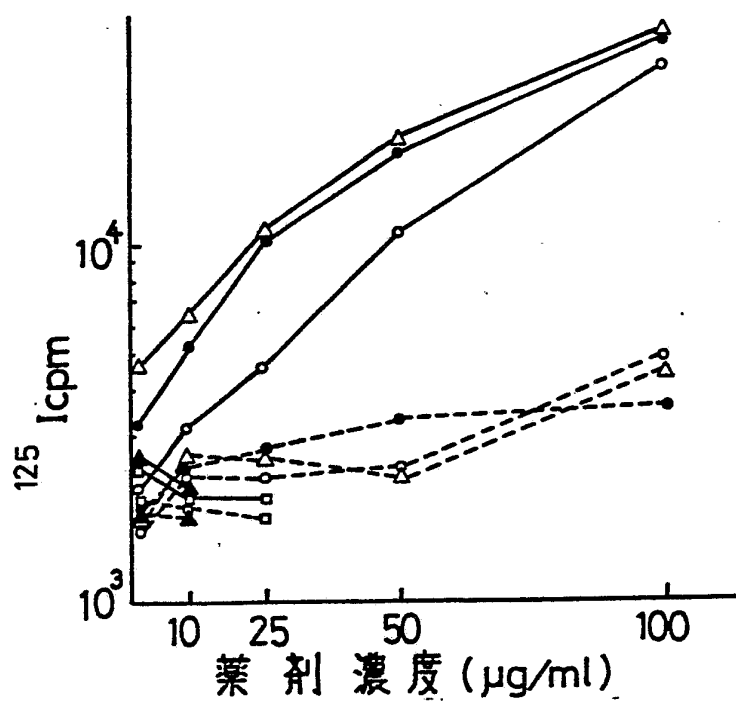


(1)

第 1 図

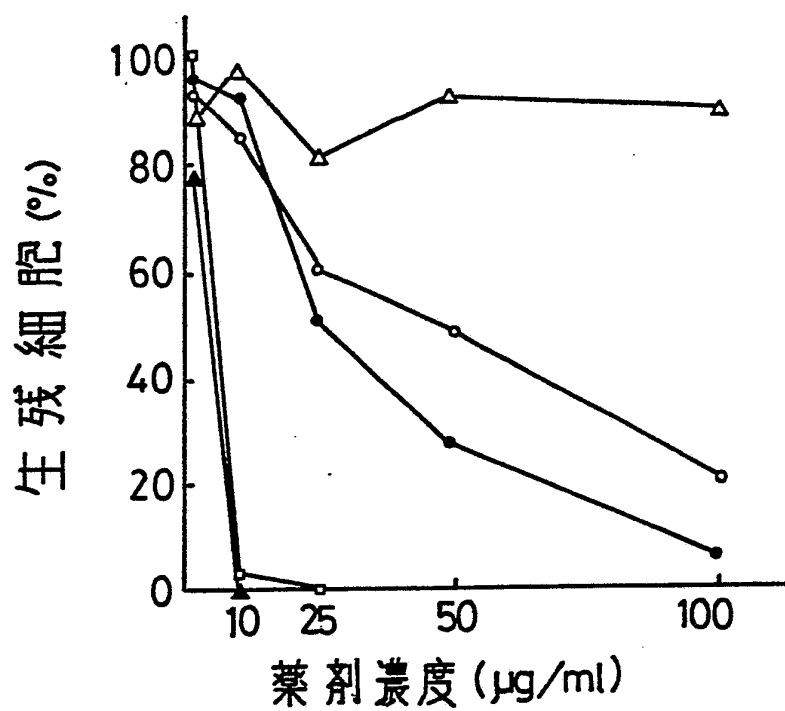


第 2 図

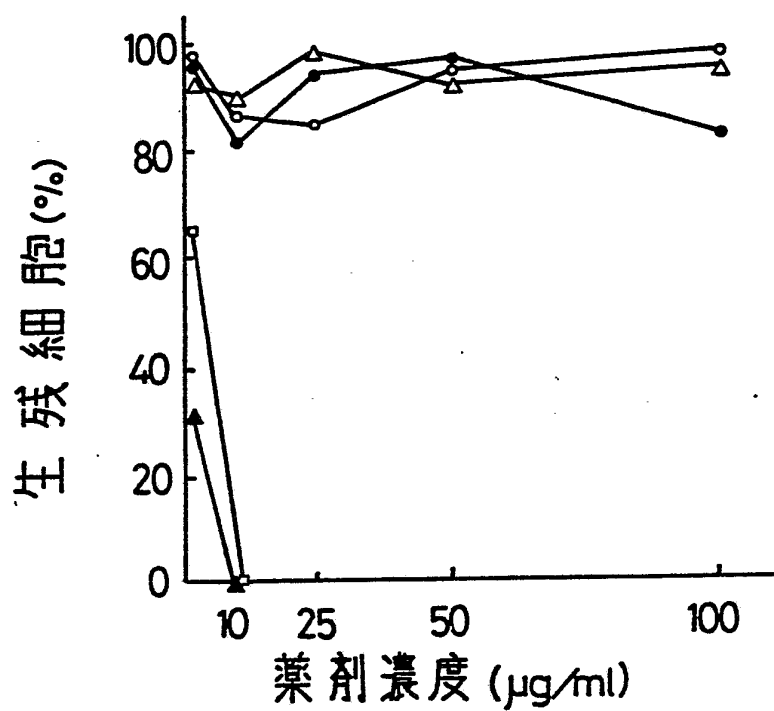


(2)

第 3 図

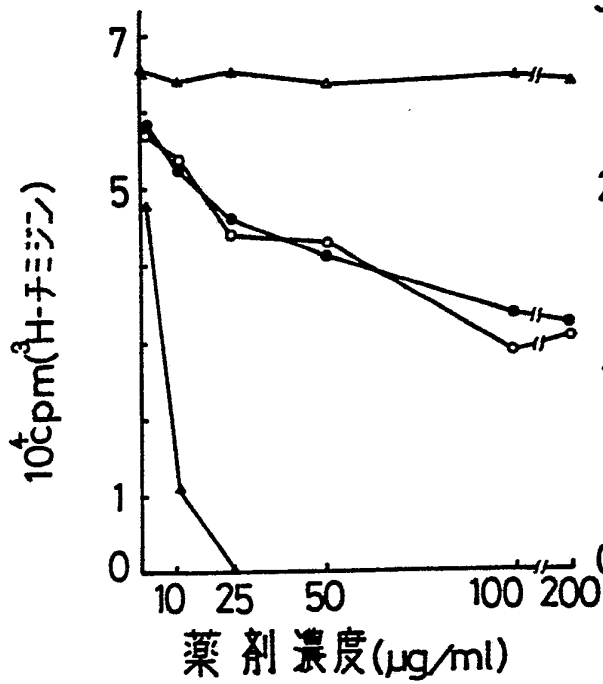


第 4 図

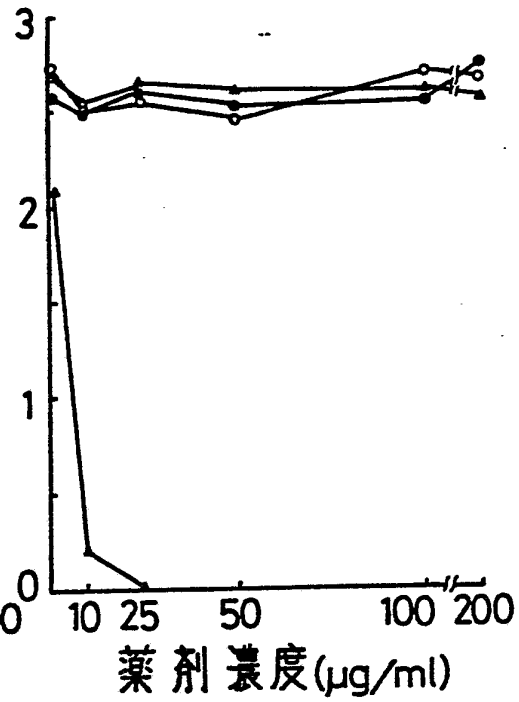


(3)

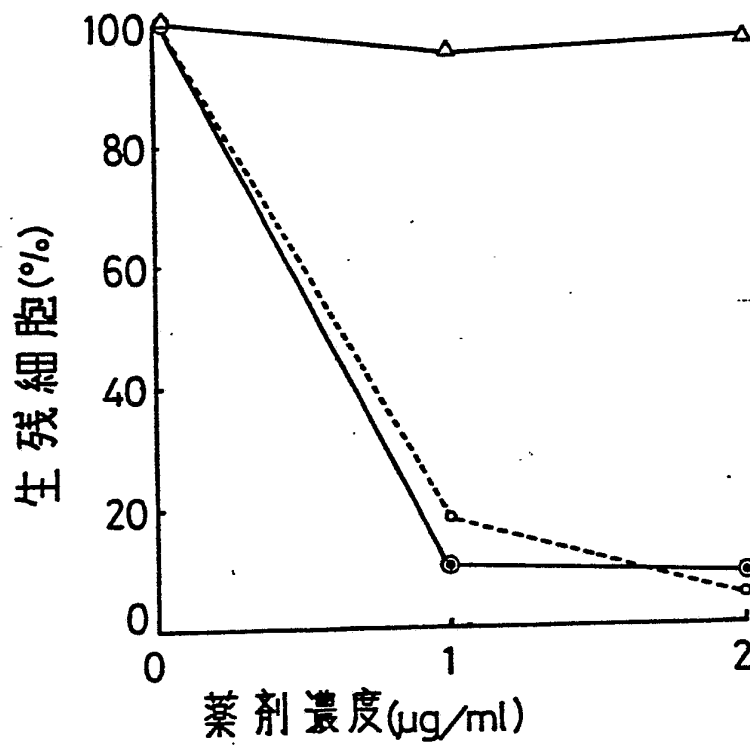
第 5 図



第 6 図

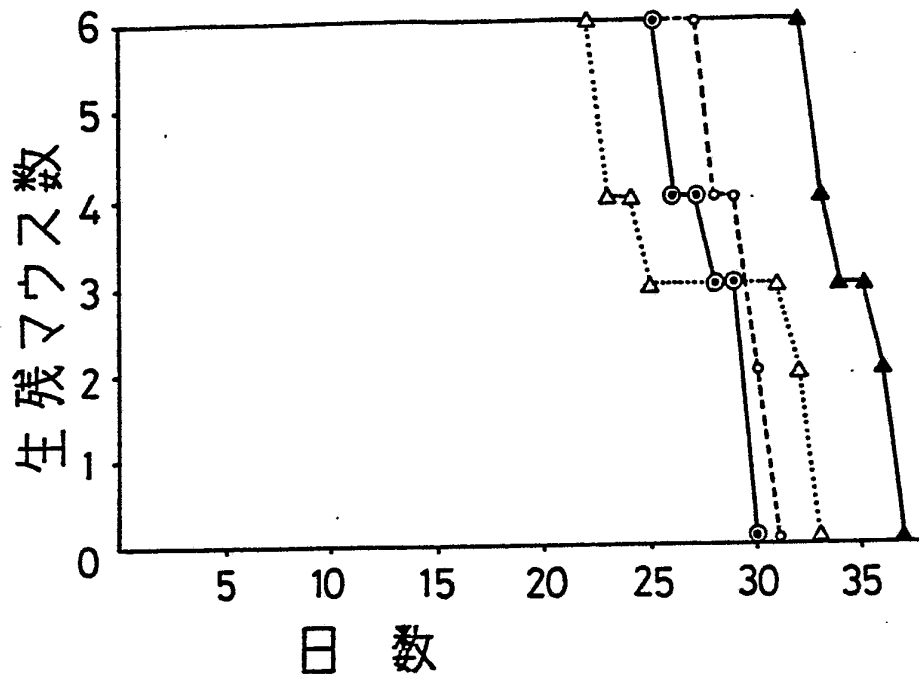


第 7 図

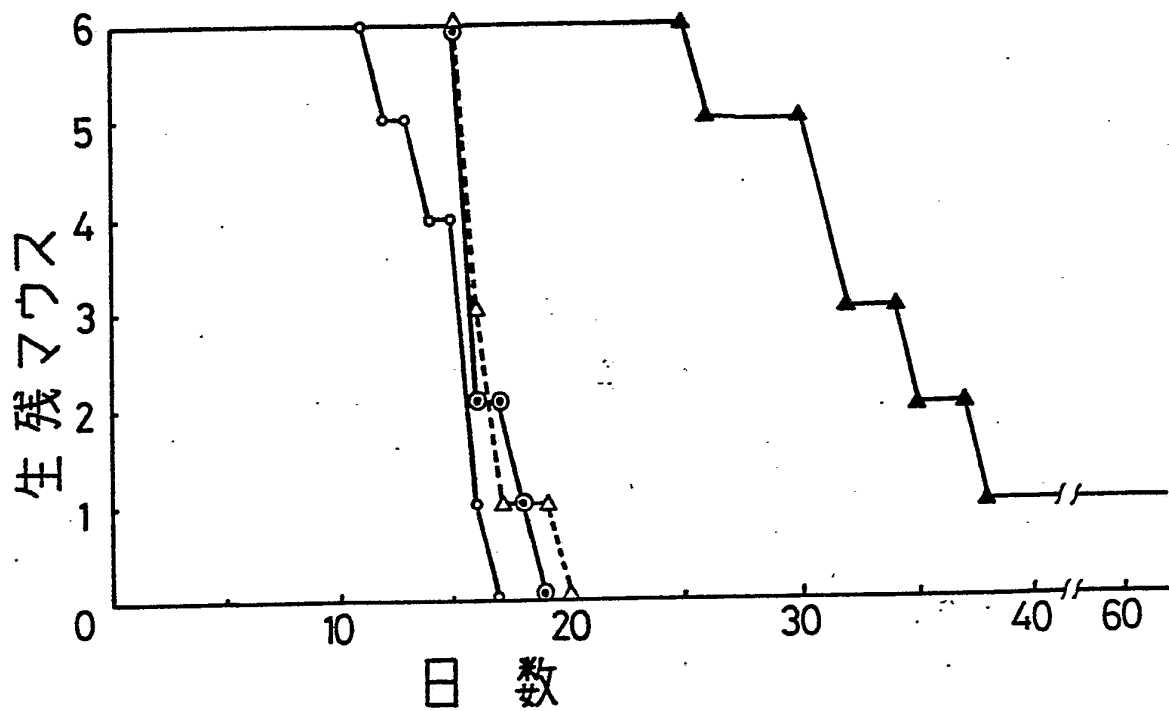


(4)

第 8 図



第 9 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP82/00356

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ²		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl. ³ A61K 39/395, A61K 37/02, A61K 35/78		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
I P C	A61K 39/395, A61K 37/02, A61K 35/78	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ⁷	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
Y	JP,A, 57-48924 (The Regent of the University of California) 20. March. 1982 (20.03.82)	1 - 7
Y	medicina, Vol. 19, No. 6, June. 1982, "monoclonal Kotai to Ganchiryo", P1022 - 1023	1 - 7
¹⁵ * 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 "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 "G" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹		Date of Mailing of this International Search Report ²
November 29, 1982 (29.11.82)		December 6, 1982 (06.12.82)
International Searching Authority ¹		Signature of Authorized Officer ²⁰
Japanese Patent Office		

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 82/00356

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)		
Int. Cl ⁸ A 61 K 39 / 395 , A 61 K 37 / 02 , A 61 K 35 / 78		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
I P C	A 61 K 39 / 395 , A 61 K 37 / 02 , A 61 K 35 / 78	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
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	請求の範囲の番号
Y	J P , A , 57-48924 (ザ・リージェンフ・オブ・ザ・ ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア) 20. 3月. 1982 (200382)	1 - 7
Y	medicina , 第19巻 , 第6号 , 6月. 1982 , 「monoclonal 抗体と癌治療」 , P 1022-1023	1 - 7
*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」 先行文献ではあるが、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の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、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の文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
29. 11. 82	05.12.82	
国際調査機関	権限のある職員	4 C 6 4 0 8
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 - 松 本 久 紀	