



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 A61K 37/02, 37/24</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 93/08821</p> <p>(43) 国際公開日 1993年5月13日 (13.05.1993)</p>
<p>(21) 国際出願番号 POT/JP92/01433 (22) 国際出願日 1992年11月5日 (05. 11. 92)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平3/321412 1991年11月7日 (07. 11. 91) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 中村敏一 (NAKAMURA, Toshikazu) [JP/JP] 〒813 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号 Fukuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美 (HIROSE, Takayoshi) 〒530 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>		
<p>(54) Title : SIDE EFFECT INHIBITOR FOR CANCER THERAPY</p> <p>(54) 発明の名称 ガン療法用副作用防止剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A side effect inhibitor for cancer therapy containing a hepatocyte growth factor (HGF) as the active ingredient and a method of inhibiting side effects by administering HGF. HGF can alleviate damages to normal cells and tissues and inhibit side effects in treating cancers by chemotherapy, radiotherapy or the like. Hence, it is possible to conduct more intense cancer therapy and to improve the carcinostatic effect.</p>		

(57) 要約

本発明は、肝実質細胞増殖因子 (Hepatocyt Growth Factor, HGF) を有効成分とするガン療法用副作用防止剤及びHGFを投与することからなる副作用防止法に関する。HGFは、化学療法、放射線療法などによるガン治療において、正常細胞・組織が受ける傷害を緩和し、副作用を防止することができる。従って、より強力なガン治療を行うことが可能となり、制ガン効果の向上が図れる。

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ハンフレット第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	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	SN	セネガル
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェッコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
CZ	チェッコ共和国	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	US	米国
DK	デンマーク	ML	マリ	VN	ヴェトナム
FI	フィンランド	MN	モンゴル		
ES	スペイン	MR	モーリタニア		

明 細 書

ガン療法用副作用防止剤

5 技術分野

本発明はガン療法用副作用防止剤に関し、より詳細には肝実質細胞増殖因子(Hepatocyt Growth Factor、以下、HGFという)を有効成分として含有し、ガン治療における副作用を軽減ないし防止することのできる薬剤に関する。

10

技術背景

新規なガン治療法あるいは新規な制ガン剤の開発は医療・医薬研究者の最大の関心事であり、また今日の医療における最大の課題である。

15

ガンの治療法としては、従来から制ガン剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、ホルモン類、生体反応修飾物質等)の投与、放射線の照射及び外科的処置が単独又は組み合わされて実施されている。

20

従来から行われているガン療法は、主としてガン病巣の除去、消滅を目的とするものであるが、生体のトータルな機能の改善の中で治療を考える必要があり、副作用の一層の軽減を図ることの重要性が認識され、かかる見地からのガン療法が検討されている。即ち、従来の化学療法に用いられている制ガン剤は、ガン細胞と正常細胞との質的な差異が少ないため、制ガン効果の強いものほど副作用が強く、副作用のない制ガン剤は効果もないとさえいわれている。現今の制ガン剤の毒性は不可避であるため、化学療法に際しては、この毒性を軽減しつつ、その有効性を最大限に利用することが必要である。また、放射線療法においては、本来、生体に悪影響を及ぼす放射線を利用するものであり、生体の受ける副作用も大きいので、副作用の軽減を図ることは極めて重要である。

25

30

このように、ガンの化学療法及び放射線療法においては、ガン細胞のみならず、正常細胞・組織も傷害を受け、例えば、骨髄抑制、悪心嘔吐、心障害、肺線維症、肝障害、腎障害、脱毛、皮膚症状等の副作用をもた

らす。特に、増殖速度の高い細胞・組織は大きな傷害を受け易い。かかる副作用のため、より強力な治療を行い難い問題があり、ガン治療のネックとなっている。

5 このような問題から、正常細胞・組織に対する毒性を軽減させるための研究がされており、 γ -グロブリン、チトクロームC、アデニン、SH化合物、ビタミンB群等が副作用防止剤として用いられることがあるが、その効果は不十分である。

10 最近、造血組織に対する毒性の緩和にコロニー刺激因子(CSF)が用いられ、制ガン剤療法に伴う白血球減少症を軽減できることが報告されており(Motoyosi, K. et al, Exp. Hematol., 14: 1069-1075, 1986)、中胚葉由来の細胞・組織の受ける傷害の緩和にCSFが有効であることが知られているが、外胚葉・内胚葉由来の細胞・組織に対する副作用を軽減できる物質は知られておらず、かかる物質が求められている。

15 本発明は上記の問題を解決するためになされたもので、ガン治療において、正常細胞・組織の受ける傷害を緩和し、副作用を軽減することができるガン療法用副作用防止剤及び副作用防止法を提供することを目的とする。

発明の開示

20 本発明は、HGFを有効成分とするガン療法用副作用防止剤及びHGFを投与することからなるガン療法の副作用防止法に関する。

本発明者は、年余にわたり肝実質細胞の増殖因子を研究し、その結果HGFを単離精製することに成功した。本発明者は、HGFが増殖因子として肝細胞のみならず広く上皮系細胞に働くことを明らかにし、いくつかの発明を成就した。日本特許出願番号158841/1990においては、HGFが腎の近位尿細管細胞の増殖を促進することより、腎疾患治療剤としての応用開発を、また日本特許出願番号419158/1990においては、HGFがメラノサイト、ケラチノサイトなど正常上皮細胞の増殖を促進することより、上皮細胞促進剤として創傷治療や皮膚潰瘍治療、毛根細胞の増殖剤などへの応用開発を成就し、その詳細を

30

開示した。特に、HGFはEGF等他の多くの増殖因子に見られるガン
化作用やガン細胞増殖活性を有さないことから、より実用に適している。
さらに本発明者らは、日本特許出願番号140812/1991においてHGFのヒト肝ガン由来HepG2細胞株、リンパ芽球ガン由来IM
5 9細胞株などに対するガン細胞増殖抑制活性を利用し、制ガン剤として
も利用可能であることを開示した。本発明者は、HGFの活性を更に研
究した結果、ガン治療において正常細胞・組織が受ける傷害をHGFが
緩和し、副作用を軽減できることを見出して本発明を完成した。

10 図面の簡単な説明

図1は、ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列を示す図である。

図2は、ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列(図1)をコードする遺伝子の塩基配列を示す図である。

図3は、四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出量の時間変化を示す図である。同図中、○は無添加の系(コントロール)、●は四塩化炭素を添加した系、□は四塩化炭素とHGFを添加した系を示す(試験例1参照)。
15

図4は、四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果(添加量-応答曲線)を示す図である(試験例2参照)。

図5は、四塩化炭素に曝された肝細胞からのGOT漏出に対するHGFの抑制効果を示す図である(試験例3参照)。
20

図6は、ラット近位尿細管細胞に対するラットHGFの増殖促進活性の測定結果を示す図である(試験例5参照)。同図中、●はHGFを添加した系、□はEGF+インスリン(陽性対照)を示す。

図7は、ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性(細胞数)を示す図である(試験例6参照)。
25

図8は、ヒト正常表皮メラノサイトに対するHGFの増殖促進活性(複製DNA合成)を示す図である(試験例7参照)。

図9は、ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性(細胞数)を示す図である(試験例8参照)。
30

図10は、ヒト正常表皮ケラチノサイトに対するHGFの増殖促進活性（複製DNA合成）を示す図である（試験例9参照）。

発明を実施するための最良の形態

5 本発明のガン療法用副作用防止剤において、有効成分であるHGFは、本発明者らが再生肝ラット血清中から成熟肝実質細胞をin vitroで増殖させる因子として見出した蛋白質である(Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450, 1984)。本発明者らはさらに、HGFをラット血小板より
10 単離することに成功し(FEBS Letter, 22, 311, 1987)、そのアミノ酸配列を一部決定した。さらに、本発明者らは解明されたHGFアミノ酸配列をもとにヒト及びラット由来のHGF cDNAクローニングを行い、そのcDNAを動物組織に組換えてHGFを蛋白質として得ることに成功した（ヒトHGF：Nature, 342, 440, 1989；ラットHGF：Proc. Natl. Acad. Sci, 87, 3200, 1990）。

15 上記のHGFは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分子量82～85kDである。ラットHGF分子は463アミノ酸残基からなる α 鎖と233アミノ酸残基からなる β 鎖が1個のジスルフィド結合により架橋したヘテロダイマー構造をもち、 α 、 β 両鎖とも2個のグルコサミン型糖鎖結合部位が存在する。ヒトHGFもまたほぼ同じ生理活性を有し、463アミノ酸残基からなる α 鎖と234アミノ酸残基からなる β 鎖とからなる。 α 鎖中には線溶酵素プラスミンと同様のクリングル構造が4個存在し、 β 鎖のアミノ酸配列においてもセリンプロテアーゼ活性を有するプラスミンのB鎖と約37%のホモロジーを有する。ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列及びこれをコードする遺伝子の塩基配列をそれぞれ図1及び図2に示した。ヒトHGFは図1に示される728
20 個のアミノ酸からなる前駆体として生合成され、その後463アミノ酸残基（図1の配列の第32位のGlnから第494位のArgまで）からなる α 鎖と、234アミノ酸残基（図1の配列の第495位のValから第728位のSerまで）からなる β 鎖にわかれる。ラットHGFとヒトHGFのアミノ酸配列のホモロジーは α 鎖において91.6%、 β 鎖において88.9%と非
30

常に高い相同性を持ち、その活性は全く互換性がある。

上記のHGFは種々の方法により得ることができる。例えば、ラット、ウシなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる。また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養物から目的とする組換えHGFを得ることができる(Nature, 342, 440, 1989)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば参考例1に示すようにラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出して粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィーにて精製することができる。あるいは参考例2に示すように遺伝子組換え法を用い、図2に示したヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を、ウシパピローマウイルスNDAなどのベクターに組み込んだ発現ベクターによって動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、マウスC127細胞や、サルCOS細胞などを形質転換し、その培養上清より得ることができる。

こうして得られたHGFは、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び/又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖類が同様に欠失又は置換されていてもよい。かかるHGF同効物としては、例えば、日本特許出願公開番号130091/1991公報、PCT国際公開番号WO90/10651号公報などに記載の物質が挙げられ、これらも本発明に適用でき、本発明の範囲に含まれる。

本発明のガン療法用副作用防止剤の有効成分であるHGFは、ヒトを含むウシ、ウマ、ラット、ヒツジなどいずれの哺乳動物に由来するものであってもよく、またいずれの哺乳動物のガン治療に対しても有効な副作用防止作用を示す。すなわち、本発明の薬剤はヒトの医薬品のみならず動物用医薬品としても用いることができる。

本発明のガン療法用副作用防止剤は、制ガン剤による化学療法や放射線療法と併用してガン治療に利用され、それらの処置に起因する副作用の低減を図ることが可能となる。HGFは肝細胞、腎の近位尿細管細胞の増殖を促進するので、肝障害、腎障害の緩和が図れるが、広く上皮系細胞に対しても増殖促進作用を有するので、悪心・嘔吐、脱毛などの副作用も軽減できる。即ち、悪心・嘔吐は消化管上皮細胞が損傷を受け、近位の末梢神経が刺激されて生ずるものであり、また脱毛は毛根周辺の増殖の激しい組織が損傷を受けるために生ずるものである。HGFは、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトを含め、主として外胚葉・内胚葉由来の細胞・組織に対して選択的に増殖促進作用を及ぼすので、これらの細胞・組織に対する制ガン剤及び放射線の副作用を軽減し、より強力なガン治療法の適用を可能とし、制ガン効果の向上が図れる。

また、HGFで処理された細胞は細胞傷害を受けにくくなるので、化学療法及び放射線療法に際しての前処置剤としても有用であり、HGFで前処置をすることにより、副作用を予防することができる。

HGFの医薬品としての実用性を考える上でさらに重要な点は、HGFがG1期、すなわち増殖期に入った細胞のみを増殖促進し、G0期、すなわち静止期にある細胞には作用しないことである。このことは、傷害のある組織の増殖再生は促進するが、傷害を受けていない組織に対しては全く作用を及ぼさないことを意味する。従って、過剰にHGFを投与しても、あるいは血液などを介して非患部にHGFが到達しても、正常組織にガン化を誘導したり過剰な増殖を起こすことがないと考えられる。

本発明の副作用防止剤は種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤など）をとりうるが、一般的には有効成分であるHGF単独若

- しくは慣用の担体と共に注射剤とされるか、又は慣用の担体と共に外用薬とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、HGFを適切な溶剤（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中のHGF含量としては、通常0.0002~0.2(W/V%)程度、好ましくは0.001~0.1(W/V%)程度に調整される。また、外用薬としては、例えば、軟膏状、ゲル状、液状などの剤形に製剤化され、製剤中のHGF含量は、外用薬の適用疾患、適用部位などに応じて適宜調整することができる。
- 5
- 10 製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の薬剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでいてもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。
- 15
- 本発明の副作用防止剤は該製剤組成物の形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、
- 20 体重などにより適宜調整されるが、通常HGFとして0.01mg~100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

本発明をより詳細に説明するために参考例、試験例及び実施例を挙げるが、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

25 参考例 1

ラット肝臓からのHGFの単離

Wister系ラットに体重の0.2%の量の四塩化炭素を、腹腔内投与し投与後約30時間目で肝臓を摘出した。肝臓はワーリングブレンダーで破碎後、日立20PR-52型冷却遠心機を用いて10,000rpm20分間遠心し、上清を得た。

30 上清を、0.15M NaCl、10mMヘペス、2mM CaCl₂及び0.01%Tween8

0を加えた50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で4°C一昼夜透析した。透析内液を透析液で平衡化したS-セファロース(FF)(ファルマシア社製)カラムに注入し、洗浄後NaClの濃度勾配により溶出を行い、HGFはNaCl濃度0.7M付近に溶出した。次にこのHGFをブルートリスアクリルM(IBF社製)クロマトグラフィーにて精製した。溶出はアルギニンの濃度勾配により行い、HGFはアルギニン濃度0.25M付近で溶出した。得られた分画を次にヘパリン-セファロース(ファルマシア社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaClの濃度勾配により行い、HGFは1M前後のNaCl濃度付近で溶出した。次にフェニル5PW(東ソー社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaCl濃度減少及びエチレングリコール濃度上昇勾配により行った。ラット100匹の肝臓当たり10 μ gのHGFが得られた。精製HGFの比活性は約50万単位/mgであった。得られたHGFは0.25%BSA(牛血清アルブミン)を加え、PBS(リン酸緩衝食塩水)にて透析した。

15 参考例 2

遺伝子組換え法によるHGFの製造

遺伝子組換え法によりヒト細胞由来のHGFを製造した。

Wiglerらの方法(Cell, 11, 223, 1977)に記載された方法に従って、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子により形質転換されたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を培養し、その培養上清より、ヒトHGFを得た。すなわち、ヒト肝臓のmRNAから造られたcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードするクローンHAC19とHBC25を得た。

HAC19からのDNAをBamHIとScaIで、HBC25からのDNAをScaIとPstIで消化し、それぞれ得られた2つのDNAフラグメントをブルースクリプトKSIのBamHIとPstI部位に連結して挿入し、pBS[hHGFII]を得た。pBS[hHGFII]をXbaIとSalIとNaeIで消化し、更にT₄DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、ヒトHGFをコードする約3KbのDNAフラグメントをウシパピローマウイルスNDAをベクターとする発

現ベクター pBPMT の EcoRV 部位に挿入し、pBPMT [hHGF I I] を得た。得られた HGF 発現ベクター pBPMT [hHGF I I] を用いて、DEAE デキストラン法により CHO 細胞を形質転換した。形質転換体の選択は、G418 を含む培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中から、高い HGF 産生能を示す細胞株 BPH89 を選びだした。BPH89 細胞を牛胎児血清を加えた培地で増殖させた後、培地を 2 日おきに交換して、HGF を実施例 1 の精製法に準じた方法により精製した。

参考例 3

10 成熟ラット肝細胞の単離及び初代培養

成熟ラット肝実質細胞は、Seglen の方法 (Meth. Cell Biol. 13: 29-33, 1976) に準じて、コラーゲンを用いた肝臓の灌流により単離した。初代培養の概要は以下のとおりである。ウィリアムズ培地 (5% ウシ血清、 10^{-8} M インスリン及び 10^{-8} M デキサメサゾン含有) に分散させた単離肝細胞を、I 型コラーゲンでコーティングした 12 穴プラスチックディッシュ (コーニング社製) に蒔いた。培養培地は 2 時間後に血清及びホルモンを含有せず、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ のアプロチニンを含有する培地に交換した。

本発明のガン療法用副作用防止剤の有効成分である HGF の肝細胞保護作用を下記試験例 1 ~ 4 に示す。

HGF の肝細胞保護作用は、初代培養肝細胞からの細胞質酵素の漏出により試験した。即ち、四塩化炭素は肝毒性物質であり、生体内で肝炎を引き起こす。この四塩化炭素を実験動物に投与すると、投与量に応じて肝臓からグルタメート オキサロアセテート トランスフェラーゼ (GOT)、グルタメート ピルベート アミノトランスフェラーゼ (GPT)、ラクテート デヒドロゲナーゼ (LDH) などの細胞質酵素を血液中に漏出する。この現象を模して、初代培養肝細胞に肝毒性物質を添加した系で、GOT などの細胞質酵素を漏出させ、この系に HGF を添加し、GOT などの細胞質酵素の漏出を抑制する程度により HGF の肝細胞保護作用を試験した。

なお、以下の試験例1～4において、HGFは参考例2の方法に準じて調製した組換え体ヒトHGFを用いた。また、四塩化炭素溶液は、四塩化炭素をDMFに1Mとなるように溶解し、次いでウイリアムズ培地で希釈し、最終濃度が5mMとなるように調整した溶液を用いた。

5 試験例1

参考例3に示した初代培養肝細胞を 1.2×10^5 細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF(10ng/ml)及び/又は四塩化炭素(5mM)を添加した。所定時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定した。その結果
10 (それぞれ、3穴の試験の平均値)を図3に示す。なお、同図中、○は無添加の系(コントロール)、●は四塩化炭素を添加した系、□は四塩化炭素とHGFを添加した系である。

図3に示されるように、四塩化炭素のみを添加した系においては、培地へのGOTの漏出が認められ、細胞が傷害を受けている。それに対し、
15 HGFを共存させた系においては、GOTの漏出はコントロールと同程度であり、細胞傷害が抑制されていることが明らかとなった。

なお、上記の上清中のLDH活性及びGPT活性についても測定したが、これらの酵素の肝細胞からの漏出もHGFの存在により抑制されていることが確認された。

20 試験例2

参考例3に示した初代培養肝細胞を 1.2×10^5 細胞/cm²の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、最終濃度で3mMの四塩化炭素を加え、更に種々の濃度のHGFを添加した。24時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中のGOT活性を常法により測定
25 した。その結果(それぞれ、3穴の試験の平均値)を図4に示す。なお、四塩化炭素を添加していない系(コントロール)における24時間後のGOT活性は6.0mU/mlであった。

図4に示されるように、肝細胞からのGOTの漏出は、HGFにより
30 0～8ng/mlの範囲で用量依存的に抑制され、HGFが肝細胞保護作用を有することが明らかとなった。

試験例 3

参考例 3 に示した初代培養肝細胞を 1.2×10^5 細胞/cm² の密度で蒔き、所定時間、HGF (10ng/ml) 又は四塩化炭素 (5mM) に曝した。翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF (10ng/ml) 及び/又は四塩化炭素 (5mM) を添加した。24 時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中の GOT 活性を常法により測定した。その結果 (それぞれ、3 穴の試験の平均値) を図 5 に示す。同図中、0 h は培地交換時を示し、また白抜きバーは細胞を四塩化炭素に曝した時間を、淡点付きバーは細胞を HGF に曝した時間を示す。

図 5 に示されるように、四塩化炭素に曝す前に細胞を HGF で処理した場合にも GOT の漏出は抑制され、また四塩化炭素に曝された細胞に HGF を添加した場合であっても GOT の漏出は抑制された。

試験例 4

参考例 3 に示した初代培養肝細胞を 1.2×10^5 細胞/cm² の密度で蒔き、翌日に血清を含まない培地に交換し、HGF (10ng/ml) 並びに四塩化炭素 (5mM) 又はマイトマイシン C ($8 \mu\text{M}$) を添加した。24 時間培養後に、培地を集めて遠心分離し、上清を回収した。上清中の GOT 活性を常法により測定した。その結果 (それぞれ、3 穴の試験の平均値) を表 1 に示す。

表 1 に示されるように、HGF は、肝毒性物質である四塩化炭素及びマイトマイシン C による GOT の漏出を抑制していることが明らかとなった。

表 1

肝 毒 性 物 質	GOT 活性 (mU/ml)	
	無添加	10ng/ml HGF
対照 (0.5% DMSO)	6.0 ± 0.4	4.8 ± 0.2
四塩化炭素 (5mM)	12.7 ± 1.2	4.9 ± 0.2
マイトマイシン C ($8 \mu\text{M}$)	13.5 ± 1.3	5.2 ± 0.3

試験例 5

HGFの近位尿細管細胞に対する増殖効果

HGFの近位尿細管細胞に対する増殖効果を下記の方法で確認した。

①ラット腎近位尿細管細胞の単離

5 バルビタール系麻酔剤によりWister系ラットを麻酔し、腹部を切開して腎臓を摘出し、氷で冷却したプレートに取り出した。皮質部分を集め、小片に刻んでダウンスホモジナイザーにかけた。得られたホモジェネートを245 μ m孔ナイロンメッシュで濾過し、さらに尿細管細胞と顆粒細胞を分離するために105 μ m孔ナイロンメッシュで濾過した後、メッシュ上に残った画分を氷で冷却したイーグルの最少栄養培地に移した。この画
10 分に少量の顆粒細胞が残存していたので、0.01%コラゲナーゼを培地に添加し37°Cで3分間処理し、フィブロブラストを除去した後、80g×2分間の遠心分離を行い、精製近位尿細管細胞を得た。

②HGFの近位尿細管細胞に対する増殖活性

15 上記で単離した腎近位尿細管細胞の培養系にHGFを添加し、細胞増殖効果をDNA合成の増加により調べた。すなわち、上記により得られた近位尿細管細胞を、 1×10^{-8} Mインスリン(シグマ社、米国)、 1×10^{-8} Mデキサメサゾン(和光純薬社、日本)、5 μ g/mlトランスフェリン(シグマ社、米国)、5U/mlアプロチニン(持田製薬社、日本)を添加したDME・F-12混合培地(DME培地:F-12培地=1:1、日水製薬社、日本)に懸濁し、24穴のマルチプレートに 4×10^4 個/ウェルの濃度で蒔いた。5%CO₂、30%O₂、65%N₂の存在下、37°Cで2
20 4時間培養後、5U/mlアプロチニンを添加したDME・F-12混合培地に交換し、同培養条件下で48時間培養した。培地を新しく調製した5U/mlアプロチニン添加DME・F-12混合培地に交換すると共に
25 被検試料として参考例1で得られたラットHGF(0.25%BSAを加え、PBSで透析したもの)、及び陽性対照として10ng/mlEGF(上皮細胞成長因子、雄マウス顎下腺由来)+ 1×10^{-7} Mインスリンを所定量添加した。16時間培養後、1 μ Ci/mlの[¹²⁵I]デオキシウリジン(ニューイングランドニュークリア社、米国)10 μ l/ウェルを添加した。4時
30 間後、PBSで細胞を洗浄し、10%トリクロロ酢酸溶液に移し、5分間イ

ンキュベートした。トリクロロ酢酸を除去し、1 M水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、放射能をガンマカウンターにて測定した。

その結果を図6に示す。図6から明らかなように、ラットHGFはラット腎臓の近位尿細管細胞を用量依存的に増殖させる活性を示した。すなわち、2ng/mlのHGFを添加することにより、該培養細胞のDNA合成は約2倍に、10ng/mlのHGFにより約3倍に促進された。これにより本発明の有効成分であるHGFは培養腎細胞を増殖させる活性を有することが明らかになると共に、生体内における腎再生を促進させる活性を有することが明らかとなった。

10 試験例6

ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対する効果

本発明の副作用防止剤の有効成分であるHGFの、メラノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。

MCDB153（高アミノ酸タイプ）培地にインスリン5 μ g/ml、ヒドロコチゾン0.5 μ g/ml、フォルボール 12-ミリステート 13-アセテート（PMA）10ng/mlを加えた無血清基礎培地を用いてヒト正常表皮メラノサイト（クラボウ社、日本）を懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。培養開始9日後に再びHGFを加えた試験培地を用いて培地交換をした後、15日後培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。

その結果を図7に示す。図7に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から10ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約5倍にまで高められることが確認された。

試験例7

ヒト正常表皮メラノサイトの複製DNA合成に対する効果

試験例6に記載された無血清基礎培地にヒト正常表皮メラノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個/ウェルになるように蒔き、10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。24時間培養後、0.5μCiの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBSにて洗淨し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマーカウンターにより測定した。また、放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System(ピアース社)により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mg当りに換算してDNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。

その結果を図8に示す。図8に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から10ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成が促進され、最適濃度において約4倍にまで高められることが確認された。

試験例8

ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

本発明の副作用防止剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。

試験例6に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37°Cで培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。培養開始6日後、培地をHGFを加えた新しい培地に交換して培

養を続け、4日後（培養開始から10日後）培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。

その結果を図9に示す。図9に示されるように、正常ケラチノサイトはHGFにより0から2.5ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約3倍にまで高められることが確認された。

試験例9

ヒト正常表皮ケラチノサイトの複製DNA合成に対する効果

試験例6記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μ g蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに4 \times 10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37 $^{\circ}$ Cで培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間培養後0.5 μ Ciの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBSにて2回洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System(ピアース社)により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mg当りに換算してDNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。

その結果を図10に示す。図10に示されるように、正常メラノサイトはHGFにより0から5ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約2倍にまで高められることが確認された。

実施例1

生理食塩水100ml中にHGF100mg、マンニトール1g及びポリソルベート8010mgを含む溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に1mlずつ無菌

的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

実施例 2

5 0.15M NaCl と 0.01% ポリソルベート 80 を含む pH7.4 の 0.02M リン酸緩衝液 100ml に HGF 100mg と ヒト血清アルブミン 100mg を添加した水溶液を無菌的に調製し、バイアル瓶に 1ml ずつ無菌的に分注し、常法に準じて凍結乾燥し、凍結乾燥製剤を得た。

産業上の利用可能性

10 本発明のガン療法用副作用防止剤は HGF を有効成分として含有し、HGF は化学療法、放射線療法等における正常細胞・組織が受ける傷害を緩和することができるので、副作用を軽減できる。従って、本発明によれば、より強力なガン治療を行うことが可能となり、制ガン効果の向上が図れるので、临床上極めて有用である。

15 また、HGF は正常上皮系細胞のみ増殖促進し、肝非実質細胞や線維芽細胞など正常間葉系細胞の増殖になんら影響せず、また細胞をガン化させる活性を持たないため、特異性の高い、また副作用の少ない薬剤とすることができる。

20

25

30

請 求 の 範 囲

- 5 1. 有効量の肝実質細胞増殖因子、及び必要に応じて薬理的に許容される担体を含有するガン療法用副作用防止剤。
2. 肝実質細胞増殖因子が、ヒト又は動物の組織又は血液成分由来である請求の範囲第1項記載のガン療法用副作用防止剤。
3. 肝実質細胞増殖因子が遺伝子組換えにより製造したものである請求の範囲第1項記載のガン療法用副作用防止剤。
- 10 4. 遺伝子組換えの宿主細胞が大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞の何れかである請求の範囲第3項記載のガン療法用副作用防止剤。
5. 副作用防止に有効量の肝実質細胞増殖因子を投与することからなるヒト又は哺乳動物のガン療法の副作用防止方法。
- 15 6. 肝実質細胞増殖因子が、ヒト又は動物の組織又は血液成分由来である請求の範囲第5項記載のガン療法の副作用防止法。
7. 肝実質細胞増殖因子が遺伝子組換えにより製造したものである請求の範囲第5項記載のガン療法の副作用防止法。

20

25

30

	245	250	255
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe			
	260	265	270
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp			
	275	280	285
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile			
	290	295	300
Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu			
	305	310	315
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly			
	320	325	330
Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp			
	335	340	345
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys			
	350	355	360
Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser			
	365	370	375
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly			
	380	385	390
Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp			
	395	400	405
Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln			
	410	415	420
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu			
	425	430	435
Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu			
	440	445	450
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro			
	455	460	465
Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro			
	470	475	480
Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu			
	485	490	495
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val			

(つづきあり)

Val Asn Gly Ile	500	Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser	505	510
Leu Arg Tyr Arg	515	Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys	520	525
Glu Ser Trp Val	530	Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp	535	540
Leu Lys Asp Tyr	545	Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly	550	555
Arg Gly Asp Glu	560	Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu	565	570
Val Tyr Gly Pro	575	Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala	580	585
Arg Pro Ala Val	590	Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro	595	600
Asn Tyr Gly Cys	605	Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr	610	615
Gly Trp Gly Tyr	620	Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg	625	630
Val Ala His Leu	635	Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His	640	645
His Arg Gly Lys	650	Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly	655	660
Ala Glu Lys Ile	665	Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly	670	675
Pro Leu Val Cys	680	Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val	685	690
Ile Val Pro Gly	695	Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile	700	705
Phe Val Arg Val	710	Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile	715	720
Leu Thr Tyr Lys	725	Val Pro Gln Ser	728	

F i g . 2

ATGTGGGTGA CCAAACCTCT GCCAGCCCTG CTGCTGCAGC ATGTCCTCCT GCATCTCCTC 60
CTGCTCCCCA TCGCCATCCC CTATGCAGAG GGACAAAGGA AAAGAAGAAA TACAATTCAT 120
GAATTCAAAA AATCAGCAAA GACTACCCTA ATCAAAATAG ATCCAGCACT GAAGATAAAA 180
ACCAAAAAAG TGAATACTGC AGACCAATGT GCTAATAGAT GTAGTAGGAA TAAAGGACTT 240
CCATTCACTT GCAAGGCTTT TGTTTTGTAT AAAGCAAGAA AACAATGCCT CTGGTTCCCC 300
TTCAATAGCA TGTCAAGTGG AGTGAAAAAA GAATTTGGCC ATGAATTTGA CCTCTATGAA 360
AACAAAGACT ACATTAGAAA CTGCATCATT GGTAAAGGAC GCAGCTACAA GGGAACAGTA 420
TCTATCACTA AGAGTGGCAT CAAATGTCAG CCCTGGAGTT CCATGATACC ACACGAACAC 480
AGCTTTTTGC CTTCGAGCTA TCGGGGTAAA GACCTACAGG AAAACTACTG TCGAAATCCT 540
CGAGGGGAAG AAGGGGGACC CTGGTGTTTC ACAAGCAATC CAGAGGTACG CTACGAAGTC 600
TGTGACATTC CTCAGTGTTT AGAAGTTGAA TGCATGACCT GCAATGGGGA GAGTTATCGA 660
GGTCTCATGG ATCATACAGA ATCAGGCAAG ATTTGTCAGC GCTGGGATCA TCAGACACCA 720
CACCGGCACA AATTCTTGCC TGAAAGATAT CCCGACAAGG GCTTTGATGA TAATTATTGC 780
CGCAATCCCG ATGGCCAGCC GAGGCCATGG TGCTATACTC TTGACCCTCA CACCCGCTGG 840
GAGTACTGTG CAATTA AAAAC ATGCGCTGAC AATACTATGA ATGACACTGA TGTTCCTTTG 900
GAAACA ACTG AATGCATCCA AGGTCAAGGA GAAGGCTACA GGGGCACTGT CAATACCATT 960
TGGAATGGAA TTCCATGTCA GCGTTGGGAT TCTCAGTATC CTCACGAGCA TGACATGACT 1020
CCTGAAAATT TCAAGTGCAA GGACCTACGA GAAAATTACT GCCGAAATCC AGATGGGTCT 1080
GAATCACCCCT GGTGTTTTAC CACTGATCCA AACATCCGAG TTGGCTACTG CTCCCAAATT 1140
CCAAACTGTG ATATGTCACA TGGACAAGAT TGTTATCGTG GGAATGGCAA AAATTATATG 1200
GGCAACTTAT CCCAAACAAG ATCTGGACTA ACATGTTCAA TGTGGGACAA GAACATGGAA 1260
GACTTACATC GTCATATCTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGC 1320
CGAAATCCAG ATGATGATGC TCATGGACCC TGGTGCTACA CGGGAAATCC ACTCATTCCT 1380
TGGGATTATT GCCCTATTTT TCGTTGTGAA GGTGATACCA CACCTACAAT AGTCAATTTA 1440
GACCATCCCG TAATATCTTG TGCCAAAACG AAACAATTGC GAGTTGTAAA TGGGATTCCA 1500
ACACGAACAA ACATAGGATG GATGGTTAGT TTGAGATACA GAAATAAACA TATCTGCGGA 1560

(つづきあり)

GGATCATTGA TAAAGGAGAG TTGGGTTCTT ACTGCACGAC AGTGTTTCCC TTCTCGAGAC 1620
TTGAAAGATT ATGAAGCTTG GCTTGGAATT CATGATGTCC ACGGAAGAGG AGATGAGAAA 1680
TGCAAAACAGG TTCTCAATGT TTCCAGCTG GTATATGGCC CTGAAGGATC AGATCTGGTT 1740
TTAATGAAGC TTGCCAGGCC TGCTGTCCTG GATGATTTTG TTAGTACGAT TGATTTACCT 1800
AATTATGGAT GCACAATTCC TGAAAAGACC AGTTGCAGTG TTTATGGCTG GGGCTACACT 1860
GGATTGATCA ACTATGATGG CCTATTACGA GTGGCACATC TCTATATAAT GGGAAATGAG 1920
AAATGCAGCC AGCATCATCG AGGGAAGGTG ACTCTGAATG AGTCTGAAAT ATGTGCTGGG 1980
GCTGAAAAGA TTGGATCAGG ACCATGTGAG GGGGATTATG GTGGCCCACT TGTTTGTGAG 2040
CAACATAAAA TGAGAATGGT TCTTGGTGTG ATTGTTCTG GTCGTGGATG TGCCATTCCA 2100
AATCGTCCTG GTATTTTGT CCGAGTAGCA TATTATGCAA AATGGATACA CAAAATTATT 2160
TTAACATATA AGGTACCACA GTCA 2184

Fig. 3

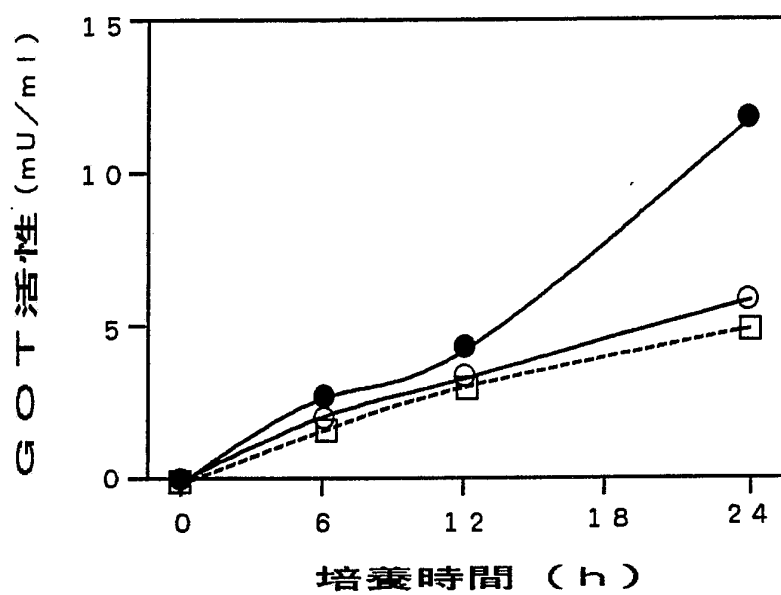
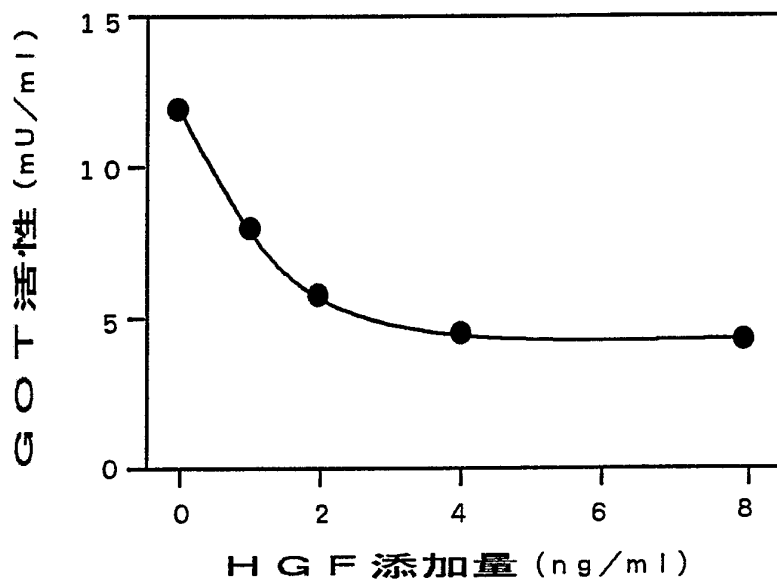


Fig. 4



F i g . 5

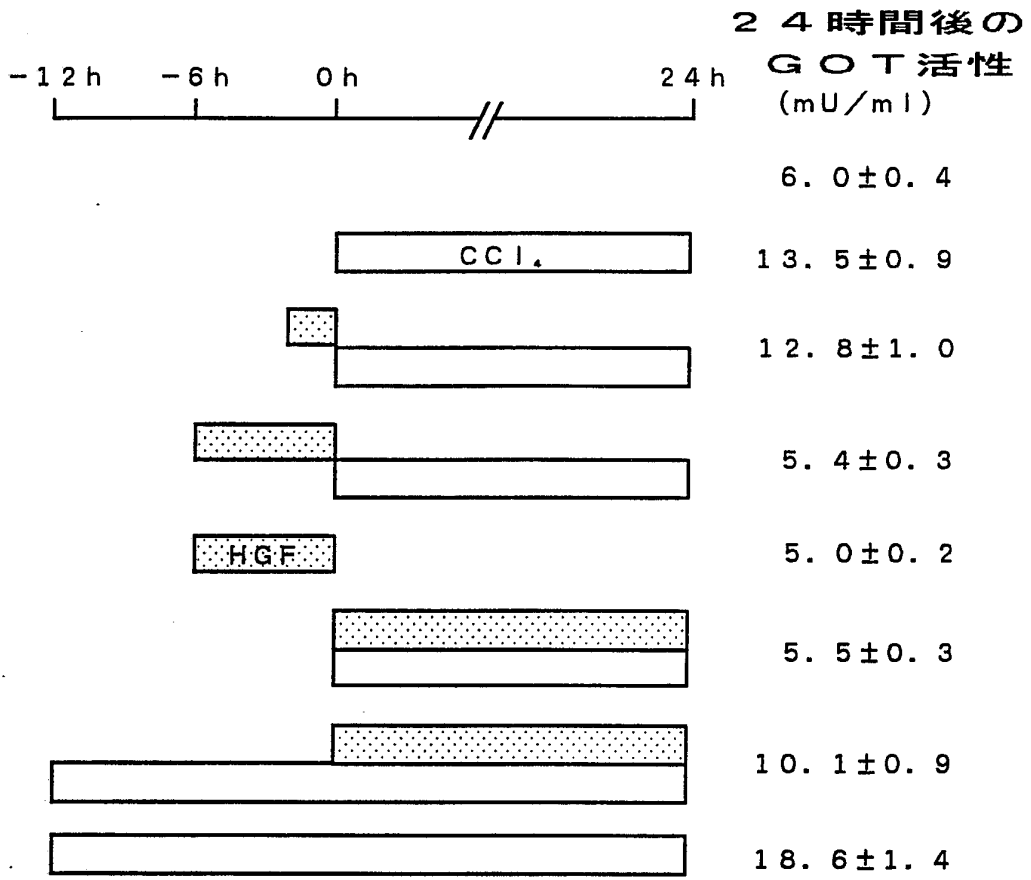


Fig. 6

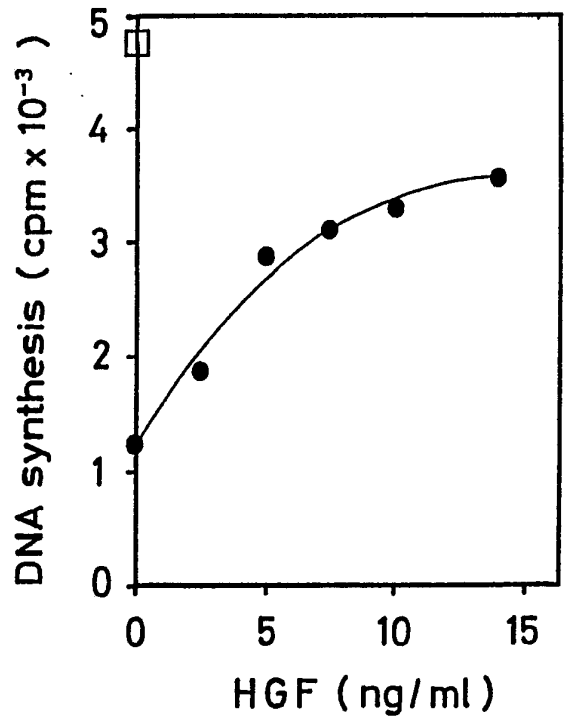


Fig. 7

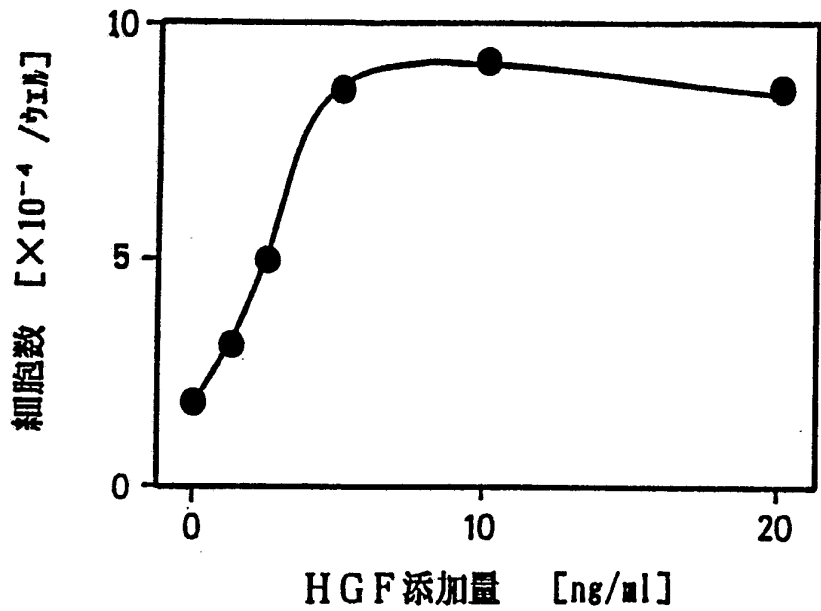


Fig. 8

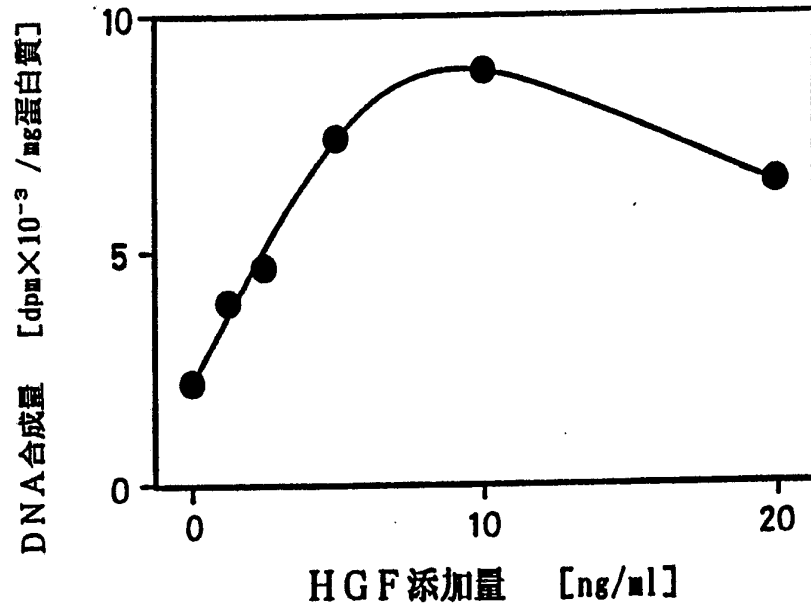
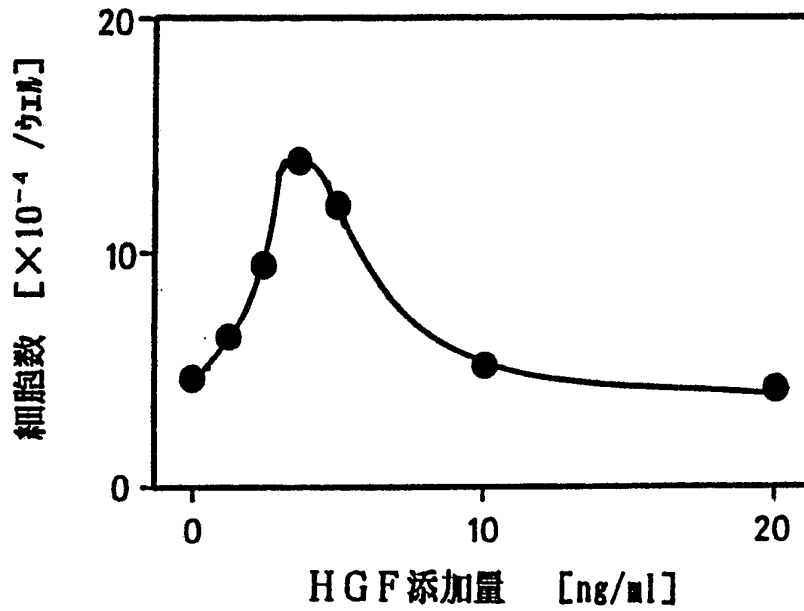
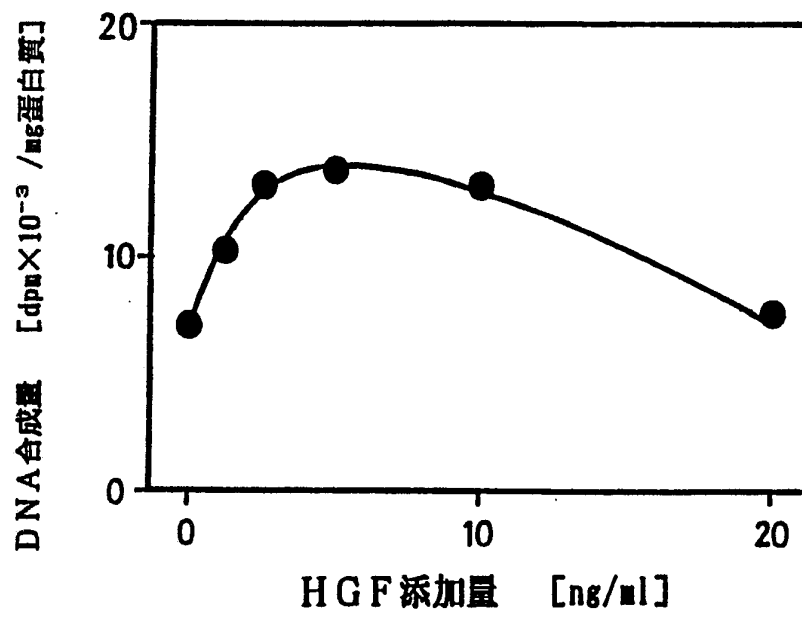


Fig. 9



F i g . 1 0



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP92/01433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁵ A61K37/02, 37/24 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) Int. Cl ⁵ A61K37/02, 37/24 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 practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 3-204899 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), September 6, 1991 (06. 09. 91), (Family: none)	1-4
A	JP, A, 3-130091 (Toyobo Co., Ltd. and another), June 3, 1991 (03. 06. 91), (Family: none)	1-4
A	JP, A, 3-72883 (Mitsubishi Kasei Corp.), March 28, 1991 (28. 03. 91), & EP, A, 412557 & CA, A, 2022752	1-4
A	JP, A, 2-134323 (Kogyo Gijutsuin-cho and another), May 23, 1990 (23. 05. 90), (Family: none)	1-4
A	JP, A, 1-143900 (Terumo Corp.), June 6, 1989 (06. 06. 89),	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search January 22, 1993 (22. 01. 93)		Date of mailing of the international search report February 9, 1993 (09. 02. 93)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP92/01433

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(Family: none) JP, A, 63-22526 (Shuji Hashimoto and three others), January 30, 1988 (30. 01. 88), & US, A, 5004805 & CA, A, 1300010	1-4
A	JP, A, 60-45534 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), March 12, 1985 (12. 03. 85), (Family: none)	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP92/01433

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 5-7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 5 to 7 relate to methods for treatment of the human or animal body by therapy and so relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ A61K37/02, 37/24		
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))		
Int. Cl. ⁸ A61K37/02, 37/24		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
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 請求の範囲の番号
A	JP, A, 3-204899 (大塚製薬株式会社) 6. 9月. 1991 (06. 09. 91) (ファミリーなし)	1-4
A	JP, A, 3-130091 (東洋紡績株式会社 外1名) 3. 6月. 1991 (03. 06. 91) (ファミリーなし)	1-4
A	JP, A, 3-72883 (三菱化成株式会社) 28. 3月. 1991 (28. 03. 91) &EP, A, 412557 & CA, A, 2022752	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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」 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文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
22. 01. 93	09.02.93	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 松浦新司 ㊟	4 C 8 3 1 4
	電話番号 03-3581-1101 内線	3452

C (続き). 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 請求の範囲の番号
A	JP, A, 2-134323 (工業技術院長 外1名) 23. 5月. 1990 (23. 05. 90) (ファミリーなし)	1-4
A	JP, A, 1-143900 (テルモ株式会社) 6. 6月. 1989 (06. 06. 89) (ファミリーなし)	1-4
A	JP, A, 63-22526 (橋本修治 外3名) 30. 1月. 1988 (30. 01. 88) &US, A, 5004805 & CA, A, 1300010	1-4
A	JP, A, 60-45534 (大塚製薬株式会社) 12. 3月. 1985 (12. 03. 85) (ファミリーなし)	1-4

