

(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
2010年5月20日(20.05.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/055950 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/069509
- (22) 国際出願日: 2009年11月17日(17.11.2009)
- (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 2008-293930 2008年11月17日(17.11.2008) JP
特願 2009-125871 2009年5月25日(25.05.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1030001 東京都中央区日本橋小伝馬町1-3-4 Tokyo (JP). 独立行政法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 松村 保広 (MATSUMURA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒2778577 千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がんセンター東病院内 Chiba (JP). 安永 正浩(YASUNAGA, Masahiro) [JP/JP]; 〒2778577 千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がんセンター東病院内 Chiba (JP). 眞鍋 史乃(MANABE, Shino) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2010/055950 A1

(54) Title: NOVEL CANCER TARGETING THERAPY USING COMPLEX OF SUBSTANCE CAPABLE OF BINDING SPECIFICALLY TO CONSTITUENT FACTOR OF CANCER STROMA AND ANTI-TUMOR COMPOUND

(54) 発明の名称: 癌間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と抗腫瘍性化合物との複合体による新規の癌ターゲティング治療

(57) Abstract: Disclosed is a pharmaceutical agent for treating a tumor, which can be accumulated specifically in a stroma for a long period to exhibit its effect. Specifically disclosed is a complex comprising a substance capable of binding specifically to a constituent factor of a stroma and an anti-tumor compound bound to the substance via a linker.

(57) 要約: 本発明は、間質に特異的に長時間留まり、効果を発揮する腫瘍治療用の医薬を提供することを課題とし、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質、及びリンカーを介して該物質へ結合した抗腫瘍性化合物からなる複合体を提供する。

明 細 書

発明の名称：

癌間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と抗腫瘍性化合物との複合体による新規の癌ターゲティング治療

技術分野

[0001] 本発明は、抗腫瘍性化合物の腫瘍部位への送達のための、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質の使用に関する。具体的には、本発明は、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と抗腫瘍性部位（例、抗腫瘍性化合物、抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造）との複合体、及びその用途に関する。

背景技術

[0002] モノクローナル抗体の作製法が確立された1970年代後半からモノクローナル抗体に毒素や抗腫瘍性化合物などを付加して腫瘍部を選択的に攻撃するという「ミサイル療法」の研究が盛んになったが（特許文献1～4）、その後一部のリンパ腫や白血病での認可を除き（非特許文献1、2）、肺癌、大腸癌、乳癌、胃癌など通常の固形癌でのミサイル療法の臨床的な有用性は証明されず今日まで至っている（非特許文献3～11）。腫瘍特異的抗原に対するモノクローナル抗体を使用したいわゆるミサイル療法の問題点として、

（1）モノクローナル抗体の適用は、特異的抗原が腫瘍細胞の膜表面に発現している腫瘍に限られること、

（2）モノクローナル抗体が、血中に遊離している抗原で中和されて肝心の腫瘍局所までデリバリーできない可能性があること、

（3）モノクローナル抗体を腫瘍局所へデリバリーできたとしても、腫瘍血管から漏出後、腫瘍血管から腫瘍細胞に到達するまでに間質が障壁となって肝心の腫瘍細胞のところまでにモノクローナル抗体が到達できない可能性があること、等が挙げられる。

- [0003] 腫瘍の中でも特に、膀胱癌、スキルス胃癌、大腸癌、肺癌などの難治性癌は間質が豊富であることが知られている。間質に多く見られるコラーゲンは正常の生体にも存在するが、炎症を起こしている組織やそれに似通った組織系を有する腫瘍組織で発達している（非特許文献12）。IV型コラーゲンは腫瘍血管の周囲に豊富であり、I型やIII型コラーゲンは腫瘍細胞と腫瘍血管の間に増生している。その程度は腫瘍の種類により大きく異なるが、一般に薬剤が効きにくい難治性癌はコラーゲンに代表される間質が特に豊富である。特にマウスの腫瘍組織よりもヒトの腫瘍組織は間質が多いことが知られている。
- [0004] また、松村は、腫瘍の脈管学的特性として、腫瘍血管透過性の亢進が起きており、正常血管からは漏れにくい高分子物質も腫瘍の血管からは容易に漏出すること、また、血管新生に対してリンパ管新生に乏しいため、一旦腫瘍組織で血管から漏出した高分子物質はリンパ管にドレナージできずに長く腫瘍組織に留まるというEPR効果（enhanced permeation and retention effect）を見出している（非特許文献13）。
- [0005] 抗腫瘍性化合物SN-38はCPT-11というプロドラッグとして既に臨床応用されているが、低分子であるゆえに、正常組織と腫瘍組織とを区別して分布させることができない上、腫瘍に長く留まらせることもできない。従って、活性本体であるSN-38の時間依存性抗腫瘍効果を有するという特徴が生かされず、副作用が強く出るといった問題が臨床上指摘されている（非特許文献14～17）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2007-39346号公報
特許文献2：特表2008-501029号公報
特許文献3：特表2007-512324号公報
特許文献4：特表2008-524202号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1 : Bross PF et al. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1490-1496
- 非特許文献2 : Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2006; 2: 750-763
- 非特許文献3 : Omelyanenko V et al. HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. 1. influence of the method of synthesis on the binding affinity to OVCAR-3 ovarian carcinoma cells in vitro. *J Drug Targeting* 1996; 3: 357-73
- 非特許文献4 : Gilliland DG et al. Antibody-directed cytotoxic agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Aug;77(8):4539-43
- 非特許文献5 : Blythman HE et al. Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. *Nature.* 1981 Mar 12;290(5802):145-6
- 非特許文献6 : Tsukada Y et al. Chemotherapy by intravenous administration of conjugates of daunomycin with monoclonal and conventional anti-rat alpha-fetoprotein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Dec;79(24):7896-9
- 非特許文献7 : Hurwitz E et al. A conjugate of adriamycin and monoclonal antibodies to Thy-1 antigen inhibits human neuroblastoma cells in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;417:125-36
- 非特許文献8 : Gallego J et al. Preparation of four daunomycin-monoclonal antibody 791T/36 conjugates with anti-tumour activity. *Int J Cancer.* 1984 Jun 15;33(6):737-44
- 非特許文献9 : Spearman ME et al. Disposition of the monoclonal antibody-vinca alkaloid conjugate KS1/4-DAVLB (LY256787) and free 4-desacetylvinblastine in tumor-bearing nude mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 M

ay;241(2):695-703

非特許文献10: Braslawsky GR et al. Adriamycin(hydrazone)-antibody conjugates require internalization and intracellular acid hydrolysis for antitumor activity. *Cancer Immunol Immunother.* 1991;33(6):367-74

非特許文献11: Doronina SO et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 2003 Jul;21(7):778-84. Epub 2003 Jun 1

非特許文献12: Dvorak HF. Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New Engl J Med* 1986 Dec 25; 315(26): 1650-9

非特許文献13: Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res.* 1986 Dec;46(12 Pt 1):6387-92

非特許文献14: Koizumi F et al. Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res* 2006 Oct 15; 66(20): 10048-56

非特許文献15: Sumitomo M et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppress renal cancer progression. *Cancer Res.* 2008; 122: 2148-2153

非特許文献16: Saito Y et al. Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are key strategic point for a hypovascular tumor. *Cancer Sci.* 2008; 90: 1258-1264

非特許文献17: Matsumura Y. Poly (amino acid) micellar nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv. Drug Del. Rev.* 2008; 60: 899-9

14

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、間質に特異的に長時間留まり、腫瘍血管及び／又は腫瘍細胞に作用し抗腫瘍効果を発揮する複合体を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、コラーゲンに代表される間質は、腫瘍周囲において豊富に存在し、抗腫瘍性化合物の腫瘍細胞へのアクセスを阻害する可能性が指摘されていたが、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と抗腫瘍性部位（例、抗腫瘍性化合物、抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造）との複合体を用いると、腫瘍細胞表面上の抗原に対する抗体と抗腫瘍性化合物との複合体よりも、腫瘍血管及び／又は腫瘍細胞に作用することにより、むしろ優れた抗腫瘍作用を示すことを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下を提供するものである。

[1] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質及び該物質へ結合した抗腫瘍性部位を含む複合体。

[2] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と抗腫瘍性部位とがリンカーを介して結合している、[1]記載の複合体。

[3] 抗腫瘍性部位が抗腫瘍性化合物である、[1]記載の複合体。

[4] 抗腫瘍性部位が抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造である、[1]記載の複合体。

[5] 抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造が、抗腫瘍性化合物を含有するリポソーム又はミセルである、[4]記載の複合体。

[6] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質が、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する抗体又はその結合性断片である、[1]記載の複合体。

[7] 間質の構成因子がコラーゲンである、[1]記載の複合体。

[8] コラーゲンがI V型コラーゲンである、[7]記載の複合体。

[9] 間質の構成因子がフィブリンである、[1]記載の複合体。

[10] リンカーと抗腫瘍性部位とが、エステル結合又はカルバメート結合

を介して結合している、〔2〕記載の複合体。

〔11〕リンカーと抗腫瘍性部位とが、カーボネート結合又はチオカルバメート結合を介して結合している、〔2〕記載の複合体。

〔12〕〔1〕記載の複合体を含む、腫瘍の治療剤。

〔13〕〔1〕記載の複合体を含む、腫瘍血管形成阻害剤。

〔14〕哺乳動物に対して有効量の〔1〕記載の複合体を投与することを含む、該哺乳動物における腫瘍の治療方法。

〔15〕哺乳動物に対して有効量の〔1〕記載の複合体を投与することを含む、該哺乳動物における腫瘍血管の形成を阻害する方法。

〔16〕腫瘍の治療において使用するための、〔1〕記載の複合体。

〔17〕腫瘍血管の形成阻害において使用するための、〔1〕記載の複合体。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、間質に特異的且つ長時間留まり、優れた抗腫瘍効果を発揮する複合体が提供される。特に、本発明の複合体を用いれば、時間依存性の抗腫瘍効果を有する抗腫瘍性化合物の抗腫瘍効果を有効に発揮させることが可能となる。また、腫瘍血管及び／又は腫瘍細胞に作用するので、従来の複合体よりも著しく高い抗腫瘍効果を望める。

図面の簡単な説明

[0012] [図1] 図1は、典型的なヒト膀胱癌組織を示す図である。

[図2] 図2は、フローサイトメトリーにより腫瘍細胞表面上のE p C A M発現を解析した結果である。

[図3] 図3は、抗体の生体イメージングを示す図である。

[図4] 図4は、S N - 3 8 - ポリマー化合物と抗体との結合を示す模式図である。

[図5] 図5は、各複合体の *i n v i t r o* 殺細胞効果を示す図である。

[図6] 図6は、各複合体の *i n v i v o* 抗腫瘍効果を示す図である。

[図7] 図7は、抗マウス I V 型コラーゲン抗体 - S N - 3 8 複合体投与及び未

投与の腫瘍の病理組織学的特徴を示す図である。

[図8] 図8は、ハイブリドーマクローン35-4のVH部位のcDNA配列と、rIgG2aクローンBC088240.1の対応するcDNA配列とのアライメントを示す図である。

[図9] 図9は、ハイブリドーマクローン35-4のVH部位の推定アミノ酸配列と、rIgG2aクローンBC088240.1の対応するアミノ酸配列とのアライメントを示す図である。

[図10] 図10は、ハイブリドーマクローン6-1、6-2及び56P-1のVH部位のcDNA配列と、IgM可変領域クローンJ00529.1及びIgM定常領域クローンV00827.1の対応するcDNA配列とのアライメントを示す図である。

[図11] 図11は、ハイブリドーマクローン6-1、6-2及び56P-1のVH部位のアミノ酸配列と、IgM可変領域クローンJ00529.1及びIgM定常領域クローンV00827.1の対応するアミノ酸配列とのアライメントを示す図である。

[図12] 図12は、ハイブリドーマクローン35-4、6-1、6-2及び56P-1の κ 鎖のVL部位のcDNA配列と、 κ 鎖クローンBC088255.1の対応するcDNA配列とのアライメントを示す図である。

[図13] 図13は、ハイブリドーマクローン35-4、6-1、6-2及び56P-1の κ 鎖のVL部位のアミノ酸配列と、 κ 鎖クローンBC088255.1の対応するアミノ酸配列とのアライメントを示す図である。

[図14] 図14は、抗フィブリン抗体-SN-38複合体の*in vivo*抗腫瘍効果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質及び該物質へ結合した抗腫瘍性部位を含む複合体に関する。

[0014] 本発明の複合体は、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質を構成因子として含むことにより、間質の構成因子に対して特異的結合能を有

する。また、本発明の複合体は、間質の構成因子に対して結合した状態で、抗腫瘍性化合物を徐放し得る。

[0015] 本明細書において、「間質」とは、組織における細胞と細胞との間隙を埋める結合組織を意味する。本発明においては、間質は、特に腫瘍組織の間質を意味する。

[0016] 間質の構成因子としては、公知の細胞外マトリクス構成成分を挙げることが出来る。該成分としては、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等を挙げることができ、腫瘍組織中の間質を構成する成分であれば、特に限定されないが、特にコラーゲンは腫瘍組織において発達しているため好ましい。コラーゲンには数十種類の型が存在することが知られており、どの型のコラーゲンが間質中に優性に発現するかは腫瘍の種類により異なるが、一般にⅠⅤ型コラーゲンは腫瘍血管の周囲に豊富であり、Ⅰ型及びⅠⅠⅠ型コラーゲンは腫瘍細胞と腫瘍血管の間に増生するため、コラーゲンは、好ましくはⅠ型、ⅠⅠⅠ型又はⅠⅤ型であり、より好ましくはⅠⅤ型である。

[0017] 新たな局面において、間質の構成因子として、癌随伴物質をもまた好ましく用いることができる。癌随伴物質とは、腫瘍組織の中で、腫瘍細胞の増殖に伴い腫瘍血管や間質において形成される物質をいう。癌随伴物質としては、例えばフィブリンが挙げられる。

[0018] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質としては、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する抗体又はその結合性断片、間質の構成因子に対する可溶性の受容体又はその結合性断片、間質の構成因子に親和的なペプチド、上記の抗体、可溶性受容体、結合性断片、ペプチドを結合した高分子担体等を挙げることができる。該物質は、好ましくは、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する抗体、又はその結合性断片及びペプチドである。ここで、「特異的」とは、特定の間質の構成因子以外の成分から当該間質の構成因子を認識し得ることを意味する。

[0019] 本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体

(mAb)等の天然型抗体；遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体；ヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体が含まれるがこれらに限定されない。また、PEG等により修飾された抗体も、本発明において用いられる抗体に包含される。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である。抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgG又はIgMであり、より好ましくはIgGである。

[0020] 抗体の結合性断片とは、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する上記抗体の一部を意味する。抗体の結合性断片としては、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv(variable fragment of antibody)、sFv、dsFv(disulphide stabilized Fv)、sdAb(single domain antibody)、Fab発現ライブラリーによって作製された抗体断片等が挙げられる(Exp. Opin. Ther. Patents, Vol.6, No.5, p.441-456, 1996)。

[0021] 本発明のモノクローナル抗体は、自体公知の方法により作製することができ、例えば、ハイブリドーマ法[Nature、256巻、495頁(1975年)]を用いても、組換えDNA法(Cabilllyら、米国特許第4816567号)を用いても作製することができる。

例えば、間質コラーゲンを市販のアジュバントと共にマウスに2~4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の約3日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞(例えば、NS-1、P3X63Ag8など)を細胞融合して間質コラーゲンに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合はPEG(ポリエチレングリコール)法[J. Immunol. Methods, 81(2): 223-228 (1985)]でも電圧パルス法[Hybridoma, 7(6): 627-633 (1988)]であってもよい。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知のEIA又はRIA法等を用いて抗原と特異的に結合する抗体を、培養上清中から検出することに

より選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、又はマウスもしくはラット、好ましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれハイブリドーマの培養上清及び動物の腹水から取得することができる。

[0022] 本発明のモノクローナル抗体は、全長抗体（抗体全体）、抗体断片（抗体フラグメント、例えば、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 $scFv$ （一本鎖抗体）等）、誘導体化抗体又は修飾化抗体等が使用可能であるが、全長抗体が好ましい。

[0023] キメラ抗体は、前記のようにして得たモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAをヒト抗体C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られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

[0024] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR；complementarity determining region）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（欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照）。

[0025] 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）とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域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をプライマーとして用いてPCR法により合成する（WO 98/13388号公報に記載の方法を参照）。

[0026] CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

- [0027] キメラ抗体及びヒト化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。
- [0028] キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域及びC領域とからなる。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明に使用する抗体として有用である。
- [0029] 生体内での安定性を向上させるため、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質は修飾されていてもよい。例えば、該物質をPEGにより修飾し、チャージをなくすことにより、マクロファージ等による貪食から該物質を保護することが出来る。
- [0030] 本発明において使用可能な抗腫瘍性化合物は、抗癌剤、低分子分子標的剤放射線核種などの生体内において腫瘍細胞を殺傷する活性を有する化合物であれば、臨床や臨床試験において使用されている抗腫瘍性化合物、将来開発される抗腫瘍性化合物を含む全ての化合物を、限定することなく使用することができる。好ましくは時間依存性に抗腫瘍効果を発揮する化合物が使用される。
- [0031] 本明細書において抗腫瘍性部位とは、抗腫瘍活性を有する機能性構造を意味する。抗腫瘍性部位としては、抗腫瘍性化合物、抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造等を挙げる事が出来る。
- [0032] 本発明の複合体において抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物を用いる場合、該抗腫瘍性化合物の分子量は特に限定されないが、本発明の複合体が腫瘍組織中の間質へ送達された後で、該部位において複合体から遊離し、腫瘍組織内を移動して腫瘍組織全体にいきわたり、腫瘍細胞に到達できる程度に低分子量であることが好ましい。このような分子量は、例えば15000Da以下、好ましくは10000Da以下、より好ましくは500Da以下であ

る。また、抗腫瘍性化合物の分子量は、例えば100Da以上、好ましくは300Da以上である。従って、抗腫瘍性化合物の好ましい分子量範囲としては、300～500Daが例示される。

[0033] 抗腫瘍性化合物は、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質又はリンカー（後述）との結合を容易にならしめるため、水酸基、カルボキシル基又はアミノ基を有する化合物であることが好ましい。

[0034] 抗腫瘍性化合物は、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質又はリンカーと結合した状態では、結合していない状態と比較して、その抗腫瘍活性（毒性）が減弱されている、すなわちプロドラッグの状態であることが好ましい。

[0035] 本発明の複合体は、生体へ投与されると、腫瘍組織中の間質へ送達され、該部位にとどまり、抗腫瘍性化合物が該複合体から長期間にわたり徐放されると考えられる。従って、抗腫瘍性化合物として、時間依存性の抗腫瘍効果を有する化合物を使用することで、より高い抗腫瘍効果を期待することができる。ここで「抗腫瘍効果の時間依存性」とは、腫瘍細胞への持続的暴露時間が長いほど、抗腫瘍効果が増大することを意味する。

[0036] 本発明において使用することのできる抗腫瘍性化合物としては、例えば、SN-38（10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシン）、アドリアマイシン、タキソール、5-フルオロウラシル、ニムスチン、ラミニスチン等のアルキル化剤、ゲムシタビン、ヒドロキシカルバミドなどの代謝拮抗剤、エトポシド、ビンクリスチンなどの植物アルカロイド、マイトマイシン、ブレオマイシンなどの抗癌性抗生物質、シスプラチンなどのプラチナ製剤、ソラフェニブ、エルロチニブ等の分子標的剤、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、シクロフォスファミド、イフォスファミド、ブスルファンなどが挙げられるが、これらに限定されない。SN-38は特に、血中では分解されにくいいため本発明への使用に適している。

[0037] 上記化合物のうち、時間依存性の抗腫瘍性化合物としては、SN-38、

タキソール、ビンクリスチン、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン等が挙げられる。

[0038] また、濃度依存性の抗腫瘍性化合物も、腫瘍組織中に存在する腫瘍細胞への高濃度の抗腫瘍剤の暴露という観点から、本発明に好ましく用いられる。ここで「濃度依存性の抗腫瘍性化合物」とは、時間よりも、より高濃度の抗腫瘍剤の暴露により殺細胞効果が左右されるという性質を有する抗腫瘍性化合物を意味する。上記化合物のうち、5-フルオロウラシル、シクロフォスファミド、イフォスファミド、ブスルファン等が挙げられる。

[0039] 本発明の複合体において、抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造を用いる場合、該抗腫瘍性化合物としては、抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物自体を用いる場合と同一のものを使用することが出来る。

[0040] 抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造としては、抗腫瘍性化合物を含有するリポソーム又はミセル等を挙げることができる。

[0041] リポソームとは、水性の内部を有する脂質二重膜の小胞である。リポソームとしては、脂質二重膜が何枚もタマネギ状に重なった多重膜リポソームと単膜リポソームが挙げられる。リポソームを構成する脂質は、通常リン脂質である。リン脂質としては、レシチン、リゾレシチン等のホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジル酸等の酸性リン脂質、又はこれらのアシル基をラウロイル基、ミリストイル基、オレオイル基等に置換したリン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質等がある。また、コレステロール等を添加することもできる。抗腫瘍性化合物を含有するリポソームは、例えば精製したリン脂質の薄膜を抗腫瘍性化合物を含有する溶液に懸濁し、超音波処理等を施して製造することができる。抗腫瘍化合物を含有するリポソームの製造方法については、当該技術分野において周知である。該製造方法については、例えばAnnals of Oncology, vol. 15, pp. 517-525, 2004 ; Cancer Science, vol. 95, pp. 608-613, 2004等を参照のこと。

[0042] ミセルとは、溶液中で溶質がある濃度以上に達した場合に自己会合して形成された会合体である。抗腫瘍性化合物を含有するミセルは、例えば、ブロックコポリマーと抗腫瘍性化合物とを有機溶媒（例えば CHCl_3 ）に溶解し、溶媒を蒸発させた後で、水性溶媒を添加し、混合物を超音波処理に付すことにより得ることが出来る。或いは、ブロックコポリマーの疎水性ポリマー部分に抗腫瘍性化合物を化学的に共有結合させ、得られた融合分子を水性溶媒中で自己会合を起こさせることにより得ることが出来る。ここで、ブロックコポリマーとは、互いに非相溶性ポリマー鎖を末端で結合させたポリマーである。本発明において有用なブロックコポリマーとしては、ポリエチレングリコールポリ（グルタミン酸）ブロックコポリマー、ポリエチレングリコールポリ（アスパラギン酸）ブロックコポリマー等を挙げることが出来るが、これらに限定されない。ミセルに含有される抗腫瘍性化合物としては、水に不溶性又は難溶性のものが好ましい。抗腫瘍性化合物を含有するミセルの製造方法については、当該技術分野において周知である。該製造方法については、例えばCancer Research, vol. 66, pp. 10048-10056, 2006等を参照のこと。

[0043] 生体内での安定性を向上させるため、リポソーム及びミセルは修飾されていてもよい。例えば、リポソーム又はミセルをPEGにより修飾し、チャージをなくすことにより、マクロファージ等による貪食から該物質を保護することが出来る。

[0044] リポソーム及びミセルの粒径は特に限定されないが、本発明の複合体がEPR効果を発揮できるように設定されることが好ましい。そのような粒子径としては、リポソームでは100~450nm、ミセルでは10~80nmである。なお、本明細書において、リポソーム及びミセルの粒子径は、PBS中、25℃で、Particle Sizer NICOMP 380ZLS (Particle Sizing Systems)を用いて動的光散乱法を用いて測定した場合のメジアン径を意味する。

[0045] 本発明の複合体において、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と抗腫瘍性部位とは、直接的に又は間接的に結合している。該結合は通

常共有結合である。「間接的な結合」とは、リンカーを介した結合を意味する。

[0046] 本発明の複合体においては、好ましくは、抗腫瘍性部位がリンカーを介して間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質へ結合している。該リンカー（特にPEG）を介して2つの分子が結合することにより、本発明の間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質の抗原性を減弱できるという効果を有する。

[0047] リンカーを介して抗腫瘍性部位と間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質とを連結する技術は、当該技術分野において周知である。リンカーについての一般的な技術については、Hermanson, G.T. (1996). *Bioconjugate Techniques*, Academic Press; Harris, J.M. and Zalipsky, S., Eds (1997). *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS Symposium Series; Veronese, F. and Harris, J.M., Eds. (2002). *Peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Review* 54(4)等を参照のこと。

[0048] リンカーとは、2つの化合物を連結する2価以上（好ましくは2価）の基を意味する。本発明において使用することのできるリンカーの種類は、特に限定されないが、ポリアルキレングリコールリンカー、アルキレン基、ペプチド、糖鎖、その他高分子担体等を挙げることができる。ポリアルキレングリコールリンカーの構成単位であるアルキレングリコールのアルキレン部分は、通常炭素数1～3000、好ましくは炭素数2～1000、より好ましくは炭素数2～100である。ポリアルキレングリコールリンカーの分子量は通常30～5万Da、好ましくは500～3万Daである。ポリアルキレングリコールリンカーは、好ましくはポリエチレングリコールリンカーである。アルキレン基は、直鎖状又は分岐状のいずれであってもよい。アルキレン基は、通常は炭素数2～3500、好ましくは炭素数100～2000、より好ましくは炭素数500～1000である。

リンカーの分子量は、後述する本発明の複合体の分子量との関係等に基づ

いて、当業者であれば適宜調整することができる。

[0049] リンカーには、直鎖状のリンカー（2価のリンカー）と分岐状のリンカー（3価以上のリンカー）が含まれる。直鎖状のリンカーは、その一端に間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質へ結合する部位を有し、他の一端に抗腫瘍性化合物へ結合する部位を有する。分岐状のリンカーは、通常、その一端に間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質へ結合する部位を有し、該部位へ分岐部位が連結し、該分岐部分の各枝へ直鎖状のリンカー（ポリアルキレングリコール鎖、アルキレン鎖、ペプチド鎖、糖鎖等）が連結し、そのリンカーの先端に抗腫瘍性化合物へ結合する部位を有する。

[0050] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質とリンカーとの結合は、共有結合又は非共有結合（イオン結合、疎水結合等）であるが、好ましくは共有結合である。該結合は、本発明の複合体を腫瘍患者へ投与した場合に、血液中においては切断され難く、且つ腫瘍組織中の間質へ送達され、該部位に複合体が結合した後においても切断され難い態様であることが好ましい。このような結合としては、マレイミド基とチオール基との結合、ハロエステルとチオールを反応させて得られる結合、カルボキシル基とアミノ基とのアミド結合、チオール基とチオール基のジスルフィド結合、アミノ基とアルデヒド基によるシッフ塩基、チオール基とカルボン酸とのチオエステル結合、水酸基とカルボキシル基とのエステル結合、アミノ基とスクアリン酸誘導体（例えば、ジメチルスクアリン酸）による結合、ジエニルアルデヒド基とアミノ基との結合等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。該結合のより具体的な態様としては、リンカーの一端に設けられたマレイミド基と間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質中のシステイン残基に含まれるチオール基との結合、リンカーの一端に設けられたスクシンイミド基と間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質中のリジン残基に含まれるアミノ基との脱水置換結合（例えば、WO 2008/096760号公報参照）、リンカーの一端に設けられたアミノ基と間質の構成因子に

対して特異的結合能を有する物質中のアスパラギン酸やグルタミン酸に含まれるカルボン酸との脱水縮合結合（例えば、WSCDIを使用する）等を挙げることができる。また、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質のアミノ基とリンカーの一端に設けられたジエニルアルデヒド基によるペリ環状反応によりピリジン誘導体として結合させることもできる。また、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質がN末端にシステイン残基を有する場合（例えば、遺伝子改変により、N末端にシステイン残基を導入した場合）、当該システイン残基のアミノ基とチオエステル型であるリンカーとをアミド結合を介して連結することが出来る（例えば、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1997, 36, No. 10, pp. 1069-1071参照）。また、インテイン（タンパク質スプライシング、あるいはタンパク質イントロン）を用いて合成することも考えられる。

[0051] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質とリンカーとの結合の具体的態様の例を以下に示す。

[0052]

[表1]

間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質中の反応基	リンカー側の反応基	結合様式	反応
システイン残基に含まれるチオール基	マレイミド基		付加反応
	カルボキシル基	チオエステル	縮合反応
	チオール基	ジスルフィド	
	ハロエステル		付加反応
リジン残基に含まれるアミノ基	スクシンイミド基又はカルボキシル基(脱水剤を使用)	アミド	脱水縮合
	アルデヒド基	シッフ塩基	脱水縮合
	ジエニルアルデヒド	ピリジン誘導体	ペリ環状反応
	スクアリン酸誘導体	スクアリン酸誘導体	付加反応
	シアヌル酸クロリド	シアヌル酸誘導体	付加反応
	システイン残基がN末端にある場合の該システイン残基中のアミノ基	チオエステル	アミド結合
アスパラギン酸又はグルタミン酸残基に含まれるカルボキシル基	水酸基	エステル	脱水縮合
	チオール基	チオエステル	脱水縮合
セリン又はスレオニン残基に含まれる水酸基	カルボキシル基	エステル	脱水縮合

[0053] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質又はリンカーと抗腫瘍性部位との結合は、共有結合又は非共有結合（イオン結合、疎水結合等）であるが、好ましくは共有結合である。特に、抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物を用いる場合には、該結合は、本発明の複合体を腫瘍患者へ投与した場合に、血液中においては切断され難いが、腫瘍間質へ送達され、該部位に複合体が結合した後で、抗腫瘍性部位が該複合体から徐放され得るような態様であることが好ましい。このような観点から、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質又はリンカーと抗腫瘍性部位との結合は、好ましくはエステル結合、カルバメート結合、より好ましくはエステル結合であるが、これらに限定されるものではない。カーボネート結合やチオカルバメート結合等も、また好ましい。エステル結合の場合は、腫瘍組織内のカルボキシルエステラーゼにより、又は非酵素的に結合が加水分解されて、徐放的に抗腫瘍性部位が遊離されることが期待される。カルバメート結合の場合は、細胞内に抗体複合体のままエンドサイトーシスされた後、細胞内のカルボキシルエステラーゼで切断され、徐放的に抗腫瘍性部位が遊離されることが期待される。カーボネート結合の場合は、非酵素的に結合が加水分解されて、徐放的に抗腫瘍性化合物が遊離されることが期待される。チオカルバメート結合の場合は、非酵素的に結合が加水分解されて、徐放的に抗腫瘍性化合物が遊離されることが期待される。

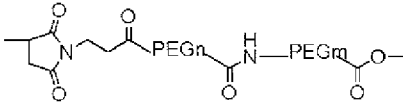
[0054] また、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質又はリンカーと抗腫瘍性部位との結合としては、ヒドラゾン（カルボニルとヒドラジンの脱水縮合体）、チオエステル等を介した結合もまた好ましい。

[0055] 尚、抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物を含有するリポソーム又はミセルを用いる場合には、その構造に起因してリポソーム又はミセルから徐放的に抗腫瘍化合物が遊離され得る。従って、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質又はリンカーとリポソーム又はミセルとの結合は、本発明の複合体を腫瘍患者へ投与した場合に、血液中及び腫瘍間質のいずれにおいても切断され難い態様であってよい。そのような結合の種類としては、例えば

、WO 00/64413号公報に記載されたような結合を挙げることが出来る。

[0056] 直鎖状のリンカーの具体的な例としては、式：

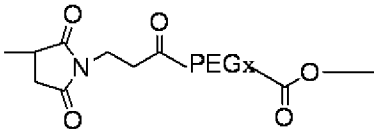
[0057] [化1]



[0058] (式中、PEGはポリエチレングリコール鎖を、n及びmはエチレングリコール単位の数であり、独立して5～100の整数を示す)で表されるリンカーを挙げることが出来る。該リンカーは、通常、スクシンイミジル基を有する末端において間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と連結し、他の末端において抗腫瘍性化合物と連結する。

[0059] さらに、直鎖状のリンカーの具体的な例としては、式：

[0060] [化2]

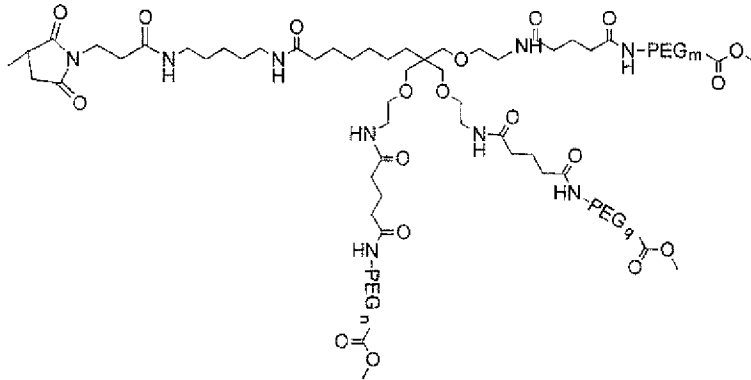


[0061] (式中、PEGはポリエチレングリコール鎖を、xはエチレングリコール単位の数であり、5～100の整数を示す)で表されるリンカーを挙げることができる。該リンカーは、通常、スクシンイミジル基を有する末端において間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と連結し、他の末端において抗腫瘍性化合物と連結する。

[0062] 分岐状のリンカーの具体的な例としては、式：

[0063]

[化3]



[0064] (式中、PEGはポリエチレングリコール鎖を、 n 、 m 及び q はエチレングリコール単位の数であり、独立して5～100の整数を示す)で表されるリンカーを挙げることが出来る。該リンカーは、通常、スクシンイミジル基を有する末端において間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と連結し、他の複数の末端において抗腫瘍性化合物と連結する。この分岐状のリンカーは、例えば、ピアス社から入手可能である。

[0065] 本発明の複合体において抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物自体を用いる場合、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質1分子へ結合する抗腫瘍性化合物の数は、理論的には特に限定されないが、複合体の安定性や製造容易性等の観点から、通常1～10個、好ましくは1～8個である。

また、複合体中のリンカー部分と抗腫瘍性化合物部分とのモル比は、通常1：1であるが、リンカー部分1モルに対して抗腫瘍性化合物が数モルであっても良い。

[0066] 本発明の複合体において抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造(例、リポソーム、ミセル)を用いる場合、該機能性構造へ結合する間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質の比は、理論的には特に限定されないが、複合体の安定性や製造容易性等の観点から、Y. Matsumura et al. Phase I and pharmacokinetic study of MCG-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Annals of Oncology*. 2004; 15: 517-525、F. Koizumi

et al. Novel SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor-Secreting Bulky Tumors. *Cancer Res.* 2006: 66 (20): 10048-10056、T. Hamaguchi et al. Antitumor effect of MCC-465, pegylated liposomal doxorubicin tagged with newly developed monoclonal antibody GAH, in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci.* 2004: 95: 608-613に記載の複合体に準じて決定される。

また、複合体中のリンカー部分と該機能性構造部分とのモル比は、通常 1 : 1 であるが、リンカー部分 1 モルに対して該機能性構造が数モルであっても良い。

[0067] 腫瘍の脈管学的特性として、腫瘍血管透過性の亢進が起きており、正常血管からは漏れにくい高分子物質も腫瘍の血管からは容易に漏出すること、また、血管新生に対してリンパ管新生に乏しいため、一旦腫瘍組織で血管から漏出した高分子物質はリンパ管にドレナージできずに長く腫瘍組織に留まるという EPR 効果 (enhanced permeation and retention effect) が報告されている。本発明の複合体の大きさ (分子量等) は、特に限定されないが、EPR 効果を発揮させるものであることが好ましい。

[0068] 抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物自体を用いる場合、EPR 効果を発揮できる複合体の分子量の範囲は例えば、50,000 Da 以上、好ましくは 70,000 Da 以上が挙げられるが、EPR 効果が発揮できるものであればこれに限定されない。分子量が 50,000 Da を下回ると、分子が腎臓から尿中へ排泄されてしまい、EPR 効果が弱くなるリスクが高くなる。一方、分子量が大きすぎると、該分子が異物として認識されてマクロファージにより貪食されてしまうリスクが高くなるので、本発明の複合体の分子量は通常 200,000 Da 以下である。したがって、本発明の複合体の分子量の範囲としては、好ましくは 10~18 万 Da、より好ましくは 12~16 万 Da、更に好ましくは 15 万 Da が例示される。一般的に、EPR 効果を好適に良好に示すタンパク質の分子量は 70,000~200,000 Da であることが知られている。

- [0069] 抗腫瘍性部位として抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造（例、リポソーム、ミセル）を用いる場合、EPR効果を発揮できる複合体の粒径は、該機能性構造の種類により異なっている。例えば、リポソームを用いる場合、EPR効果を発揮できる複合体の粒子径は、通常100～450nmである。ミセルを用いる場合、EPR効果を発揮できる複合体の粒子径は、通常10～80nmである。なお、本明細書において、複合体の粒子径は、PBS中、25℃で、Particle Sizer NICOMP 380ZLS (Particle Sizing Systems) を用いて動的光散乱法を用いて測定した場合のメジアン径を意味する。
- [0070] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質、リンカー、抗腫瘍性化合物又は該抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造の各分子量（又は粒子径）は、特に限定されないがこれらの分子量は本発明の複合体がEPR効果を発揮できるように設定されることが好ましい。間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質の分子量は、該物質がタンパク質である場合、例えば、50,000Da以上、好ましくは70,000Da以上が挙げられるが、EPR効果が発揮できるものであればこれに限定されない。分子量が50,000Daを下回ると、分子が腎臓から尿中へ排泄されてしまい、EPR効果が弱くなるリスクが高くなる。例えば、分子量25,000DaのF(ab)は腎臓から容易に排出されるので腫瘍への集積性が限られる場合がある。一方、分子量が大きすぎると、該分子が異物として認識されてマクロファージにより貪食されてしまうリスクが高くなり、例えば、分子量900,000DaのIgM抗体は大きすぎて腫瘍血管から漏れにくく、肝臓などの網内系で捕獲されやすいことがある。間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質の分子量は、該物質がタンパク質である場合、通常200,000Da以下である。一般的に、EPR効果を好適に良好に示すタンパク質の分子量は70,000～200,000Daであることが知られている（非特許文献13、17）。このような観点からも、本発明に使用する抗体としては、IgG（分子量約150,000Da）が好ましい。
- [0071] 本発明の複合体は、抗腫瘍性部位へ間質の構成因子に対して特異的結合能

を有する物質を結合させることにより製造することが出来る。2者の結合にリンカーを用いる場合には、抗腫瘍性部位にリンカーを結合させ、更にこれを間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質へ結合させることにより製造することが出来る。なお、各部分を結合させる順は、この順に特定されるものではない。

[0072] 例示的に抗腫瘍性部位としてSN-38（10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシン）を、リンカーとしてポリエチレングリコールリンカーを、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質として抗体を使用する場合に基づき、以下説明するが、他の3者の組み合わせを用いた場合であっても、当業者であれば適宜反応条件を変更することにより、目的とする本発明の複合体を製造することができる。

[0073] (I) 先ず、一方の端にカルボキシル基を有し、他の一方の端にBoc、Fmoc等で保護されたアミノ基を有するポリエチレングリコールとSN-38とを脱水縮合させ、SN-38の水酸基にポリエチレングリコールリンカーを導入する。

[0074] (II) 一方の端にスクシンイミド基を有し、他の一方の端にマレイミド基を有するポリエチレングリコールと(I)の生成物とを混合し、スクシンイミド基と(I)の生成物のアミノ基とを反応させることにより、ポリエチレングリコールリンカーへマレイミド基を導入する。

[0075] (III) (II)の生成物と抗体を混合し、(II)の生成物中のマレイミド基と抗体中のチオール基とを反応させ、(II)の生成物と抗体とを結合させることにより、本発明の複合体を得る。

[0076] 本発明の複合体は、腫瘍組織内の間質に結合し、長い期間腫瘍組織内に留まり、長い期間抗腫瘍効果を発揮し続けるという特徴を有するので、本発明の複合体の有効量を哺乳動物に投与することにより、該哺乳動物における腫瘍を予防又は治療することができる。さらに、本発明の複合体は、長い期間腫瘍組織内に留まり、腫瘍の境界領域で腫瘍に栄養を与える血管の形成を阻害することによっても、長い期間抗腫瘍効果を発揮し得る。従って、本発明

は、上記本発明の複合体を含む腫瘍の予防又は治療剤、腫瘍血管阻害剤（以下、これらを本発明の剤とも呼ぶ）を提供するものである。

[0077] 腫瘍の種類は、特に限定されないが、前記特徴を最大限に発揮させる観点から、固形癌、好ましくは間質を有する固形癌である。固形癌の種類としては、骨肉腫、食道癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、尿管腫瘍、脳腫瘍、胆嚢癌、胆管癌、胆道癌、腎癌、乳癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、甲状腺癌、睾丸腫瘍、カポジ肉腫、上顎癌、舌癌、口唇癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、筋肉腫、皮膚癌等を挙げることができるが、これらに限定されない。特に、本発明の複合体は、間質の多い腫瘍（例えば、膵癌、胃癌（スキルス胃癌）、大腸癌、肺癌などの難治性癌）の予防や治療、腫瘍に栄養を与える血管の形成阻害に有利である。

[0078] 本発明の剤は、任意の哺乳動物の腫瘍に適用することができる。哺乳動物の種類としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類等を挙げることができる。マウス等のげっ歯類の腫瘍組織と比較して、ヒト等の霊長類の腫瘍組織の方が一般的に間質に富んでいるので、本発明の剤は、霊長類、特にヒトの腫瘍の予防又は治療、腫瘍血管の形成阻害に有利である。

[0079] 本発明の剤は、単独で、又は薬理学上許容可能な担体、香味剤、賦形剤、防腐剤、懸濁化剤、溶剤、溶解補助剤、等張化剤、膨化剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、結合剤などの添加剤と共に常套手段に従って製剤化し、経口剤あるいは非経口剤として使用することができる。

[0080] 結合剤としては、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴム、 α 化デンプン、ショ糖、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、トレハロース、デキストリン、プルラン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン

などが挙げられる。

賦形剤としては、乳糖、白糖、D-マンニトール、D-ソルビトール、デンプン、 α 化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴム、プルラン、軟質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、キシリトール、ソルビトール、エリスリトールなどが挙げられる。

潤滑剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。

甘味剤としては、サッカリンナトリウム、グリチルリチン酸二カリウム、アスパルテーム、ステビアなどが挙げられる。

香味剤としては、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーが挙げられる。

防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸が挙げられる。

崩壊剤としては、乳糖、白糖、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、低置換ヒドロキシプロピルセルロース、軟質無水ケイ酸、炭酸カルシウムなどが挙げられる。

懸濁化剤としては、例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子；ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが挙げられる。

溶剤の好適な例としては、注射用水、生理食塩水、リンゲル液、アルコール

ル、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、綿実油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが挙げられる。

等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖、キシリトール、果糖などが挙げられる。

[0081] また、本発明の剤は、例えば、緩衝剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、着色剤などと配合してもよい。

緩衝剤としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤としては、プロピレングリコール、塩酸リドカイン、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなどが挙げられる。

安定化剤としては、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。

保存剤としては、ベンジルアルコール、フェノールなどが挙げられる。

酸化防止剤としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられる。

着色剤の好適な例としては、水溶性着色タール色素（例、食用赤色2号及び3号、食用黄色4号及び5号、食用青色1号及び2号などの食用色素）、不溶性レーキ色素（例、前記水溶性食用タール色素のアルミニウム塩）、天然色素（例、 β -カロチン、クロロフィル、ベンガラ）などが挙げられる。

[0082] また、投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、例えば、経口製剤、注射剤又は経皮製剤で投与可能である。経口製剤としては、錠剤（舌下錠、口腔内崩壊剤を含む）、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、散剤、顆粒剤、トローチ剤、シロップ剤、乳

剤、懸濁剤などが挙げられる。また、注射剤としては、皮内注射、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、脊髄腔内注射、硬膜外注射、局所注射などが挙げられる。また、経皮製剤としては、貼付剤、軟膏剤、散布剤などが挙げられる。これらの製剤は、速放性製剤又は徐放性製剤などの放出制御製剤（例、徐放性マイクロカプセル）であってもよい。

[0083] 本発明の剤は、好適には注射剤として処方される。注射剤のための無菌組成物は、活性物質をビヒクル（注射用水溶液；胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油など）中に溶解又は懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例：エタノール）、ポリアルコール（例：プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例：ポリソルベート80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。注射剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分及び医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。

[0084] 本発明の剤における本発明の複合体の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.1～99.9重量%、好ましくは約1～99重量%、更に好ましくは約10～90重量%程度である。

[0085] 本発明の剤の投与量は、投与対象の種類、投与方法、抗腫瘍剤の種類、腫瘍細胞の種類、部位等を考慮して適宜決定することができるが、ヒト固形癌に対して静脈投与により投与する場合、体重1kg当たり本発明の複合体の量として5～500mgが好ましく、10～500mgであることがより好ましく、10～300mgであることが更に好ましい。これらの有効量は、

一回又は数回に分けて投与することができる。

[0086] 本発明は、別の実施態様として、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質、及びリンカーを介して該物質へ結合した標識化合物からなる複合体を提供する。

標識化合物としては、放射性同位体、蛍光物質又は酵素などが挙げられるがそれらに限定されない。

具体的には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I や ^{131}I 等の放射性同位体、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、フルオロセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートや Eu^{3+} 等の蛍光物質、メチルクマリン系化合物、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素等のような酵素が標識化合物として挙げられる。

酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。

前記間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質、リンカーの定義は前述の通りである。

また、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質とリンカーの結合様式は前述の通りであり、リンカーと標識化合物は前述のリンカーと抗腫瘍性化合物の結合様式に準じて適宜決定することができる。

複合体の粒子径、複合体全体、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質、リンカー、標識化合物の分子量も前述の通りである。

本発明の複合体は前述の製造方法に準じて得ることができる。

該複合体は、長時間腫瘍組織の間質部分に留まることができるため、そのまま、あるいは後記添加剤と共に製剤化して、腫瘍の有無、サイズ、イメージング等の診断薬として使用することができる。

本発明はまた、前記複合体を対象に使用することを含む、腫瘍の診断方法を提供する。

[0087] また、診断薬における本発明の複合体の含有量は、製剤の形態によって相

違するが、前記治療剤における本発明の複合体の含有量に準じて決定することができる。また、本発明の診断薬の使用量も、前記治療剤の投与量に準じて決定することができる。これらは一回又は数回に分けて使用することができる。

[0088] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

実施例

[0089] (参考例 1)

ヒト膀胱癌の手術標本を図 1 に示す。腫瘍血管は乏しく、腫瘍組織塊の中に一部腫瘍細胞が存在するだけで、血管周囲はコラーゲンを含めた間質で充満されていた。

[0090] 一方、ヌードマウスに皮下移植されたヒト膀胱癌株 P S N 1、又は S U I T 2 により生じた腫瘍中の間質コラーゲンの分布を、E p C A M をマウス抗ヒト E p C A M 抗体 (B 8 - 4、国立がんセンター作成) と抗マウス A l e x a 4 8 8 標識二次抗体 (I n v i t r o g e n)、コラーゲンタイプ 4 をラット抗マウスコラーゲン 4 抗体 (1 - 4、国立がんセンター作成) と抗ラット A l e x a 5 5 5 標識二次抗体 (I n v i t r o g e n)、細胞核を D A P I (I n v i t r o g e n) で 3 重染色を行い、蛍光顕微鏡 B Z 9 0 0 0 (K e y e n c e) で撮影することにより観察した。ヒト膀胱癌ほどではないが、間質に豊富なコラーゲンが認められた。また、P S N 1 よりも S U I T 2 でより多くの間質コラーゲンが認められた。

[0091] 膀胱癌細胞株 U M U C 3 を陰性コントロールにして、膀胱癌細胞株に P S N 1 と S U I T 2 について E p C A M の発現をフローサイトメーターで測定した。具体的には、各々細胞株にマウス抗ヒト E p C A M 抗体 (B 8 - 4) を一次抗体として、A P C 標識抗マウス抗体 (B e c k t o n D i c k i n s o n a n d C o m p a n y) を二次抗体として、更に、死細胞測定除去用に P I (プロピジウムアイオダイド、I n v i t r o g e n) を用いて共染色した後、フローサイトメーター F A C S C a r i b u r (B e c k t o

n Dickinson and Company) で測定した。解析は解析ソフトFlowjo (Tree Star) で行った。結果を図2に示す。この結果から、ヒト膀胱癌株SUIT2はEpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) 陽性細胞であることは明らかである。

[0092] (参考例2)

抗体の生体イメージング

ヒトB細胞に対するモノクローナル抗体である抗ヒトCD20抗体 (ヒト膀胱癌株SUIT2とは反応しない抗体、Rituximab、中外製薬) をコントロールとして用い、抗ヒトEpCAM抗体 (B8-4)、抗マウスIV型コラーゲン抗体 (35-4) の腫瘍集積性を検討した。

BALB/cヌードマウス (メス、6週齢) 背部にPSN1又はSUIT2を移植し、移植10日後に各抗体 (IRDye800 (Li-Cor) により標識化) をマウス尾静脈より投与した。投与1日後、3日後、7日後、14日後の抗体の分布を生体イメージング装置OV110 (Olympus) により解析した。

結果を図3に示す。図中、CD20は抗ヒトCD20抗体を、EpCAMは抗ヒトEpCAM抗体を、Co1.4は抗マウスIV型コラーゲン抗体を示す。

抗ヒトCD20抗体は、抗原・抗体反応は起きないが、EPR効果により腫瘍組織に選択的に集積した。しかしながら、抗マウスIV型コラーゲン抗体よりも早く腫瘍組織から消失した。抗ヒトEpCAM抗体も腫瘍組織に集積していたことは認められたが、SUIT2腫瘍特異的であるにもかかわらず、抗マウスIV型コラーゲン抗体より早く消失した。抗マウスIV型コラーゲン抗体は、中和抗原であるマウスIV型コラーゲンがマウス血中に存在しているにもかかわらず、他の2抗体より長期間腫瘍組織に集積したことから、腫瘍への集積性が高いことが示された。

[0093] 以上の結果から、腫瘍細胞表面抗原に対する抗体をターゲティングに用

いた場合よりも、むしろ腫瘍組織中の間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質をターゲティングに用いた場合の方が、腫瘍組織中に抗腫瘍性化合物を長期間留まらせておくことが可能であることが示唆された。

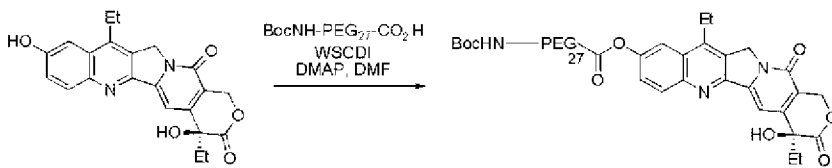
[0094] (実施例 1)

SN-38-リンカー-抗体複合体の製造

1. ポリマーとSN-38との結合

抗腫瘍性化合物SN-38をリンカーへ結合させた。

[0095] [化4]

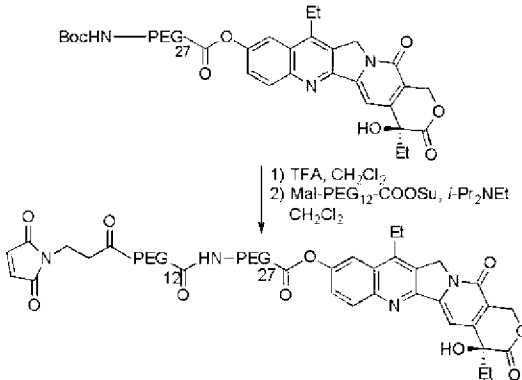


[0096] 10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシン (102.1 mg、0.260 mmol)、Boc-PEG₂₇-COOH (407.1 mg、0.286 mmol)、DMAP (15.9 mg、0.130 mmol) のDMF溶液 (1 mL) 中に、WSCDI (water soluble carbodiimide: 54.8 mg、0.286 mmol) を0°Cで添加した。混合物を室温で19時間攪拌し、反応混合物をゲルろ過カラムクロマトグラフィー (LH20 CHCl₃:MeOH=1:1)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH=15:1-9:1) により精製し、無色油状物としてエステルを得た (420.1 mg、90%)。

¹H-NMR δ (CD₃OD) 8.20 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.66 (m, 2H), 5.60 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 5.40 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 5.32 (M, 2H), 3.93 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.96 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.40 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.8 Hz, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 164.8, 161.9, 149.2, 148.5, 143.1, 142.7, 141.3, 138.2, 137.7, 137.5, 122.4, 119.5, 118.9, 117.2, 110.7, 106.5, 89.7, 70.4, 64.6, 62.3, 62.0, 62.0, 62.0, 61.9, 61.8, 61.8, 61.7, 61.5, 58.1, 58.0, 57.1, 41.2, 40.1, 31.8, 28.1, 26.3, 19.4, 14.4, 4.9, -1.1.

[0097] 2. リンカーへのマレイミド基の導入

[0098] [化5]



[0099] 更に、CH₂Cl₂ (10 mL) 中 Boc-PEG₂₇-カンプトテシン (221.5 mg、0.123 mmol) 溶液に、室温で TFA (1 mL) を添加した。混合物を 1.5 時間攪拌した後、真空内で除去し、トルエンを添加した。蒸発後、残渣を高真空下で乾燥させた。残渣を CH₂Cl₂ (5 mL) 及び MAL-PEG₁₂-NHS (128.2 mg、0.148 mmol) に溶解し、iPr₂NEt (48 μL、0.246 mmol) を 0°C で添加した。30 分後、混合物をゲルろ過カラムクロマトグラフィー (LH-20、CHCl₃:CH₃OH=1:1)、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、無色油状物として目的物を得た (276.0 mg、91%)。

¹H-NMR (CD₃OD) δ 8.20 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.66–7.64 (m, 2H), 6.83 (s, 2H), 5.60 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 5.41 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 5.34 (s, 1H), 3.93 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.97 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.49–2.45 (m, 4H), 2.00–1.98 (m, 2H), 1.41 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.6 Hz, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 172.1, 170.4, 169.8, 169.7, 169.1, 156.5, 151.7, 149.7, 148.9, 146.2, 145.6, 145.0, 134.3, 131.1, 128.4, 126.8, 125.3, 118.8, 115.0, 96.5, 72.3, 69.9, 69.6, 69.5, 69.4, 69.0, 68.9, 66.7, 65.8, 65.1, 49.5, 36.0, 34.8, 34.1, 33.9, 31.6, 30.3, 25.4, 22.3, 13.9, 7.8.

[0100] 3. SN-38-ポリマー化合物と抗体との結合

国立がんセンターで作成した抗ヒトEpCAM抗体 (B8-4)、抗マウ

スIV型コラーゲン抗体（35-4）、抗ヒトCD20抗体（Rituximab、中外製薬）を、それぞれの抗体がPBS中で濃度1.0mg/mlになるよう調整した。DTT（ジチオトレイトール）（Sigma）をファイナル10mMになるように加え、37℃で30分反応させ、限外ろ過（Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices、Millipore Co）で反応試薬を除去した。得られた反応物を、Spectrophotometer（NanoDrop、SCRUM Inc.）で吸収測定したところ抗体の回収率は約80%であった。DN TB（Dinitrothiocyanobenzene、Wako）法によるSH基の定量結果から、1抗体あたり抗ヒトEpCAM抗体は8.7個、抗ヒトCD20抗体は7.2個、抗マウスIV型コラーゲン抗体は7.7個のSH基が得られたと考えられた。次に、タンパク質濃度0.5mg/mlとなるように100mMリン酸緩衝液+150mM NaCl+5mM EDTA（pH 6.0）に上記反応物を溶解し、モル比で抗体1に対しマレイミド化合物4の割合で混合した後、室温で1時間、その後4℃で一晩反応させた。限外ろ過で反応試薬を除去した後、PBSに置換した。蛋白質量は、Bradford法（Bio-Rad Protein Assay、500-0006JA、Bio-Rad）で測定した。蛋白の回収率はEpCAM抗体は51%、CD20抗体は77%、35-4抗体は51%の回収率であり、抗体1個あたりEpCAM抗体は8.4個、CD20抗体は6.7個、抗コラーゲン抗体は7.2個のSN-38が付加された。計算は同じくDN TB法で行った。得られた複合体の模式図を図4に示す。

[0101]（実施例2）

in vitro殺細胞効果

実施例1で作製した、抗ヒトCD20抗体-SN-38複合体、抗ヒトEpCAM抗体-SN-38抗体及び抗マウスIV型コラーゲン抗体-SN-38複合体のin vitroでの殺細胞効果を、フリーのSN-38及びCPT-11と比較した。

96穴細胞プレートにPSN1もしくはSUIT2癌細胞を3000個撒き、24時間後に各複合体を添加し、その48時間後の細胞数をCell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いたWST-8法にて測定した。結果を図5に示す。

その結果、抗ヒトCD20抗体-SN-38複合体、抗ヒトEpCAM抗体-SN-38抗体及び抗マウスIV型コラーゲン抗体-SN-38複合体の抗腫瘍効果は、フリーのSN-38よりも減弱していたが、CPT-11を上回る抗腫瘍効果を維持していた。3種の複合体の間では抗腫瘍効果に差が認められなかった。

[0102] (実施例3)

in vivo抗腫瘍効果

PSN1又はSUIT2をヌードマウスに皮下移植して、腫瘍径が6mmに達したとき、抗ヒトCD20抗体-SN-38複合体、抗ヒトEpCAM抗体-SN-38抗体又は抗マウスIV型コラーゲン抗体-SN-38複合体を静脈内投与し(SN-38換算で各3mg/kg)、腫瘍塊の大きさをモニターした。結果を図6に示す。in vitroでは3種の複合体の間で抗腫瘍効果に差が認められなかったが、in vivoでは抗マウスIV型コラーゲン抗体-SN-38複合体が最も高い抗腫瘍効果を示した。

[0103] 以上の結果から、腫瘍細胞表面抗原に対する抗体をターゲティングに用いた場合よりも、むしろ腫瘍間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質をターゲティングに用いた場合の方が、in vivoにおいては高い抗腫瘍効果を達成し得ることが示唆された。

[0104] (実施例4)

腫瘍細胞と腫瘍血管への作用

SUIT2をヌードマウスに皮下移植して、腫瘍径が6mmに達したとき、抗マウスIV型コラーゲン抗体-SN-38複合体を静脈内投与し(SN-38換算で各3mg/kg)、病理組織学的特徴をモニターした。以下に詳細を示す。

[0105] (材料及び方法)

抗体／薬物及び試薬

抗E p C A M抗体(クローンB 8 - 4)を製造するハイブリドーマを、組換え蛋白質(R & Dシステムズ、ミネアポリス、MN、USA)を免疫したマウスから得た。抗コラーゲンI V抗体(クローン3 5 - 4)を製造するハイブリドーマを、精製蛋白質を免疫したラットから得た。免疫したマウスから得た脾臓細胞を骨髓腫細胞(P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3)と融合させた。ハイブリドーマクローンを製造する特定の抗体は、E L I S Aを使用して結合する組換え蛋白質を選択した。抗ヒトC D 2 0抗体(リツキシマブ)は、第一三共(東京、日本)から購入した。免疫組織化学では、ポリクローナル抗コラーゲンI V抗体(L S L - L B - 1 4 0 3)とモノクローナル抗C D 3 1抗体(M E C 1 3 . 3)をそれぞれコスモバイオ(東京、日本)及びベクトン・ディッキンソン(フランクリンレイクス、NJ、USA)から購入した。S N - 3 8及びC P T - 1 1(イリノテカン)は、それぞれ東京化成工業株式会社(東京、日本)及びヤクルト(東京、日本)から購入した。

[0106] 細胞株

ヒト膵臓癌細胞株P S N 1は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (ロックビル、MD、USA)から購入した。S U I T 2は奥博士(静岡大学、静岡、日本)から提供された。両方の細胞株は、10%胎児ウシ血清(T i s s u e C u l t u r e B i o l o g i c a l s、CA、USA)、ペニシリン、ストレプトマイシン及びアンフォテリシンB(シグマ)を添加したD M E M (シグマ、セントルイス、MO、USA)中で5%CO₂雰囲気下37°Cで維持した。

[0107] リンカー-S N - 3 8複合体、免疫抱合体

実施例1と同様に作成し、抗体-プロドラッグ複合体の濃度を、ブラッドフォード法(B i o - R a d P r o t e i n A s s a y、5 0 0 - 0 0 0 6 J A、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)を使用して決定した。チオール残基の数を、D N T Pで定量した。各薬物(S N - 3 8)／抗体

の割合を、遊離チオールとチオール残基の数を比較することにより決定した（範囲は6.7～8.4）。

[0108] 免疫組織化学

切除した組織を、4℃で5時間1%パラホルムアルデヒド溶液中で固定した。組織をPBSで洗浄し、室温で1時間、ブロッキング溶液（0.1%ウシ血清アルブミン及び0.1% Triton-X 100を含むPBS）でブロックした。ヒト試料は、US Biomax, Inc.（ロックビル、MD、USA）とBioChain Institute, Inc.（ヘイワード、CA、USA）から購入した。組織を、一次抗体として抗EpCAM抗体（B8-4）と抗コラーゲンIV抗体（35-4またはLSL-LB-1403）と一緒に室温で90分インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、二次抗体としてAlexa 488標識抗マウスIgG（インビトロジェン）及びAlexa 555標識抗ラットIgG（インビトロジェン）と一緒に室温で60分インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、DAPI（インビトロジェン）を含有するPBSでインキュベートした。Alexa 555標識抗ラットIgG（インビトロジェン）又は抗ヒトIgG（インビトロジェン）を、腫瘍に注射された抗体プロドラッグSN-38を検出するために使用した。組織をマウンティング溶液（Vector Laboratory）中でカバースリップで覆った。蛍光イメージを、digital high-definition microscopic SYSTEM BZ-9000（株式会社キーエンス、大阪、日本）又はレーザースキャン顕微鏡システムLSM 710（カールツァイス）を用いて得た。

[0109] 動物モデルと抗腫瘍作用

メスBALB/cヌードマウス（5週齢）をSLC Japan（静岡、日本）から購入した。マウスには 2×10^6 個の細胞を脇腹に皮下接種した。腫瘍の大きさ（長さ（L）と幅（W））を4日ごとに測定し、腫瘍体積は（ $L \times W^2$ ）/2を用いて計算した。全ての動物処理は国立がんセンターの動物

実験委員会により確立された実験動物の管理及び使用に関するガイドラインを遵守して行った。このガイドラインは法的に要求される倫理基準に見合うものであり、日本における実験動物の使用のためのガイドラインを満たすものである。平均腫瘍体積が約90 mm³ (PSN1) 又は約70 mm³ (SUIT2) になったとき、マウスを各5匹からなる4群に無作為に分けた。免疫複合体は、尾静脈注射当日に投与した。SN-38用量に等しい抗体-SN-38プロドラッグの注射用量を、各薬物(SN-38) / 抗体の割合に基づいて計算して決定した。

[0110] (結果)

結果を図7に示す。図7中、A、C、E、Gは複合体を投与していない腫瘍であり、B、D、F、Hは複合体投与3ヶ月後の腫瘍を示す。A～Dはヘマトキシリン及びエオシンで染色したSUIT2腫瘍であり、Bで点線で囲まれた部分は生存している細胞を含む。Dで黒三角の先端で示した間の部分は形成された繊維性被膜の幅を示す。腫瘍の成長はKi67免疫化学的染色を用いて調べ、E及びFに示す。GとHの腫瘍血管及びその跡をCD31とコラーゲンIVのダブル染色で調べた。主な陽性部分を点線で囲んだ。

ネズミの異種移植モデルでしばしば見られるようにどちらの腫瘍も血流の減少により中央壊死が生じたが、コントロールの腫瘍は成長していたのに対し、複合体を投与した腫瘍は成長していなかった(A、B参照)。複合体を投与された腫瘍だけで大きな壊死病斑と濃い繊維性被膜の形成が見られた(C、D参照)。Ki67陽性の成長した腫瘍のほとんどはコントロールの境界上で見られたが、複合体投与された腫瘍の中央にも少しだけ見られた(E、F参照)。さらに、CD31陽性内皮細胞は境界領域で腫瘍に栄養を与える血管(tumor feeding vessel)を形成するが、コントロールとは違って複合体投与された腫瘍では観察されなかった。コラーゲン陽性の円形の環が血管の痕跡として、複合体投与された腫瘍の境界領域で見られた(G、H参照)。

以上の結果から、ターゲティング物質を使用せずに抗腫瘍性化合物を投

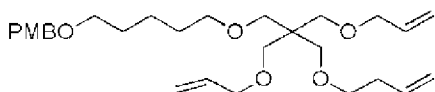
与した場合よりも、腫瘍間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質（例えば抗体コラーゲン I V 抗体）と、それに結合した抗腫瘍性化合物を含む複合体を投与した場合の方が、*in vivo*において高い抗腫瘍効果を達成し得ることが示唆された。また、腫瘍間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質（例えば抗体コラーゲン I V 抗体）と、それに結合した抗腫瘍性化合物を含む複合体を投与することにより、腫瘍の境界領域で腫瘍に栄養を与える血管の形成が抑制されることが示された。

[0111] (実施例 5)

分岐状のリンカーの合成

(工程 1)

[0112] [化6]



[0113] 1-((5-(3-(allyloxy)-2-(allyloxymethyl)-2-((but-3-enyloxy)methyl)propoxy)pentyloxy)methyl)-4-methoxybenzene

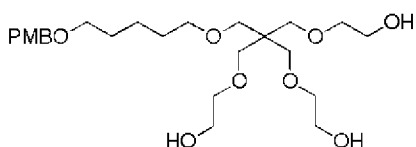
3-(allyloxy)-2-(allyloxymethyl)-2-((but-3-enyloxy)methyl)propan-1-ol (14.85 g、31.17 mmol) の DMF (30 mL) 溶液に NaH (2.31 g、160 mmol) を室温で添加した。1 時間後、臭化物 1-((5-bromopentyloxy)methyl)-4-methoxybenzene (16.7 g、58.04 mmol) を添加した。フラスコを DMF (3 mL) で 2 回洗浄した。混合物を 55°C で 1 時間攪拌した。室温まで冷却した後、N,N-ジメチル 1,3-プロパンジアミン (10 mL) を添加した。1 時間後、混合物を飽和 NH₄Cl 及び EtOAc で希釈した。水性層を EtOAc で抽出した。混合した層を飽和食塩水で洗浄した。有機層は Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過した。蒸発後、残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン: EtOAc 9:1-4:1) で精製して無色油状物として上記式のエーテル化合物 (8.60 g、58%) を得た。

¹H-NMR d 7.23 (dd, J = 6.4 Hz, 2.4 Hz, 2H), 6.5 (dd, J = 6.4 Hz, 2.4 Hz,

z, 2H), 5.85 (m, 3H), 5.23 (d, J = 17.2 Hz, 3H), 5.11 (d, J = 10.4 Hz, 3H), 4.41 (s, 2H), 3.93 (m, 6H), 3.78 (s, 3H), 3.42 (s, 8H) 3.39–3.36 (m, 4H), 1.60–1.51 (m, 4H), 1.38 (m, 2H), ¹³C-NMR d 135.21, 129.11, 115.97, 113.69, 72.53, 72.26, 71.33, 7.13, 69.60, 69.42, 55.30, 45.44, 29.65, 29.50, 22.94.

[0114] (工程2)

[0115] [化7]



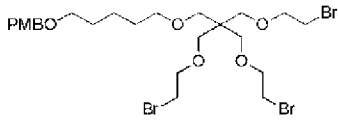
[0116] 2, 2' - (2 - ((2-hydroxyethoxy)methyl) - 2 - ((5 - (4-methoxybenzyloxy) pentyloxy)methyl) propane-1, 3-diyl) bis(oxy) diethanol

工程1で得たトリアリル化合物1-((5-(3-(allyloxy)-2-(allyloxymethyl)-2-((but-3-enyloxy)methyl)propoxy)pentyloxy)methyl)-4-methoxybenzene (8.60g、18.06mmol)のCH₂Cl₂(200mL)及びMeOH(200mL)溶液に、反応混合物が薄い青色になるまで-78°Cでオゾンを通気した。オゾン酸素ガスに置換した後、NaBH₄(8.60g、210mmol)を数回に分けて添加した。反応混合物を徐々に温めた後、一晩室温で攪拌した。反応液を濃縮後、混合物をCHCl₃と飽和NH₄Clとの間で分液した。水性層をCHCl₃で抽出した。混合した層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過した。溶媒を減圧除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH 9:1)で精製し、上記式のトリオール化合物(8.56g quant.)を得た。

¹H-NMR d 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s like, 6H), 3.53 (m, 6H), 3.48 (s like, 8H), 3.43–3.37 (m, 4H), 2.86 (s, 3H), 1.58–1.53 (m, 4H), 1.39 (m, 2H); ¹³C-NMR d 129.16, 113.69, 72.56, 72.50, 71.67, 70.46, 70.05, 70.00, 61.4, 55.30, 45.40, 29.56, 29.32, 22.92.

[0117] (工程 3)

[0118] [化8]



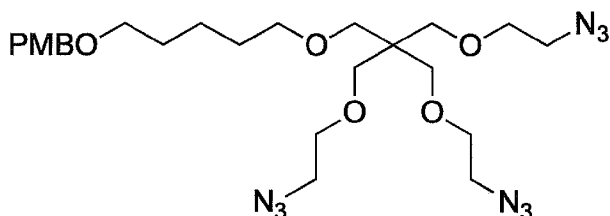
[0119] 1-((5-(3-(2-bromoethoxy)-2,2-bis((2-bromoethoxy)methyl)propoxy)pentyloxy)methyl)-4-methoxybenzene

工程 2 で得たトリオール化合物 (2,2'-((2-((2-hydroxyethoxy)methyl)-2-(5-(4-methoxybenzyloxy)pentyloxy)methyl)propane-1,3-diyl)bis(oxy)diethanol (2.91 g、6.14 mmol) 及び PPh_3 (6.43 g、24.51 mmol) の THF (50 mL) 溶液に、 CBr_4 (8.14 g、24.51 mmol) を 0°C で数回に分けて添加した。混合物を一晩室温で攪拌した。ジエチルエーテルを混合物に添加し、沈殿物を濾過した。濾液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc 9 : 1 - 4 : 1) で精製して上記式の三臭化物 (3.48 g、86%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ d 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.42 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.74-3.71 (m, 6H), 3.47 (s, 8H), 3.47-3.38 (m, 6H), 1.7-1.50 (m, 4H), 1.40 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ d 129.12, 113.66, 72.53, 71.33, 71.14, 70.08, 69.38, 68.88, 55.29, 45.72, 30.82, 29.63, 22.97.

[0120] (工程 4)

[0121] [化9]



[0122] 1-((5-(3-(2-azidoethoxy)-2,2-bis((2-azidoethoxy)methyl)propoxy)pentyloxy)methyl)-4-methoxybenzene

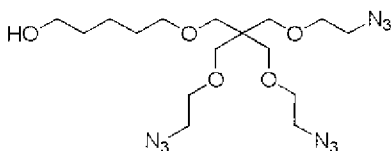
工程 3 で得た三臭化物 (1-((5-(3-(2-bromoethoxy)-2,2-bis((2-bromoethoxy)methyl)propoxy)pentyloxy)methyl)-4-methoxybenzene (3.48 g、5

. 27 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に、NaN₃ (5.27 g、81.08 mmol) を添加し、混合物を 50°C で 4 時間攪拌した。混合物を EtOAc 及び飽和 NaHCO₃ で希釈した。水性層を EtOAc で抽出した。混合した層を飽和食塩水で洗浄した。Na₂SO₄ で混合物を乾燥後、溶媒を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc 7 : 3) で精製し、上記式のトリアジド化合物 (2.84 g、98%) を得た。

¹H-NMR d 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.59 (t, J = 4.8 Hz, 6H), 3.47 (s, 8H), 3.44–3.28 (m, 10H), 1.61–1.55 (m, 4H), 1.39 (m, 2H); ¹³C-NMR d 129.04, 113.63, 72.53, 71.32, 70.46, 70.13, 69.71, 68.85, 55.32, 50.86, 45.12, 29.70, 23.04.

[0123] (工程 5)

[0124] [化10]



[0125] 5-(3-(2-azidoethoxy)-2,2-bis((2-azidoethoxy)methyl)propoxy)pentan-1-ol

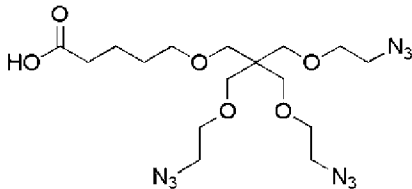
工程 4 で得た PMB エーテル (2.63 g、4.7 mmol) の CH₂Cl₂ (30 mL) 及び H₂O (20 mL) 溶液に、DDQ (1.30 g、5.75 mmol) を 0°C で添加した。添加後、氷浴を取り除き、室温で攪拌した。5 時間後、反応をクエン酸緩衝液で停止させ、水性層を EtOAc で抽出した。混合した層を飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で洗浄した。有機層は Na₂SO₄ で乾燥させた。濾過後、溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc 1 : 1) で精製し、上記式のアルコール化合物 (1.55 g、75%) を得た。

¹H-NMR d 3.64–3.58 (m, 8H), 3.46 (s, 6H), 3.41–3.38 (m, 4H), 3.31–3.28

(m, 6H), 1.57–1.55 (m, 4H), 1.41 (m, 2H); ^{13}C -NMR d 71.20, 70.46, 69.67, 68.84, 62.92, 50.86, 45.08, 32.57, 29.36, 22.56.

[0126] (工程6)

[0127] [化11]



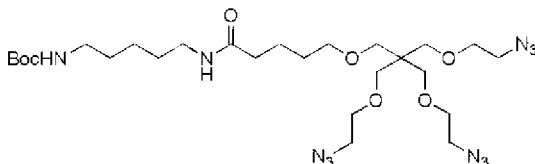
[0128] 5-(3-(2-azidoethoxy)-2,2-bis((2-azidoethoxy)methyl)propoxy)pentanoic acid

工程5で得たアルコール化合物(1.55g、3.61mmol)のアセトン(20mL)溶液に、ジョーンズ試薬を0°Cで添加した。過剰のジョーンズ試薬をiPrOHで破壊し、沈殿物を濾過した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:EtOAc 7:3-1:1)で精製し、上記式の酸(1.37g、86%)を得た。

^1H -NMR d 3.72 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 3.60 (t, J = 4.4 Hz, 4H), 3.47 (s, 8H), 3.44–3.40 (m, 4H), 3.32 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 2.83 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.60 (m, 2H); ^{13}C -NMR d 177.69, 77.21, 70.77, 70.48, 69.68, 68.96, 50.87, 45.11, 33.55, 28.93, 21.81.

[0129] (工程7)

[0130] [化12]



[0131] tert-butyl 5-(5-(3-(2-azidoethoxy)-2,2-bis((2-azidoethoxy)methyl)propoxy)pentanamido)pentylcarbamate

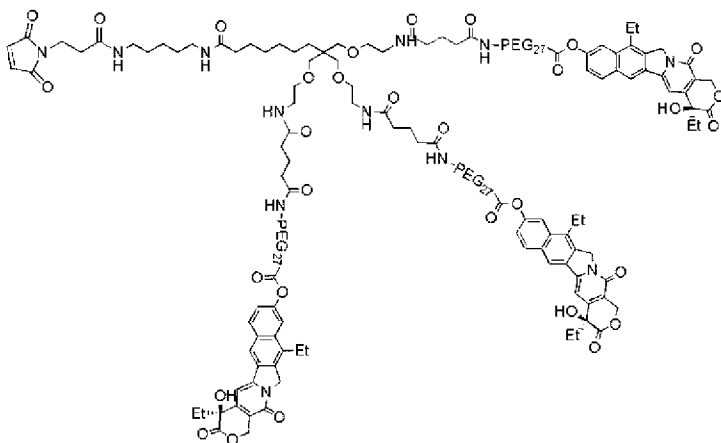
工程6で得た酸(1.65g、3.85mmol)、N-(tert-butoxycarbonyl)-1,5-diaminopentane(1.56g、7.69mmol)及びHOBt(1.03g、7.60mmol)のCH₂Cl₂(30mL)溶液に、WSC

DI (1.47 g、7.69 mmol) を 0°C で添加した。混合物を一晩室温で攪拌し、 CHCl_3 及び飽和 NH_4Cl で希釈した。水性層を CHCl_3 で抽出した。混合した層を飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 : EtOAc 1 : 1-EtOAc only) で精製し、上記式のアミド化合物 (2.18 g、90%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ d 5.60 (bs, 1H), 4.55 (bs, 1H), 3.72 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 3.47–3.41 (m, 12H), 3.30 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 3.22 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.10 (m, 2H), 2.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.70–1.46 (m, 7H), 1.43 (s, 9H), 1.34 (m, 3H), $^{13}\text{C-NMR}$ d 172.64, 155.87, 77.21, 71.15, 71.13, 70.99, 70.94, 70.50, 69.73, 69.69, 69.36, 68.97, 50.91, 45.35, 45.11, 40.35, 39.36, 36.56, 31.00, 29.88, 20.40, 29.23, 28.55, 24.09, 22.77.

[0132] (工程 8)

[0133] [化13]



[0134] 実施例 1 の 1. で得た SN38-PEG の Boc 化合物 (0.52 g、0.270 mmol) を CH_2Cl_2 (20 mL) に溶かし、TFA (2 mL) を加えて室温において 2 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、トルエンを加え、さらに濃縮、真空下乾燥した。この残渣を CH_2Cl_2 (20 mL) に溶解し、 $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0.57 mmol、3.24 mmol) を 0°C にて加え、無水スクイミド (30 mg、0.297 mmol) を加え、室温にて終

夜攪拌した。反応液をLH20 (CHCl₃:MeOH 1:1)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH 9:1-4:1) にて精製した。

一方で、工程7で合成したトリアジド (63 mg、0.10 mmol) のジオキサン (1 mL) と水 (1 mL) の溶液にトリフェニルホスフィン (105 mg、0.40 mmol) を加え、窒素雰囲気下室温にて終夜攪拌した。

反応液を濃縮し、上のカルボン酸をCH₂Cl₂ (10 mL) に溶かし加え、これにHOBt (54 mg、0.4 mmol)、WSCDI (76 mg、0.40 mmol) を加えた。反応液を終夜室温にて攪拌し、反応液をLH20 (CHCl₃:MeOH 1:1)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH 9:1-4:1) にて精製し、0.22 gを得た。これをCH₂Cl₂ (4.5 mL) とTFA (0.5 mL) に溶かし、1時間室温にて攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。これをCH₂Cl₂ (1 mL) に溶かし、iPr₂NEt (0.1 mL) を加え、N-succinimidyl 3-Maleimidopropionate (13 mg、0.470 mmol) を加えた。室温にて2時間攪拌し、これをLH20 (CHCl₃:MeOH 1:1)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH 9:1-4:1) にて精製し、65 mgの目的物を得た。

[0135] (参考例3)

抗コラーゲンタイプIV抗体を産生するハイブリドーマクローン35-4 (ラット抗マウスコラーゲンタイプIV抗体 IgG2a)、6-1 (マウス抗ヒトコラーゲンタイプIV抗体 IgM)、6-2 (マウス抗ヒトコラーゲンタイプIV抗体 IgM) 及び56P-1 (マウス抗ヒトコラーゲンタイプIV抗体 IgM) より抗体のVL及びVH部位をクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。

[0136] Gillilandらの方法 (Tissue Antigen 1996: 47: 1-20) を参考にして、Constant region内の特定配列を元にプライマーを設計し、5' -RACE法に

よりVLおよびVHを取得し、プロメガ社のpGEM-T Easyベクター (TA cloning) にクローニングした。全てのクローンに関して特異的なシングルバンドが検出されたため、pGEM-T EasyベクターにTA cloning法によりクローニングし、塩基配列を解析した。

[0137] (結果)

ハイブリドーマクローン35-4から得られた重鎖G2aのVH部位の塩基配列を配列番号1に示す。rIgG2aクローンBC088240.1の対応するcDNA配列 (配列番号9) とのアライメントの結果を、図8に示す。

ハイブリドーマクローン35-4から得られた重鎖G2aのVH部位の塩基配列から推定されたアミノ酸配列を配列番号12に示す。rIgG2aクローンBC088240.1の対応するアミノ酸配列 (配列番号20) とのアライメントの結果を、図9に示す。

[0138] ハイブリドーマクローン6-1、6-2及び56P-1から得られた重鎖MuのVH部位の塩基配列を、それぞれ配列番号3、5及び7に示す。IgM可変領域クローンJ00529.1及びIgM定常領域クローンV00827.1の対応するcDNA配列 (配列番号10) とのアライメントの結果を、図10に示す。

ハイブリドーマクローン6-1、6-2及び56P-1から得られた重鎖MuのVH部位の塩基配列から推定されたアミノ酸配列を、それぞれ配列番号14、16及び18に示す。IgM可変領域クローンJ00529.1及びIgM定常領域クローンV00827.1の対応するアミノ酸配列 (配列番号21) とのアライメントの結果を、図11に示す。

[0139] ハイブリドーマクローン35-4、6-1、6-2及び56P-1から得られた κ 鎖のVL部位の塩基配列を、それぞれ配列番号2、4、6及び8に示す。 κ 鎖クローンBC088255.1の対応するcDNA配列 (配列番号11) とのアライメントの結果を、図12に示す。

ハイブリドーマクローン35-4、6-1、6-2及び56P-1から得

られた κ 鎖のVL部位の塩基配列から推定されたアミノ酸配列を、それぞれ配列番号13、15、17及び19に示す。 κ 鎖クローンBC088255-1の対応するアミノ酸配列（配列番号22）とのアライメントの結果を、図13に示す。

[0140] VL及びVHの長さは通常110アミノ酸程度であることが示されており、今回5'-RACE法によりクローニングされた配列の長さは同程度であったため、VL及びVHの全長のcDNA配列が得られたと考えられる。この得られた配列を用いることにより、常法によりキメラ抗体やヒト化抗体を設計し、調製することが可能となる。

[0141] (参考例4)

ヒト膵癌の手術標本を、抗ヒトフィブリン抗体（国立がんセンター作成）で染色した。腫瘍組織内の間質に、多くのフィブリン塊が認められた。

[0142] 一方、ヌードマウスに皮下移植されたヒト大腸癌株HT29により生じた腫瘍中の間質フィブリンの分布を、抗マウスフィブリン抗体（国立がんセンター作成）で染色を行うことにより観察した。腫瘍組織内の間質に豊富なフィブリンが認められた。

[0143] (参考例5)

抗体の生体イメージング

抗マウスフィブリン抗体（国立がんセンター作成）の腫瘍集積性を検討した。

BALB/cヌードマウス背部にHT29を移植し、移植10日後に抗マウスフィブリン抗体（IRDye800（Li-Cor）により標識化）をマウス尾静脈より投与した。投与後の抗体の分布を生体イメージング装置OV110（Olympus）により解析した。

投与後においても、抗マウスフィブリン抗体の腫瘍組織内における集積が認められることから、抗フィブリン抗体は腫瘍への集積性が高いことが示された。

[0144] 以上の結果から、フィブリンに対して特異的結合能を有する物質をターゲ

ッティングに用いると、腫瘍組織中に抗腫瘍性化合物を長期間留まらせておくことが可能であることが示唆された。

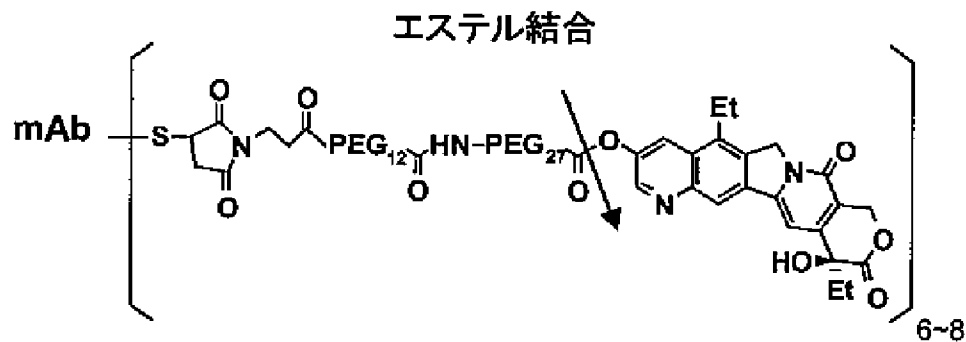
[0145] (実施例 6)

抗フィブリン抗体-SN-38 複合体 (エステル結合の態様) の製造

ヒトフィブリノゲンをフィブリンに変換し、ヒトフィブリンでマウスを免疫することにより、ヒトフィブリンを特異的に認識するモノクローナル抗体を得た。本抗体はマウスフィブリンにも交差反応した。本抗体の可変部分の cDNA 配列を明らかにし、該可変領域と、ヒトFc部分とを含むキメラ抗体を作成した。

実施例 1 と同様に、抗フィブリン抗体-SN-38 複合体を製造した。ここで得られる複合体においては、SN-38 がエステル結合を介してリンカーに結合している。得られた複合体の模式図を下に示す。

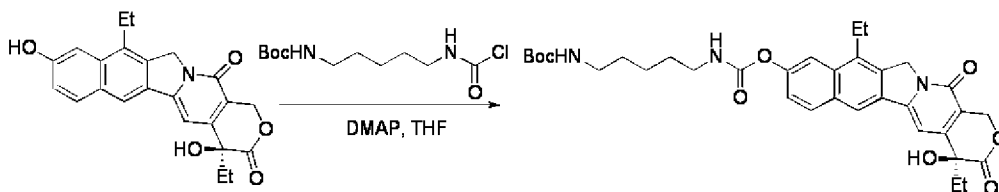
[0146] [化14]



[0147] (実施例 7)

抗フィブリン抗体-SN-38 複合体 (カルバメート結合の態様) の製造

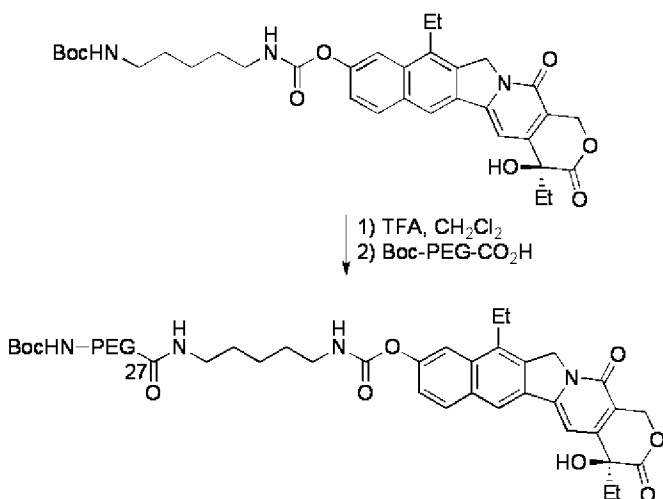
[0148] [化15]



[0149] tert-butoxycarbonyl amino pentanamine (1.00 g, 4.95 mmol) とトリエチルアミン (1.3 mL) の塩化メチレン溶液 (10 mL) にトリホスゲン (483 mg,

1.63 mmol) を数回に分けて 0°C にて加えた。反応液を 2 時間攪拌後、沈殿物を窒素雰囲気下、セライト濾過した。ろ液を SN-38 (1.21 g, 3.10 mmol) と DMAP (375 mg, 3.10 mmol) の THF (20 mL) の懸濁液に 0°C にて加えた。反応液を窒素雰囲気下、室温にて一日攪拌した。分子ふるいカラム (LH20 CHCl₃:MeOH 1:1), シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH 20:1-10:1) により精製しカーバメート (828 mg, 43%) を無色泡状物質として得た。

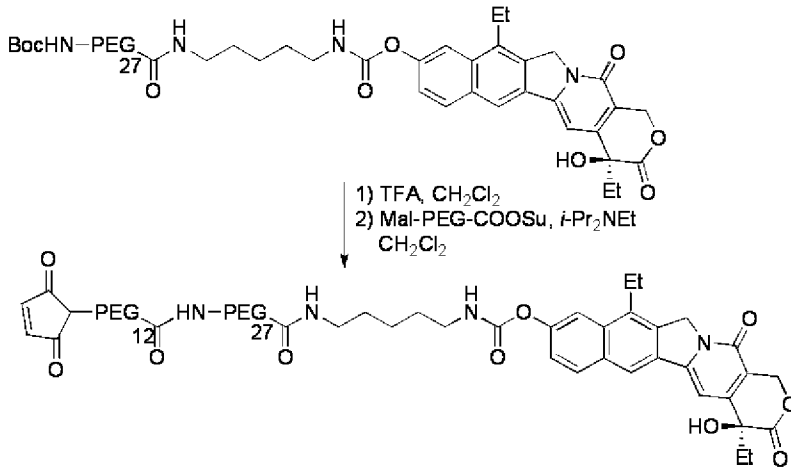
[0150] [化16]



[0151] Boc 化合物 (52.0 mg, 0.084 mmol) を CH₂Cl₂-TFA (1:10, 1.1 mL) に溶解し、室温にて 3 時間攪拌した。トルエン (50 mL) 反応液を濃縮した。残さに塩化メチレン (2 mL) を加え、i-Pr₂NEt (0.3 mL) と PEG-succinimide (200 mg) を 0°C にて加えた。室温にて 3 時間攪拌後、反応液を LH20 (MeOH:CHCl₃ 1:1) とシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH 10:1) により精製し、11.9 mg (69%) の PEG 付加体を得た。

[0152]

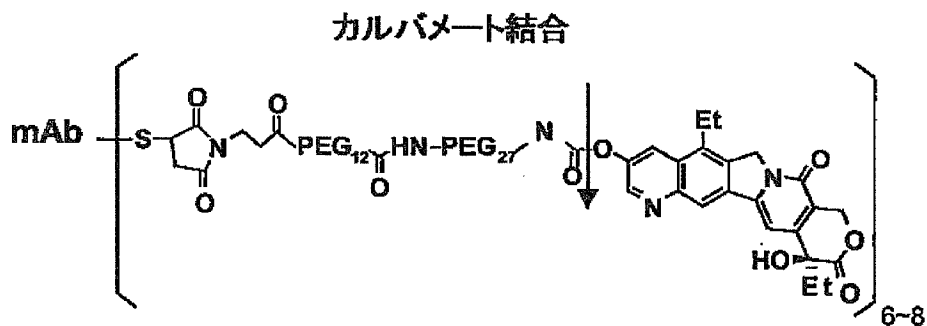
[化17]



[0153] Boc 体を(330 mg, 0.171 mmol)を塩化メチレン (4 mL) に溶解し、TFA (0.4 mL) を加えて、2 時間攪拌した。トルエン (50 mL) を加えて、反応液を濃縮した。残さを塩化メチレン (4 mL) に溶かし、*i*-Pr₂NEt (0.15 mL, 0.884 mmol) と MAL-PEG₁₂-succinimide (148 mg, 0.171 mmol) を 0 ° C にて加えた。2 時間攪拌後、反応液を SX-4 (toluene) とシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH 20:1-10:1) により精製し、157 mg の目的物を得た。

ここで得られる複合体においては、SN-38 がカルバメート結合を介してリンカーに結合している。得られた複合体の模式図を下に示す。

[0154] [化18]



[0155] (実施例 8)

in vivo 抗腫瘍効果

ヒト大腸癌 HT29 をヌードマウスに皮下移植して、腫瘍径が 6 mm に達したとき、実施例 6 で得られた抗フィブリン抗体-SN-38 複合体 (以下 Fib-E)、実施例 7 で得られた抗フィブリン抗体-SN-38 複合体 (

以下F i b - N)、又は生理食塩水(コントロール)を静脈内投与し(S N - 3 8換算で各3 m g / k g)、投与後2 0日目の腫瘍径の大きさをモニターした。結果を図1 4に示す。

いずれの抗フィブリン抗体-S N - 3 8複合体も高い抗腫瘍効果を示したが、F i b - Eのほうが、F i b - Nよりも高い抗腫瘍効果を示した。

[0156] 以上の結果から、フィブリンに対して特異的結合能を有する物質をターゲットリングに用いた場合においても、高い抗腫瘍効果を達成し得ることが示唆された。また、抗腫瘍化合物をエステル結合で複合体に結合させることにより、より高い抗腫瘍効果が期待できることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0157] 本発明によれば、腫瘍間質に特異的且つ長時間留まり、優れた抗腫瘍効果を発揮する複合体が提供される。特に、本発明の複合体を用いれば、時間依存性の抗腫瘍効果を有する抗腫瘍性化合物の抗腫瘍効果を有効に発揮させることが可能となる。また、腫瘍血管及び／又は腫瘍細胞に作用するので、従来の複合体よりも著しく高い抗腫瘍効果が望める。

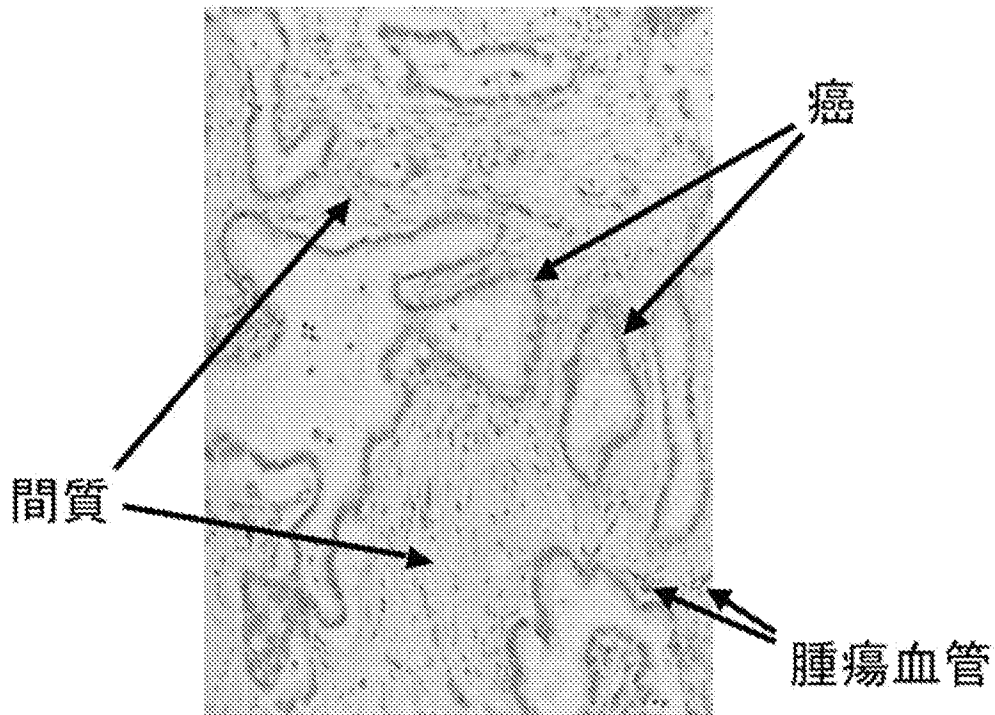
[0158] 本出願は、日本で出願された特願2 0 0 8 - 2 9 3 9 3 0 (出願日: 2 0 0 8年1 1月1 7日)及び特願2 0 0 9 - 1 2 5 8 7 1 (出願日: 2 0 0 9年5月2 5日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

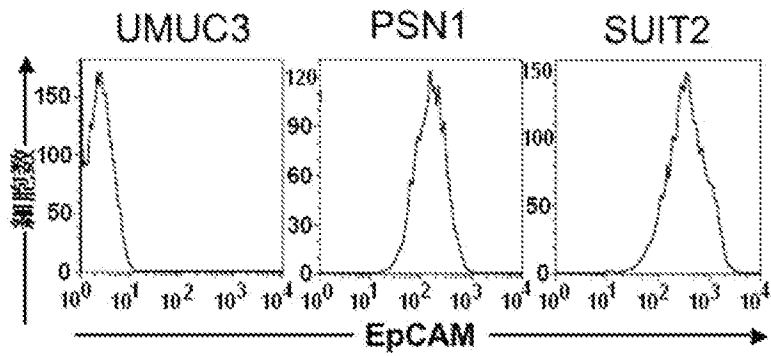
- [請求項1] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質及び該物質へ結合した抗腫瘍性部位を含む複合体。
- [請求項2] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質と抗腫瘍性部位とがリンカーを介して結合している、請求項1記載の複合体。
- [請求項3] 抗腫瘍性部位が抗腫瘍性化合物である、請求項1記載の複合体。
- [請求項4] 抗腫瘍性部位が抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造である、請求項1記載の複合体。
- [請求項5] 抗腫瘍性化合物を徐放できる機能性構造が、抗腫瘍性化合物を含有するリポソーム又はミセルである、請求項4記載の複合体。
- [請求項6] 間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質が、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する抗体又はその結合性断片である、請求項1記載の複合体。
- [請求項7] 間質の構成因子がコラーゲンである、請求項1記載の複合体。
- [請求項8] コラーゲンがI V型コラーゲンである、請求項7記載の複合体。
- [請求項9] 間質の構成因子がフィブリンである、請求項1記載の複合体。
- [請求項10] リンカーと抗腫瘍性部位とが、エステル結合又はカルバメート結合を介して結合している、請求項2記載の複合体。
- [請求項11] リンカーと抗腫瘍性部位とが、カーボネート結合又はチオカルバメート結合を介して結合している、請求項2記載の複合体。
- [請求項12] 請求項1記載の複合体を含む、腫瘍の治療剤。
- [請求項13] 請求項1記載の複合体を含む、腫瘍血管形成阻害剤。
- [請求項14] 哺乳動物に対して有効量の請求項1記載の複合体を投与することを含む、該哺乳動物における腫瘍の治療方法。
- [請求項15] 哺乳動物に対して有効量の請求項1記載の複合体を投与することを含む、該哺乳動物における腫瘍血管の形成を阻害する方法。
- [請求項16] 腫瘍の治療において使用するための、請求項1記載の複合体。
- [請求項17] 腫瘍血管の形成阻害において使用するための、請求項1記載の複合

体。

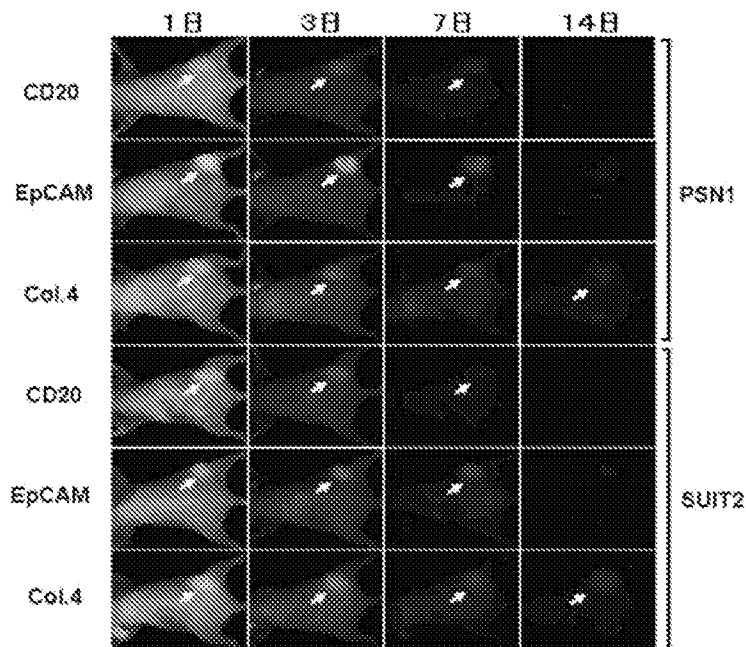
[図1]



[図2]

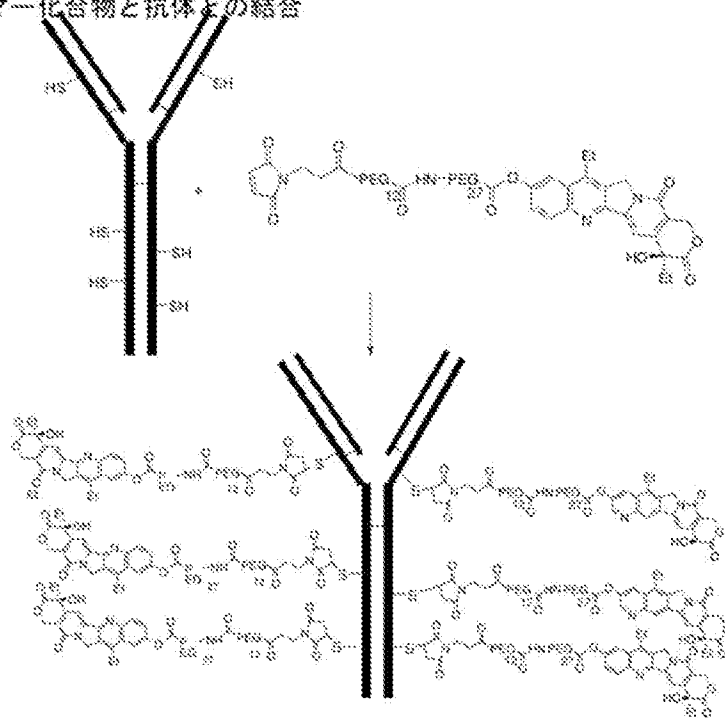


[図3]

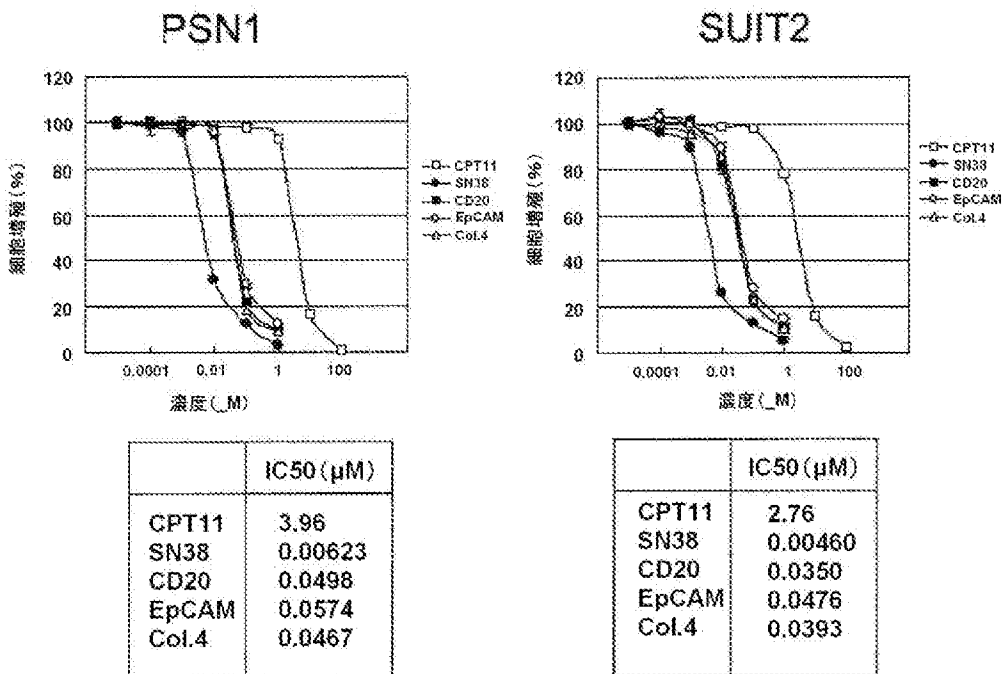


[図4]

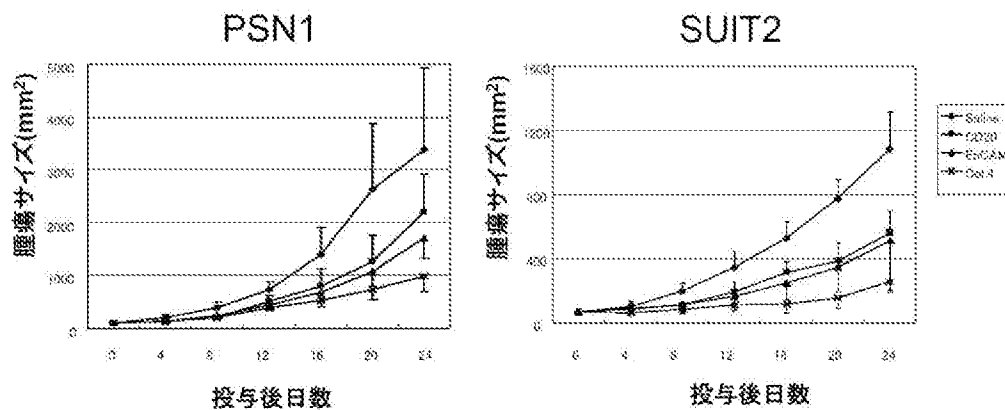
SN-38-ポリマー化合物と抗体との結合



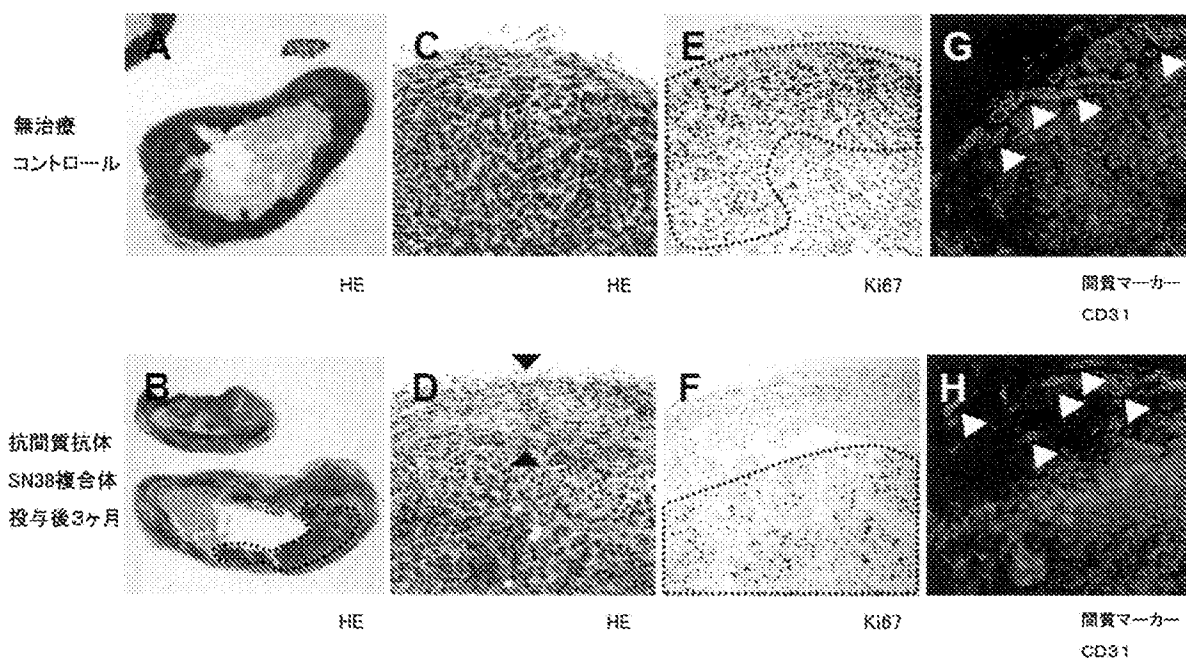
[図5]



[図6]



[図7]



[8]

```

      10      20      30      40      50      60      70
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          CTTTCACAGCATGGCTGTCCCTGGTGCCTGTTCCTCCCTGGTG
CAGGGGATCTCCCTTCTCACTAGAGCCCTCCATCACAGCATGGCTGTCCCTGGTGCCTGTTCCTCCCTGGTG

      80      90      100     110     120     130     140
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          AGATTTTCCAAGCTGTGTCTCTCCAGGTGCAGTTGATGGACTCAGGACCTGGCTGGTGCAGCCCTCAG
ATATTTTCCAAGCTGTGTCTCTCCAGGTGCAACTAAAGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTACAGCCATCAC

      150     160     170     180     190     200     210
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          AGACCCCTGTCCCTCAATTTGTAAGTCTCTCTGGGTTCTCACTAACAGCTATAACCTGCACCTGGGTTCCACA
AGACCCCTGTCTCTCACTTGCACCTGTCTCTGGGTTTATCACTAACAGCTATAAGTCTAAGCTGGGATTCGGCA

      220     230     240     250     260     270     280
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          GCCTCCAGGAAAAGGTCCTGGAGTGGATGGGAGTAAATGTGGAGTGGTGGAAACACAGATTATAATTCAGCT
GCCTCCAGGAAAAGGTCCTGGAGTGGATGGGAGTAAATGTGGAGTAAATGGAGGCACAGATTATAATTCAGCT

      290     300     310     320     330     340     350
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          CTCGAAATCCCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCTCCAGAAACCAAGTTTCTTAAATAATGAACAGTCTGC
ATCGAAATCCCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCTCCAGAAACCAAGTTTCTTAAATAATGAACAGTCTGC

      360     370     380     390     400     410     420
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          AAAGTGAAGACGCAACCACTTACTACTGTGCCAGAGAGGGGTATCCCTACTACTTTTAAATTACTGGGGCCA
AAACTGAAGACACAGCCATGTACTTCTGTGCCAGAGAGGCTGGG---GGCTACTTTGATTACTGGGGCCA

      430     440     450     460     470     480     490
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          AGGAGTCAATGGTCAAGTCTCTCTCAGCTGAAACAAAGCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCCTGGAACT
AGGAGTCAATGGTCAAGTCTCTCTCAGCTGAAACAAAGCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCCTGGAACT

      500     510     520     530     540     550     560
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          GCTCTCAAAGTAACTCCATGGTACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTCAACC
GCTCTCAAAGTAACTCCATGGTACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTCAACC

      570     580     590     600     610     620     630
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          TGACCTGGAACCTCTGGAGCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTTSCAGTCTGGACTCTTA
TGACCTGGAACCTCTGGAGCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTTSCAGTCTGGACTCTTA

      640     650     660     670     680     690     700
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          CACTCTCACCAGTCAAGTGAATACCTCCAGCACCTGGTCCAGCCAGGCGGTCACTGCAACGTTAGCC
CACTCTCACCAGTCAAGTGAATACCTCCAGCACCTGGTCCAGCCAGGCGGTCACTGCAACGTTAGCC

      710     720     730     740     750     760     770
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          CACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTTGTGCCAAGGGAATGCAATCCTTTGTGGATGTACAG
CACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTTGTGCCAAGGGAATGCAATCCTTTGTGGATGTACAG

      780     790     800     810     820     830     840
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          GCTCAGAAAGTATCATCTGTCTTCACTTCCCTCCCAAGACCAAGATGTGGTCAACCATCACTCTGACTCC
GCTCAGAAAGTATCATCTGTCTTCACTTCCCTCCCAAGACCAAGATGTGGTCAACCATCACTCTGACTCC

      850     860     870     880     890     900     910
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          TAAGGTCACCTGTGTGTGGTGAACATTAGCCAGAAATGATCCCGAGGTCCGGTTCAAGTGGTTTATAGAT
TAAGGTCACCTGTGTGTGGTGAACATTAGCCAGAAATGATCCCGAGGTCCGGTTCAAGTGGTTTATAGAT

      920     930     940     950     960     970     980
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          GACGTGGAAATCCACACAGCTCAGACTCATGCCCGGAGAGCAGTCCACAGCATTACGGCTCAGTCA
GACGTGGAAATCCACACAGCTCAGACTCATGCCCGGAGAGCAGTCCACAGCATTACGGCTCAGTCA

      990    1000    1010    1020    1030    1040    1050
rIg G2a BC088240.1  -----|-----|-----|-----|-----|-----|
35-4 G2a #6          GTGTAATCCCTCCATCCGACCCGGGACTGGCTCAATGGCAAGACGTTCAAAATGCAAAATCAACAGTGGGCA
GTGTAATCCCTCCATCCGACCCGGGACTGGCTCAATGGCAAGACGTTCAAAATGCAAAATCAACAGTGGGCA

```

[9]

```

      10      20      30      40      50      60      70
rIgG2a BC088240.1  --LHSMAVLVLLLCILVTFPSCVLSQVQIMESGPGGLVQPSSETLSLICITVSGFSLTSYNVHWVRQPPGKGLE
35-4 G2a #6      SHHSMAVLVLLLCILVTFPSCVLSQVQIMESGPGGLVQPSSETLSLICITVSGFSLTSYNVHWVRQPPGKGLE

      80      90      100     110     120     130     140
rIgG2a BC088240.1  WMGVWMSGGNTDYNSTALKSRSLTSRDTSKNQVFLKMNSLQSEDAITTYCAREGYPIYFNWYWGQGVMTVTS
35-4 G2a #6      WMGVWMSGGNTDYNSTALKSRSLTSRDTSKNQVFLKMNSLQSEDAITTYCAREGYPIYFNWYWGQGVMTVTS

      150     160     170     180     190     200     210
rIgG2a BC088240.1  SAETTAPSVYPLAEGTALKSNMVTIGCLVKGYPPEFVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVT
35-4 G2a #6      SAETTAPSVYPLAEGTALKSNMVTIGCLVKGYPPEFVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVT

      220     230     240     250     260     270     280
rIgG2a BC088240.1  VPSSTWSSQAVTCNVVHPASSTKVDKIVRECECGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVLITLTPKVTCTVVV
35-4 G2a #6      VPSSTWSSQAVTCNVVHPASSTKVDKIVRECECGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVLITLTPKVTCTVVV

      290     300     310     320     330     340     350
rIgG2a BC088240.1  DISQNDPEVRESWFIDDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPIVHRDWLNGKTKPKCKVNSGAPPAPLEK
35-4 G2a #6      DISQNDPEVRESWFIDDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPIVHRDWLNGKTKPKCKVNSGAPPAPLEK

      360     370     380     390     400     410     420
rIgG2a BC088240.1  SLSKPECTPRGPQVYTMAPKEMTQSQVSLTCMVKGFYPPDIYTEWKMNGQPQENYKNTPTTMDTDGSY
35-4 G2a #6      SLSKPECTPRGPQVYTMAPKEMTQSQVSLTCMVKGFYPPDIYTEWKMNGQPQENYKNTPTTMDTDGSY

      430     440     450     460     470     480     490
rIgG2a BC088240.1  FLYSKLVNKKETWQQNTFTCSVLHEGLNHHHTKSLSHSEPKSQSEVAELGLKDNATYLYVHLSLCKSTQ
35-4 G2a #6      FLYSKLVNKKETWQQNTFTCSVLHEGLNHHHTKSLSHSEPKSQSEVAELGLKDNATYLYVHLSLCKSTQ

      500
rIgG2a BC088240.1  LCLGTLQKKKKKKK
35-4 G2a #6      LCLGTLQKKKKKKK

```

[10]

```

      10      20      30      40      50      60      70
Ig variable region J00529.1  -----ATGGGAAAGGAGCTCTAATGATGGCTCTCTTGGCAGCAACAGCTACAGGTTG
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                CATGGGG---GGTGTGGAGCCATGGACAGGCTTACTTCTCATTCCCTACAGCTGAGAGGGTCCCTGGATATG
6-2 IgM #54                CATGGGGACTGGTGTGCAGCCATGGACAGGCTTACTTCTCATTCCCTACAGCTGAGAGGGTCCCTGGATATG
56P-1 IgM #54              CATGGGGACTGGTGTGCAGCCATGGACAGGCTTACTTCTCATTCCCTACAGCTGAGAGGGTCCCTGGATATG

      80      90      100     110     120     130     140
Ig variable region J00529.1  TCCAGTCCAGGTCCTCAACTGACAGCAGCCCTGGGGCTGGAGCTGTGTCAGCCCTGGGGCTTCAGTCAAGCTCTTC
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                TCCCTGTCTCAGGTTACTCTGAAAGAATCTGGCCCTGGGATAATTGCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGAC
6-2 IgM #54                TCCCTGTCTCAGGTTACTCTGAAAGAATCTGGCCCTGGGATAATTGCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGAC
56P-1 IgM #54              TCCCTGTCTCAGGTTACTCTGAAAGAATCTGGCCCTGGGATAATTGCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGAC

      150     160     170     180     190     200     210
Ig variable region J00529.1  CTGGCAAGGCTTCTGGCTTACACCTTCCACAGCTTAC-----TGGATGCACTGGCTGAAGCAGAGGCTTGGAA
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                TTGCTCTTCTCTGGGTTTTCACAGCACTTATGGTATGTGTGTGGGCTGGATTCTGTCAGTCTTCAGGG
6-2 IgM #54                TTGCTCTTCTCTGGGTTTTCACAGCACTTATGGTATGTGTGTGGGCTGGATTCTGTCAGTCTTCAGGG
56P-1 IgM #54              TTGCTCTTCTCTGGGTTTTCACAGCACTTATGGTATGTGTGTGGGCTGGATTCTGTCAGTCTTCAGGG

      220     230     240     250     260     270     280
Ig variable region J00529.1  CGAGCCCTGAGTGGATGGAAGGATTTGATCCCTAATAGTGGTGGCTTCTAGTACAAATGAGAAGTTCAGAA
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                AAGGGTCTGGAGTGGCTGGCAACAATTTGGTGGAAAT---GATGATAAGTACTTACAATCCATCTCTGAAAA
6-2 IgM #54                AAGGGTCTGGAGTGGCTGGCAACAATTTGGTGGAAAT---GATGATAAGTACTTACAATCCATCTCTGAAAA
56P-1 IgM #54              AAGGGTCTGGAGTGGCTGGCAACAATTTGGTGGAAAT---GATGATAAGTACTTACAATCCATCTCTGAAAA

      290     300     310     320     330     340     350
Ig variable region J00529.1  GCAAGGCTCACACTGACCTGTGACAGCAACCTTCCAGCAGCAGCTTACATGGCAGCTTCAAGCCTGACATCTGA
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                ACCGGCTCACAATCTCCAGGACACCTCCAAACAACCAAGCATTCCTCAAGATCACCAATATGGACACTGTC
6-2 IgM #54                ACCGGCTCACAATCTCCAGGACACCTCCAAACAACCAAGCATTCCTCAAGATCACCAATATGGACACTGTC
56P-1 IgM #54              ACCGGCTCACAATCTCCAGGACACCTCCAAACAACCAAGCATTCCTCAAGATCACCAATATGGACACTGTC

      360     370     380     390     400     410     420
Ig variable region J00529.1  GGACTCTGGGCTCATATATGTTGTCAGCA---TACCAATTAAGTACAGTACTTCTTGAATACTAGG
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                AGATACTGCCACATACCTACTGCTCGGACATTTATAACAACACTACGAGGATATGTTATG---GATGCCCTGGG
6-2 IgM #54                AGATACTGCCACATACCTACTGCTCGGACATTTATAACAACACTACGAGGATATGTTATG---GATGCCCTGGG
56P-1 IgM #54              AGATACTGCCACATACCTACTGCTCGGACATTTATAACAACACTACGAGGATATGTTATG---GATGCCCTGGG

      430     440     450     460     470     480     490
Ig variable region J00529.1  GCCAAGGCACCACTCTCAGCTCTCCTCA-----CAGAGTCACTCTTCCCATAAGTCTTCCCCTCGTCTCCTG
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                GTCAAGGAGCTTCAGTCACTGCTCCTCAGAGAGTCACTCTCCCCAACCTCTTCCCCTCGTCTCCTG
6-2 IgM #54                GTCAAGGAGCTTCAGTCACTGCTCCTCAGAGAGTCACTCTCCCCAACCTCTTCCCCTCGTCTCCTG
56P-1 IgM #54              GTCAAGGAGCTTCAGTCACTGCTCCTCAGAGAGTCACTCTCCCCAACCTCTTCCCCTCGTCTCCTG

      500     510     520     530     540     550     560
Ig variable region J00529.1  -----CGAGAGCCCCCTGTCTGATGAGAAATCTGGTGGCCATGGGCTGGCTTGCCTCCCGGAGCTTCCCTGCCAGCACC
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                CGAGAGCCCCCTGTCTGATGAGAAATTTGGTGGCCATGGGCTGGCTTGCCTCCCGGAGCTTCCCTGCCAGCACC
6-2 IgM #54                CGAGAGCCCCCTGTCTGATGAGAAATTTGGTGGCCATGGGCTGGCTTGCCTCCCGGAGCTTCCCTGCCAGCACC
56P-1 IgM #54              CGAGAGCCCCCTGTCTGATGAGAAATTTGGTGGCCATGGGCTGGCTTGCCTCCCGGAGCTTCCCTGCCAGCACC

      570     580
Ig variable region J00529.1  -----
IgM constant region V00827.1  ~~~~~
6-1 IgM #35                ATTTCCCTTCACTTGGAACTTACC
6-2 IgM #54                ATTTCCCTTCACTTGGAACTTACC
56P-1 IgM #54              ATTTCCCTTCACTTGGAACTTACC

```

[11]

```

      10      20      30      40      50      60      70
mIgM constant region -----
mIgM variable region -----MGWSCIMLEFAAATATGVHSQVQLQQPQAFIVKPGASVKLSCKASGVTFTSM--WMMWVLRQRFERG
56P-1 IgM #78 DWCAAMDRLTSSPELLLMVPAVVLSQVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTYGMCVGWLRQSSGKG
6-1 IgM #35 G-CAAMDRLTSSPELLLMVPAVVLSQVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTYGMCVGWLRQSSGKG
6-2 IgM #54 DWCAAMDRLTSSPELLLMVPAVVLSQVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTYGMCVGWLRQSSGKG

      80      90      100     110     120     130     140
mIgM constant region -----
mIgM variable region -----MEWVGRIDPNSGGTRVNEKFKSRATITVDKPSSTAVYQLSSITSEPSAVVYCARNDYYGSSY-EDVWGQG
56P-1 IgM #78 LEWLANLWVNDL-KYYNPSLKNRLTISKDLSNNQAFILKLTNMDTADTATYYCAR----GDNWELIGYWGQG
6-1 IgM #35 LEWLANLWVNDL-KYYNPSLKNRLTISKDLSNNQAFILKLTNMDTADTATYYCARTEITTRVYVMDVWGQG
6-2 IgM #54 LEWLANLWVNDL-KYYNPSLKNRLTISKDLSNNQAFILKLTNMDTADTATYYCARTEITTRVYVMDVWGQG

      150     160     170     180     190     200     210
mIgM constant region -----ESQSPENVFPPLVSCESPLSDENLVAMGCLARDELPSGISFTWNYQNNTEVIOGIRTEPTLRTG
mIgM variable region -----TITVSS-----
56P-1 IgM #78 VMVTVSSESQSSPTVFPPLVSCESPLSDENLVAMGCLARDELPSGISFTWNYQ
6-1 IgM #35 ASVTVSSESQSSPTVFPPLVSCESPLSDENLVAMGCLARDELPSGISFTWNYQ
6-2 IgM #54 ASVTVSSESQSSPTVFPPLVSCESPLSDENLVAMGCLARDELPSGISFTWNYQ

      220     230     240     250
mIgM constant region -----GKYLATSQVLLSFKSILLEGSDRYLVCKLHYGGKNRDLHVPLP
mIgM variable region -----
56P-1 IgM #78
6-1 IgM #35
6-2 IgM #54

```



10 20 30 40 50 60 70
 Ig Kappa BC088255.1 -----CACACACAGCATGGGCTTCGCCACTCAGCTCCGGGGTTGTT
 35-4 Kappa #6 ACATGGGGAGCCTCAACAGATCACA---CACAGCATGGGCTTCGCCACTCAGCTCCGGGGTTGTT
 6-1 Kappa #48 ACATGGGGGAATTGCATAAAGCAAGCAAGGGCCATCAGATGGAGTCAATAACTCGGCTCCATATTCCT
 6-2 Kappa #57 ACATGGGGGAATCATCTCTCTCTCCACAGCTTCAGAGATGGAGCACACACACACTCCTCTATGGGTGCT
 56P-1 Kappa #89 ACATGGGGATCCTCAAGATTCACA---GGCAGCAGATGTTGGCA---GCCACTCCACCTCCCTCT

80 90 100 110 120 130 140
 Ig Kappa BC088255.1 GCTGCTCTGGAATTACAGATGCCATATGTGACATCCAGATGACACAGCTCCAGCTCCCGTCTGCAATCT
 35-4 Kappa #6 GCTGCTCTGGAATTACAGATGCCATATGTGACATCCAGATGACACAGCTCCAGCTCCCGTCTGCAATCT
 6-1 Kappa #48 GCTGCTCTGGAATTGCTGGAATGCAATGCAACTGATGACTCAGTCTCCAGCTCCCGTCTGCAATCT
 6-2 Kappa #57 GCTGCTCTGGAATTGCAAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCCGTCTGCAATCTGCTGCTGCTCTCT
 56P-1 Kappa #89 TCTCCTATGTTATCAGATCTCCAGTGGGCAATCATCTCTACCCAGCAGCAGTCCCTTGGATTTCT

150 160 170 180 190 200 210
 Ig Kappa BC088255.1 CTGGAGAACTGTCTCCATCCATGTTCTAGCAAGTGAAGGCAATTTCC---CAATGATTTAGCC-----
 35-4 Kappa #6 CTGGAGAACTGTCTCCATCCATGTTCTAGCAAGTGAAGGCAATTTCC---CAATGATTTAGCC-----
 6-1 Kappa #48 CTGGAGAACTGTCTCCATCCATGTTCTAGCAAGTGAAGGCAATTTCC---CAATGATTTAGCC-----
 6-2 Kappa #57 CTGGAGAACTGTCTCCATCCATGTTCTAGCAAGTGAAGGCAATTTCC---CAATGATTTAGCC-----
 56P-1 Kappa #89 CTGGAGAACTGTCTCCATCCATGTTCTAGCAAGTGAAGGCAATTTCC---CAATGATTTAGCC-----

220 230 240 250 260 270 280
 Ig Kappa BC088255.1 -----TGGTATCAGCAGAACTCAGGCAAACTCCCTCAGCTCCCATCTATCTGCAAGTGTGTGCAAGA
 35-4 Kappa #6 -----TGGTATCAGCAGAACTCAGGCAAACTCCCTCAGCTCCCATCTATCTGCAAGTGTGTGCAAGA
 6-1 Kappa #48 -----TGGTATCAGCAGAACTCAGGCAAACTCCCTCAGCTCCCATCTATCTGCAAGTGTGTGCAAGA
 6-2 Kappa #57 -----TGGTATCAGCAGAACTCAGGCAAACTCCCTCAGCTCCCATCTATCTGCAAGTGTGTGCAAGA
 56P-1 Kappa #89 -----TGGTATCAGCAGAACTCAGGCAAACTCCCTCAGCTCCCATCTATCTGCAAGTGTGTGCAAGA

290 300 310 320 330 340 350
 Ig Kappa BC088255.1 CGGGTCCCAATCAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACAGGTAATCTCTCAACATCAGGCGCATGCCAA
 35-4 Kappa #6 CGGGTCCCAATCAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACAGGTAATCTCTCAACATCAGGCGCATGCCAA
 6-1 Kappa #48 CGGGTCCCAATCAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACAGGTAATCTCTCAACATCAGGCGCATGCCAA
 6-2 Kappa #57 CGGGTCCCAATCAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACAGGTAATCTCTCAACATCAGGCGCATGCCAA
 56P-1 Kappa #89 CGGGTCCCAATCAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACAGGTAATCTCTCAACATCAGGCGCATGCCAA

360 370 380 390 400 410 420
 Ig Kappa BC088255.1 CCTGAAGATGAAGCAGATTTATTTCTGTCAACAGAGTTACAAGTATCCGTACAGTTTGGAGCTGGGACCA
 35-4 Kappa #6 CCTGAAGATGAAGCAGATTTATTTCTGTCAACAGAGTTACAAGTATCCGTACAGTTTGGAGCTGGGACCA
 6-1 Kappa #48 CCTGAAGATGAAGCAGATTTATTTCTGTCAACAGAGTTACAAGTATCCGTACAGTTTGGAGCTGGGACCA
 6-2 Kappa #57 CCTGAAGATGAAGCAGATTTATTTCTGTCAACAGAGTTACAAGTATCCGTACAGTTTGGAGCTGGGACCA
 56P-1 Kappa #89 CCTGAAGATGAAGCAGATTTATTTCTGTCAACAGAGTTACAAGTATCCGTACAGTTTGGAGCTGGGACCA

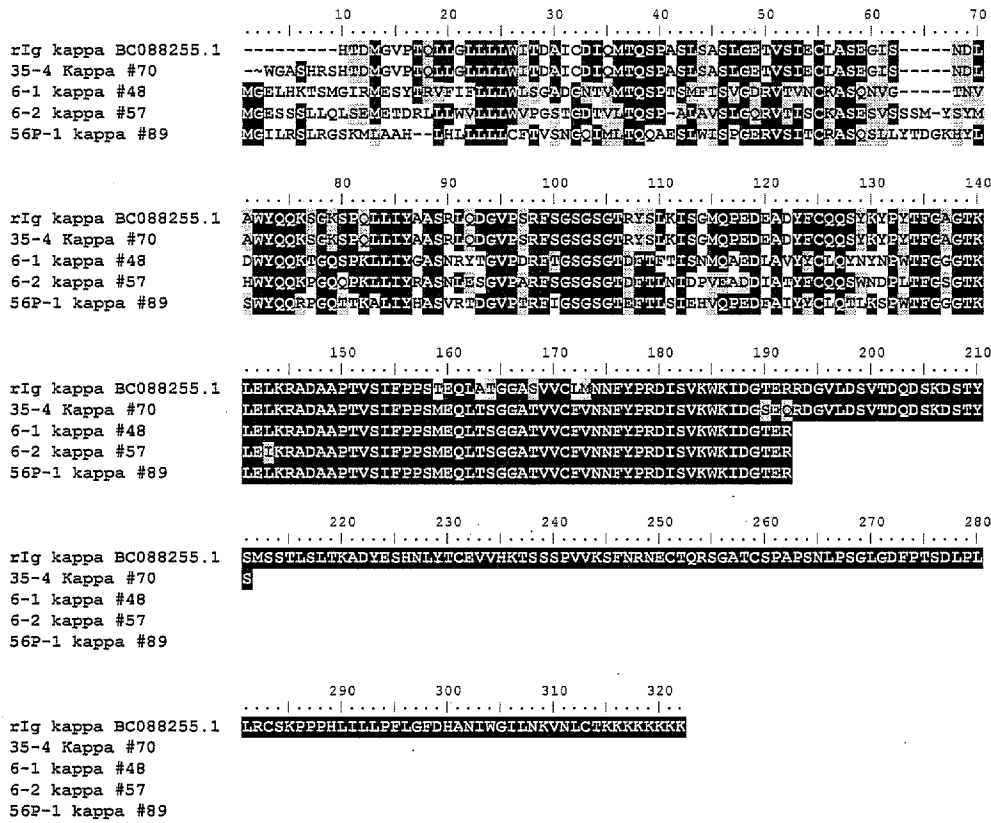
430 440 450 460 470 480 490
 Ig Kappa BC088255.1 AGCTGGAACTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCTATCTCCACCAATCCATGGAACAGTTAAC
 35-4 Kappa #6 AGCTGGAACTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCTATCTCCACCAATCCATGGAACAGTTAAC
 6-1 Kappa #48 AGCTGGAACTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCTATCTCCACCAATCCATGGAACAGTTAAC
 6-2 Kappa #57 AGCTGGAACTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCTATCTCCACCAATCCATGGAACAGTTAAC
 56P-1 Kappa #89 AGCTGGAACTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCTATCTCCACCAATCCATGGAACAGTTAAC

500 510 520 530 540 550 560
 Ig Kappa BC088255.1 AACTGGAGGTGCCACAGTGGTGTGCCATGACAACTTCATCCAGAGACATCAGTGTCAAGTGGAAAG
 35-4 Kappa #6 AACTGGAGGTGCCACAGTGGTGTGCCATGACAACTTCATCCAGAGACATCAGTGTCAAGTGGAAAG
 6-1 Kappa #48 AACTGGAGGTGCCACAGTGGTGTGCCATGACAACTTCATCCAGAGACATCAGTGTCAAGTGGAAAG
 6-2 Kappa #57 AACTGGAGGTGCCACAGTGGTGTGCCATGACAACTTCATCCAGAGACATCAGTGTCAAGTGGAAAG
 56P-1 Kappa #89 AACTGGAGGTGCCACAGTGGTGTGCCATGACAACTTCATCCAGAGACATCAGTGTCAAGTGGAAAG

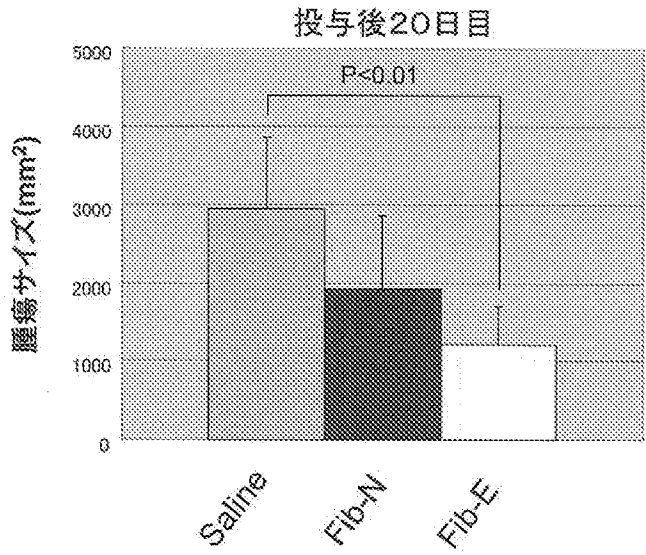
570 580 590 600 610 620 630
 Ig Kappa BC088255.1 ATTGATGGCACTGAACGACGAGATGGTGTCTCCGGACAGTGTACTGATCAGGACAGCAAAACAGCAGCAGT
 35-4 Kappa #6 ATTGATGGCACTGAACGACGAGATGGTGTCTCCGGACAGTGTACTGATCAGGACAGCAAAACAGCAGCAGT
 6-1 Kappa #48 ATTGATGGCACTGAACGACGAGATGGTGTCTCCGGACAGTGTACTGATCAGGACAGCAAAACAGCAGCAGT
 6-2 Kappa #57 ATTGATGGCACTGAACGACGAGATGGTGTCTCCGGACAGTGTACTGATCAGGACAGCAAAACAGCAGCAGT
 56P-1 Kappa #89 ATTGATGGCACTGAACGACGAGATGGTGTCTCCGGACAGTGTACTGATCAGGACAGCAAAACAGCAGCAGT

640 650 660 670 680 690 700
 Ig Kappa BC088255.1 ACAGCATCAGCAGCACCCCTCTGTTGACCAAGGCTGACTATGAAAGTCATAACCTCTATACCTGTGAGGGT
 35-4 Kappa #6 ACAGCATCAGCAGCACCCCTCTGTTGACCAAGGCTGACTATGAAAGTCATAACCTCTATACCTGTGAGGGT
 6-1 Kappa #48 -----
 6-2 Kappa #57 -----
 56P-1 Kappa #89 -----

[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/395(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i,
A61K45/00(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48
(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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)

A61K39/395, A61K9/127, A61K31/4745, A61K45/00, A61K45/06, A61K47/42,
A61K47/48, A61P35/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS (JDREAMII), JMEDPLUS (JDREAMII),
JST7580 (JDREAMII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/069709 A1 (JCL BIOASSAY CORP.), 21 June 2007 (21.06.2007),	1-4, 6, 7, 10-13, 16, 17
Y	entire text; particularly, claim 7; page 8, lines 20 to 44; examples; page 5, lines 19, 20; page 6, lines 5 to 9 & JP 2008-110975 A & JP 4113567 B2 & EP 1962094 A1	1-13, 16, 17
X	KASPAR, M. et al, Fibronectin as target for tumor therapy, Int J Cancer, 2006, vol.118, no.6, pages 1331 to 1339, entire text,	1-4, 6, 10-13, 16, 17
Y	particularly, Abstract, page 1333, left column, 4th paragraph to page 1336, left column, 3rd paragraph, fig. 3, page 1331, left column, 11 to 14 lines from the bottom	1-13, 16, 17

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
17 December, 2009 (17.12.09)

Date of mailing of the international search report
28 December, 2009 (28.12.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069509

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IMAMURA, T. et al, Immunohistochemical staining for type IV collagen and laminin in the stroma of human pancreatic cancer, Int J Pancreatol, 1995, Vol.18, No.2, p.95-99, entire text, particularly, Abstract, page 95, lower right column, the last paragraph	1-13,16,17
Y	WO 2007/112193 A2 (IMMUNOMEDICS INC.), 04 October 2007 (04.10.2007), entire text; particularly, claims & US 2006/193865 A1 & EP 1874824 A2 & WO 2006/107617 A3 & EP 1994057 A2 & JP 2008-538747 A & JP 2009-531325 A	1-13,16,17
Y	WO 2007/038658 A2 (MEDAREX INC.), 05 April 2007 (05.04.2007), entire text; particularly, claims; page 117, line 16 to page 118, line 24 & EP 1940470 A2 & US 2008/279868 A1 & JP 2009-509977 A	1-13,16,17
Y	JP 2005-510246 A (CELL MATRIX INC.), 21 April 2005 (21.04.2005), entire text; particularly, claims; paragraphs [0002] to [0011], [0126] to [0131] & WO 2003/046204 A2 & US 2003/099655 A1 & EP 1478764 A2 & US 2007/077199 A1 & US 2008/050388 A1 & US 7365167 B2 & US 7390885 B2 & US 2008/233133 A1 & US 2008/260733 A1 & US 7566770 B2	1-13,16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069509

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.: 14, 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14 and 15 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

The inventions of claims 1-4, 6, 7, 10-13, 16 and 17 are disclosed in any one of Documents 1 and 2 shown below, and are not novel. Therefore, these inventions have no special technical feature.

Document 1: WO 2007/069709 A1 (JCL BIOASSAY CORP.) 21 June 2007 (21.06.2007)

Document 2: KASPAR, M. et al, Fibronectin as target for tumor therapy, Int J Cancer, 2006, vol.118, no.6, p.1331-1339

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069509

<Subject of search>

It is considered that the term "a substance capable of binding specifically to a constituent factor of a stroma" recited in claim 1 includes a wide variety of chemical substances.

However, among the substances, only antibodies each capable of binding specifically to a constituent factor of a stroma are disclosed in the meaning within PCT Article 5, and it does not appear that chemical substances other than the antibodies are specifically supported by the description.

Therefore, the inventions of claims 1-5, 7-13, 16 and 17 are not fully supported in the meaning within PCT Article 6. Such being the case, a complex containing "an antibody capable of binding specifically to a constituent factor of a stroma" as described in claim 6 was searched.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/395(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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. A61K39/395, A61K9/127, A61K31/4745, A61K45/00, A61K45/06, A61K47/42, A61K47/48, 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	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009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), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

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	WO 2007/069709 A1 (JCL BIOASSAY CORP) 2007.06.21, 全文、特に、請求項7、8頁20-44行、実施例、	1-4, 6, 7, 10-13, 16, 17
Y	5頁19, 20行、6頁5-9行 & JP 2008-110975 A & JP 4113567 B2 & EP 1962094 A1	1-13, 16, 17
X	KASPAR, M. et al, Fibronectin as target for tumor therapy, Int J Cancer, 2006, Vol.118, No.6, p.1331-1339	1-4, 6, 10-13, 16, 17
Y	全文、特に、Abstract, 1333頁左欄4段落~1336頁左欄3段落, Fig 3、1331頁左欄最下行から11-14行	1-13, 16, 17

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、一般的な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

17. 12. 2009

国際調査報告の発送日

28. 12. 2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 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)

安藤 倫世

4 P

3842

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

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 請求項の番号
Y	IMAMURA, T. et al, Immunohistochemical staining for type IV collagen and laminin in the stroma of human pancreatic cancer, Int J Pancreatol, 1995, Vol.18, No.2, p.95-99 全文、特に、Abstract、95 頁右下欄最終段落	1-13, 16, 17
Y	WO 2007/112193 A2 (IMMUNOMEDICS INC) 2007.10.04, 全文、特に、Claims & US 2006/193865 A1 & EP 1874824 A2 & WO 2006/107617 A3 & EP 1994057 A2 & JP 2008-538747 A & JP 2009-531325 A	1-13, 16, 17
Y	WO 2007/038658 A2 (MEDAREX INC) 2007.04.05, 全文、特に、Claims, 117 頁 16 行~118 頁 24 行 & EP 1940470 A2 & US 2008/279868 A1 & JP 2009-509977 A	1-13, 16, 17
Y	JP 2005-510246 A (CELL MATRIX INC) 2005.04.21, 全文、特に、特許請求の範囲、段落[0002]~[0011]、[0126]~[0131] & WO 2003/046204 A2 & US 2003/099655 A1 & EP 1478764 A2 & US 2007/077199 A1 & US 2008/050388 A1 & US 7365167 B2 & US 7390885 B2 & US 2008/233133 A1 & US 2008/260733 A1 & US 7566770 B2	1-13, 16, 17

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 14, 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項14, 15は「治療による人体の処置方法に関するもの」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1-4, 6, 7, 10-13, 16, 17に係る発明は、以下の文献1, 2のいずれかに記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

文献1 : WO 2007/069709 A1 (JCL BIOASSAY CORP) 2007.06.21

文献2 : KASPAR, M. et al, Fibronectin as target for tumor therapy, Int J Cancer, 2006, Vol. 118, No. 6, p. 1331-1339

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

<調査の範囲について>

請求項1に記載されている「間質の構成因子に対して特異的結合能を有する物質」との語には、広範な化学物質が包含されるものと認められる。

しかしながら、当該物質のうち、PCT第5条の意味において開示されているのは、間質の構成因子に対して特異的結合能を有する抗体のみであり、それ以外の化学物質については、明細書に具体的に裏付けられているとはいえない。

したがって、請求項1-5, 7-13, 16, 17に係る発明は、PCT第6条の意味において十分な裏付けを欠いているから、調査は、請求項6に記載されている「間質の構成因子に対して特異的結合能を有する抗体」を含有する複合体について行った。