

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 31/70, 33/24, 31/28 A61K 31/555	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/05299 (43) 国際公開日 1994年3月17日 (17.03.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01250 (22) 国際出願日 1993年9月3日 (03. 09. 93) (30) 優先権データ 特願平4/263243 1992年9月4日 (04. 09. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 富士化学工業株式会社 (FUJI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒930-03 富山県中新川郡上市町横法音寺55番地 Toyama, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 川端裕徳 (KAWABATA, Hironori) [JP/JP] 〒930-03 富山県中新川郡上市町湯崎野360番地 Toyama, (JP) 森口幸栄 (MORIGUCHI, Koei) [JP/JP] 〒930-03 富山県中新川郡上市町湯上野39-14番地 Toyama, (JP) 速藤 武 (ENDO, Takeshi) [JP/JP] 〒930-03 富山県中新川郡上市町広野1778-5番地 Toyama, (JP) (74) 代理人 弁理士 南 孝夫 (MINAMI, Takao) 〒102 東京都千代田区麹町3丁目2番地 相互第一ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, NL, SE) .		添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : MEDICINAL COMPOSITION (54) 発明の名称 医薬用組成物 (57) Abstract A medicinal composition for use in relieving nephrotoxicity caused by the administered drug, which contains S-adenosyl-L-methionine or a salt thereof as the active ingredient; and a medicinal composition for use in potentiating the antitumor activity of platinum complex compounds, which contains S-adenosyl-L-methionine as the active ingredient.		

(57) 要約

生体内に投与された薬剤による腎毒性を軽減するための腎毒性軽減剤として使用する医薬用組成物であって、S-アデノシル-L-メチオニン、もしくは、その塩類を有効成分として含有する。また、白金錯体化合物による抗腫瘍活性を増強する薬剤として使用する医薬用組成物であって、S-アデノシル-L-メチオニンを有効成分として含有する。

情報としての用途のみ

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

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

明 細 書

医 薬 用 組 成 物

【産業上の利用分野】

5 本発明は、S－アデノシル－L－メチオニン類またはその塩類を有効成分とする医薬用組成物に関する。

 さらに詳しく言えば、本発明は、生体内に投与された薬剤により引き起こされる腎毒性を軽減し得るS－アデノシル－L－メチオニンもしくはその塩類（以下SAmEと
10 記す）を有効成分とする腎毒性軽減剤として使用する医薬用組成物に関するものであり、さらにまた、白金錯体化合物による抗腫瘍活性を増強し得るSAmEを有効成分とする抗腫瘍効果増強剤として使用する医薬用組成物に関する。

15 【背景技術】

 最近各種悪性腫瘍に対し種々の薬剤が使用されている。中でもシスプラチン（シス－ジアミン－ジクロロプラチナム：CDDP）は、延命が期待できる優れた薬物であり、特に睾丸腫瘍、膀胱癌、尿管腫瘍および卵巣癌の治療に
20 において顕著な延命効果が示されている。しかしながらCDDPは優れた抗腫瘍作用を有する反面、重篤な毒性をも現わすものであり、中でも腎毒性が用量規制因子とされている。この毒性を軽減するためにCDDPを投与する場合に利尿剤を併用する方法やハイドレーション（hydra-
25 tion）等が行われてはいるが、これらによる毒性軽減効

果は、患者によっては十分なものではない。特にCDDPが
くり返し投与される場合には、その蓄積毒性が大きくな
り、腎毒性の発現した患者によっては用量を減らしたり、
或は他の薬剤に変更を余儀なくされ、その結果として延
5 命の可能性が失われることになる。他の例で言えば、卵
巣癌の治療において、CDDPの用量を増やしできるだけ休
薬期間を短くしてドーズ・インテンシティ(dose inten-
sity)を高めるという治療法においても腎毒性は大きな
問題とされている。このような問題に対し、従来、CDDP
10 の腎毒性を軽減し得る化合物を探索する試みが多くなさ
れ、例えばチオ硫酸ナトリウム、アセタゾラミド、二酸
化セレン、セレン酸ナトリウム、システイン、3-アミ
ノベンズアミド、ホスホマイシン或いは次硝酸ビスマス
等が腎毒性を軽減する作用を示すことが報告されている
15 が、これらの化合物は現在臨床上実用化されるまでには
至っていない。また近年、グルタチオンがイタリアで許
可され、アミホスチン(amifostin)がアメリカにおいて
申請され、ウリナスチンが日本において臨床研究がな
されている等、腎毒性軽減作用を有する薬剤の開発が行
20 われている。

一方、CDDPの投与に際し、腎毒性などの副作用を抑え
るために、前述の毒性軽減剤等を併用するとCDDPそのも
の抗腫瘍活性が抑制されることが知られている。この
ため抗腫瘍作用を低下させることなく効果の増強を図る
25 ことがこの分野での技術的課題とされている。

【発明の目的】

本発明は生体内に投与された薬剤により引き起こされる腎毒性を軽減するための薬剤として使用する医薬用組成物であって、S-アデノシル-L-メチオニン（以下、
5 SAMEと記す）を有効成分とする腎毒性の軽減剤として使用される組成物を提供し、さらに、白金錯体化合物による薬剤の抗腫瘍効果を増強し得るSAMEを有効成分とする抗腫瘍効果増強剤として使用される医薬用組成物を提供することを目的とするものである。

10 【発明の開示】

本発明者らは、上記の目的を達成するために、生体内で生成されるグルタチオン等のSH化合物が生体内の活性酸素や化学的に反応性のある毒物と反応することにより無毒化することに着目し、SAMEについて鋭意研究した結果
15 本発明により、その目的が達成し得ることを見出した。

SAMEはあらゆる生物の細胞中に存在し、生体内でメチル基の供与体として多くの重要な生体内反応に関与している化合物であることが知られている。しかしながら
20 SAMEは非常に不安定な化合物であり、その薬理効果を調べるために純粋に大量に得ることは困難であったが、近年（1980年代）SAMEがその安定な塩として取り出されるようになり、SAMEについての各種薬理作用またはその生化学的挙動の研究を行うことが容易になった。この安定
25 なSAMEの塩を用いる種々の薬理効果の探索の結果、肝障

害、うつ病、骨関節症に対し（特公昭56-10920号公報参照）、急性期の脳障害に対し（特公平2-7293号公報参照）、パーキンソン病またはエイズの免疫能低下に対し効果を発現すること、あるいは、ある種の癌細胞に対し細胞毒性を示すこと等が報告され、肝障害、うつ病、骨関節症に対しては既にイタリア、ドイツ等では医薬品として臨床の場に供されている。

本発明者らは、上記SAmEにつき、更に新しい薬効を発見すべくSAmEの投与後の吸収分布代謝排泄を検討したところ、驚くべきことにSAmEは静脈内投与後、特異的に腎組織に集まり、そこで速やかにトランスメチレーションのプロセスを経て、S-アデノシルホモシステイン（以下、SAHと記す）に変換された後、ホモシステイン、システイン、グルタチオン等のSH化合物に変換されることを見出した。しかもこれらのSH化合物の血中濃度はSAmE投与後上昇することはなかった。

本発明者らは、さらに研究を重ねたところ、SAmEがセファロリジン等の抗生物質、免疫抑制剤であるサイクロスポリン等により引き起こされる腎組織障害の改善作用を有することを見出した。

さらにまた、本発明者らはSAmEがCDDPの抗腫瘍作用を減弱することなく、腫瘍の種類に応じては著しく抗腫瘍効果を増強する作用を示すことを見出した。

すなわち、本発明は生体内に投与された薬剤による腎毒性を軽減するための腎毒性軽減剤であって、S-アデ

ノシルーLーメチオニン、もしくは、その塩類を有効成分とすることを特徴とする腎毒性軽減剤および前記の生体内に投与された薬剤がシスプラチンである腎毒性軽減剤を提供するものである。

- 5 SAmEは、ラットを用いた急性毒性試験によれば、そのLD₅₀値（腹腔内投与）は、2,000～2,500mg/kgであって、極めて安全な化合物であることが知られている。

 SAmE類は公知の化合物でありこれらは公知の方法に従ってあるいは公知の常用手段に準じて製造することができる。

10

 SAmEは、分子内にスルホニウム陽イオンが存在するため、常にアニオンとの塩の形態で存在すると同時に、その分子内にアミノ基または塩基性のN原子を有しているためそれらの部分についても各種の塩が形成された状態で存在する。

15

 従って、本発明の薬剤の形態としては、通常、SAmEをそのまま用いるか、または、SAmEを有効成分として含む組成物の形態で使用される。

 本発明の薬剤において用いることができるSAmEの安定な塩の例としては、硫酸、塩酸、p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、コンドロイチン硫酸または一般式、 $\text{HO}_3\text{S}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ （式中、mは2～12）で表されるジスルホン酸等の塩類、あるいはこれらの一種または二種以上からなる複合塩類などが挙げられる。

20

25

上記のジスルホン酸の例としては、例えば1,2-エタ
ンジスルホン酸、1,3-プロパンジスルホン酸、1,4-ブ
タンジスルホン酸、1,5-ペンタンジスルホン酸、1,6-
ヘキサンジスルホン酸、1,8-オクタンジスルホン酸ま
5 たは1,10-デカンジスルホン酸等を挙げることができる。

上記複合塩の具体例としては、硫酸トシル酸アデノシ
ル-L-メチオニン (SAmE、硫酸、p-トルエンスルホ
ン酸のモル比が1:2:1)などを挙げることができる。
10

上述の白金錯体化合物類とは、シスプラチン (シス-
ジアミン-ジクロロプラチナ; CDDP)、カルボプラチ
ン、ジクロロ-エチレンジアミン-プラチナ (II)、1,2-
ジアミノ-サイクロヘキシル-プラチナ (II)-マロ
15 ネートまたはサルフェート、ジイソプロピルアミノ-ト
ランス-ジヒドロキシーシス-ジクロロ-プラチナ (IV)、
(-)-(R)-2-アミノメチルピロリジン (1,1-シ
クロブタンジカルボキシレート) プラチナ (II)-モノ
20 ハイドレート、シス-ジアミングリコレートプラチナな
どを挙げることができる。

本発明の抗腫瘍効果増強剤においては、その薬剤中に
白金錯体化合物類を含有させておくことができる。その
使用量は、該抗腫瘍剤の種類により異なり特定はされな
いが実際の臨床用量および基礎的効力実験から1日当
25 り通常0.5~50mg/kgとするのが好ましい。

本発明の腎毒性減剤あるいは抗腫瘍効果増強剤においては、抗腫瘍薬剤としての白金錯体化合物類を含有させておくことができ、その際、その化合物とSAmE類との使用割合は白金錯体化合物の種類およびSAmE類に応じて異なるが、一般的には前者1モルに対して後者を0.02～150倍モル、好ましくは10～100倍モル用いるのがよい。

また、SAmEの使用量は、その種類と投与方法によって異なるが、たとえば、SAmE、硫酸、p-トルエンスルホン酸のモル比が1:2:1のものをを用いる場合には、SAmEとして1日当たり100～2,000mgの範囲が好ましい。

本発明の薬剤においては、前記SAmEを常法に従って各種の投与単位形態に製剤したものと各種投与単位形態に製剤した白金錯体化合物類を含む抗腫瘍活性薬剤とを、同時にあるいは別々にあるいは引き続いて使用することができる。そのために、これらの組み合わせによる配合剤の形態としておくことができる。SAmEを先に投与した後、白金錯体化合物類を投与してもよく、あるいは、その逆に白金錯体化合物類を先に投与した後、SAmEを投与してもよい。投与の順序には特に制限はない。

本発明の薬剤の剤形としては、治療目的に応じて各種の形態を選択することができる。たとえば、経口剤としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤または腸溶性製剤等、あるいは非経口用剤としては、注射剤、坐剤等を挙げることができる。上記の各剤形の製剤は、常法に従って製造される。

たとえば、注射用薬剤としては注射用粉末製剤の形態とするためには、適当な水溶性賦形剤、たとえば、マンニトール、蔗糖、乳糖、マルトース、ブドウ糖およびフルクトースなどの一種または二種以上を使用して水溶液とし、バイアルまたはアンプルに注入したのち凍結乾燥し、密封して製剤とすることができる。

上記の注射用粉末製剤は、一般的には、使用に際して、各種塩基物質を用いて、たとえば、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等、またはこれらの重炭酸塩、炭酸塩等を用いてpHを7付近に調整して用いることができる。

経口用製剤の例としては、たとえば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤または腸溶性の製剤等をあげることができる。

腸溶性の製剤としては、マンニトール、蔗糖、乳糖、マルトース、デンプン、リン酸カルシウムなどの賦形剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴムなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤などを適宜選択して用いて、常法により、錠剤、顆粒剤、細粒剤などの形態に調製したのち、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリビニルアルコールフタレート、スチレン・マレイン酸共重合体、スチレン・無水マレイン酸共重合体、アクリル酸メチル・メタクリル酸共重合体、メタクリル酸メチル・メタクリル酸共重

合体などの腸溶性基剤の一種または二種以上を用いてコーティングを行うことにより製造することができる。

また、さらに上記の如き腸溶性の顆粒剤または細粒剤をカプセルに充填しカプセル剤とすることもできる。

- 5 カプセル剤に対し、腸溶性基剤でコーティングを施し、あるいは、前記の腸溶性基剤単独またはこれにゼラチンを混合して調製したカプセルを用いて腸溶性カプセル剤とすることも可能である。

10 坐剤の例としては、たとえばカカオ脂肪酸トリグリセライドに脂肪酸モノグリセライド、脂肪酸ジグリセライドを種々の割合で混合した坐剤基剤(半合成グリセリド)などの親油性基剤とポリエチレングリコール、グリセロゼラチンなどの親水性基剤とを加温溶解したものを用いて均一に混和し、型に入れて成形したものがあげられ
15 る。

以下に、本発明の薬剤の実施例を記載する。

【実施例】

実施例 1

20 SAmE、硫酸、P-トルエンスルホン酸のモル比が1 : 2 : 1であるSAmEの複合塩384 gとマンニトール240 gとを注射用蒸留水を用いて全量3,000mlの水溶液とする。
これをミリポアフィルター(0.22ミクロン)を用いて無菌ろ過し、容量5 mlのバイアルに1.5 mlずつ分注したのち、凍結乾燥し、直ちに密栓して注射用粉末製剤を調製
25 した。

実施例 2

実施例 1 と同じSAmEの複合塩 576 g とマンニトール 360 g とを含有する粉末 936 g に注射用蒸留水を加えて全量 2,250 ml の水溶液とする。これをミリポアフィルター (0.22ミクロン)を用いて無菌ろ過し、容量 15ml のバイアルに 4.5 ml ずつ分注したのち、凍結乾燥し、直ちに密栓することにより注射用粉末製剤を調製した。

実施例 3

実施例 1 と同じSAmEの複合塩 576 g、マンニトール 114 g、トウモロコシデンプン 150 g、ステアリン酸マグネシウム 10 g を均一に混和し、常法により顆粒を調製した。別に、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート 108 g、セラック 28 g およびグリセリン脂肪酸エステル 14 g を、塩化メチレン 462 g、イソプロピルアルコール 922 g、水 462 g の混液中に分散させておき、この分散液を用いて先に得た上記の顆粒をコーティングしたのち、得られたコーティング物 500 mg ずつを 1 カプセル中に充填しカプセル剤を調製した。

実施例 4

実施例 1 と同じSAmEの複合塩 576 g を脂肪酸のトリグリセライドを主成分とする坐剤基剤、1,424 g 中に加えて、均一に分散させた後、1 個当たり 2.0 g の坐剤を調製した。

以下に、本発明の薬剤と白金錯体化合物類を併用した場合の副作用の軽減および／または抗腫瘍効果の増強作

用について述べる。

以下の例中、CDDPとしては、シスプラチン注射液（ブリプラチン注^(R)、ブリストルマイヤー社製）を使用し、SAmEとしては、前記実施例1で調製した注射用粉末製剤
5 につき、4N-水酸化ナトリウムを用いて、そのpHを7に調整して用いた。

本発明の薬剤を静脈内投与した後、SAmEが特異的に腎組織に集まること、そして、ホモシステイン、システイン、グルタチオン等のSH化合物の血中（血漿）における
10 濃度はSAmE投与後上昇しないことが下記の実験により確認された。試験方法：SD系のラット（6週令）にSAmEの生理食塩液（30mg/kg, pH6）を静脈内投与し、30、60、120分後に血液、腎組織中のSH基を有する化合物の濃度を測定する〔ジャーナル オブ ファルマコロジカル イク
15 スペリメンタル セラピー（J. Pharmacol. Exp. Ther.）、N. Kaplowits等、1977、200、279～286）〕。

試験結果を下記表に示す。

20

25

表 1

投与後の血漿または腎組織中のSH化合物の濃度				
濃度 (グルタチオン換算量) $\pm$ SD				
	0分	30分	60分	120分
腎組織 ¹⁾	1029.1 $\pm$ 58.6	1219.3 $\pm$ 68.3*	1256.0 $\pm$ 125.3*	1201.1 $\pm$ 37.8*
血漿 ²⁾	14.2 $\pm$ 3.2	12.2 $\pm$ 2.7	12.5 $\pm$ 2.1	18.5 $\pm$ 3.0

表中の腎組織および血漿中のSH化合物の濃度はすべてのSH化合物がグルタチオンであるとして計算し、平均値 $\pm$ 標準偏差で表したものである。

1) μ g/臓器 (g)

2) μ g/血漿 (ml)

*: $P < 0.05$ (SAME投与前値に対し)

次に、SAMEによるCDDPの腎毒性の軽減作用を測定した試験について述べる。

試験例 1

(SAMEによるCDDPの腎毒性の軽減作用)

CDF1マウス (雄性; 体重25.0~27.6g) を一群4匹とし、4群に対し、CDDPと前記実施例1で得られたSAMEの複合塩とを表2中に示した各用量 (以下、SAMEの用量はSAME複合塩中に含まれるSAME含量で表示する。) で第1群と第2群の各マウスに腹腔内に投与し、6日後に採血し、血清尿素窒素(BUN) およびクレアチニン量を測定した。対比のために第3群にはCDDPを単独投与し、第4群には、生理食塩水のみを投与し対照群とした。その結果を下記表に示す。

表 2

群 番 号	被 検 薬	用 量 (mg/kg)	クレアチニン 濃度(mg/dl)	BUN濃度 (mg/dl)
1	CDDP	12	0.33±0.05	25.8± 7.2
	SAMe	100		
2	CDDP	12	0.43±0.17	34.2± 9.6
	SAMe	30		
3	CDDP	12	0.70±0.08	54.0±16.7
4	対照群	—	0.25±0.10	17.0± 0.67

クレアチニン濃度およびBUN濃度は平均値±標準偏差で表した。

上記の試験結果から、明かなようにCDDP投与に際し、
本発明の薬剤を併用すると、用量依存的にBUNおよびク
レアチニン量の増加を抑え、腎毒性の著しい軽減が見ら
れた。

試験例 2

〔CDDP単回投与後の犬腎毒性に対するSAMeの効果(BUN)〕

ビーグル犬（体重10.2～14.5kg、24～36月齢）9頭を
3頭ずつ3群に分け、1群にはCDDP 4mg/8ml/kgを
静脈内投与し、第2群にはCDDP 4mg/8ml/kgおよび
実施例1のSAMe塩（以下単にSAMe塩という）をSAMeとし
て30mg/kgまたは100mg/kgを静脈内投与した（SAMe塩は
pH5に調整し、CDDPの投与直前に静脈内投与した）。対
照群には、CDDPおよび生理食塩水を投与した。投与後2
日毎にBUN値を測定し、比較した。

その結果を、下記表に示す。

表 3

CDDP(4 mg/kg)単回投与後の犬腎毒性に対するSAmEの効果(BUN)

投 与	BUN濃度 (mg/dl)		
	1日目	6日目	12日目
生理食塩水	18.4±4.37	147.9±35.87	—
SAmE 30mg/kg	15.0±1.04	167.2±102.30	41.62±0.00
SAmE 100mg/kg	13.4±2.80	27.6±19.15	25.5±13.36

表中のBUN濃度は平均値±標準偏差で表した。

対照群は7日目までに全例が死亡し、SAmE 30mg/kg
投与群は7日目までに3例中2例が死亡したが、100mg
/kg投与群は全例が生存した。

試験例 3

〔CDDP多回投与後の犬腎毒性に対するSAmEの効果(BUN)〕

ビーグル犬(体重8.3~9.2kg、8~9月齢)12匹を4
群に分けた。

第1群にはCDDP 2mg/4ml/kgと生理食塩水を3回
(第1日目、第11日目、第21日目)静脈内投与し、対照
群とした。

第2群にはCDDP 2mg/4ml/kgとSAmEとして25mg/
kgのSAmE塩とを3回(第1日目、第11日目、第21日目)
静脈内投与した。SAmE塩はpH5に調整し、CDDP投与直前
に静脈内投与した。

第3群にはCDDP 2mg/4ml/kgとSAmEとして50mg/
kgのSAmE塩とを3回(第1日目、第11日目、第21日目)
静脈内投与した。SAmE塩はpH5に調整し、CDDP投与直前

に静脈内投与した。

第4群にはCDDP 2 mg/4 ml/kgとSAmEとして100mg/kgのSAmE塩とを3回（第1日目、第11日目、第21日目）静脈内投与した。SAmE塩はpH5に調整し、CDDP投与直前に静脈内投与した。

上記各投与（第1日目、第11日目、第21日目）後2日目毎にBUN値を測定した。

上記測定により得られたBUN値を、第1日目のBUN値を100としてその相対値として表した。その第3日目、第13日目と第23日目の結果を下記表に示した。

表 4

CDDP(2 mg/kg)多回投与後の犬腎毒性に対するSAmEの効果(BUN)

群 番号	投 与	BUN ¹⁾		
		3日目	13日目	23日目
1	生理食塩水	117.9±10.92	140.1±34.35	160.9±13.14
2	SAmE 25mg/kg	101.9±22.99	115.8±26.88	124.6±22.94
3	SAmE 50mg/kg	101.2±4.00	110.8±20.86	119.2±20.33*
4	SAmE 100mg/kg	102.4±17.98	104.4±23.21	104.5±16.25**

1) 上記表中のBUN値は1日目のBUN値を100として、平均値±標準偏差で表した。

* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$

SAmEの使用量を増加させるとBUN値は有意に低下した。

試験例 4

〔(CDDP単回投与後のラット腎毒性に対するSAmEの効果(BUN、CRE))〕

ラット(体重約180g)を3群に分け、第1群にはCDDP 5mg/10ml/kg、第2群にはCDDP 5mg/10ml/kgおよびSAmEとして10mg/kgのSAmE塩を1回静脈内投与した(SAmE塩はpH5に調整し、CDDPの投与直前に静脈内投与した)。対照群にはSAmE塩の代わりに生理食塩水を投与した。投与7日目にBUN、クレアチニン(CRE)値を測定した。その結果を下記表に示す。

表 5

CDDP単回投与後のラット腎毒性に対するSAmEの効果(BUN)

CDDP (mg/kg)	SAmE塩 (mg/kg)	動物数	BUN濃度 (mg/dl)	CRE濃度 (mg/dl)
—	—	3	19.0±3.6	0.53±0.06
5	—	6	83.0±42.5	1.12±0.50
5	10	6	22.2±1.9*	0.57±0.08*

表内のBUN濃度およびCRE濃度は平均値±標準偏差で表した。

* : $P < 0.05$ (CDDPおよび生理食塩水投与群に対し)

試験例 5

[CDDP多回投与後のラット腎毒性に対するSAmEの効果(BUN)]

ラット(約180g)を3群に分け、第1群にはCDDP 3mg/10ml/kg、第2群にはCDDP 3mg/5ml/kgおよびSAmE塩をSAmEとして10mg/kg 5日毎に3回静脈内投与(SAmE塩はpH5に調整し、CDDPの投与直前に静脈内投与した)。対照群にはSAmE塩の代わりに生理食塩水を投与した。BUN値を経日的に測定した。

その結果を表 6 に示す。

表 6

CDDP多回投与後のラット腎毒性に対するSAmEの効果 (BUN)

CDDP (mg/kg)	SAmE塩 (mg/kg)	BUN濃度 (mg/dl)					
		2	3	6	7	10	11(日目)
3	—	21.3 ±5.5	28.4 ±2.9	45.3 ±16.2	29.5 ±11.2	34.0 ±7.5	34.1 ±8.9
3	10	17.3 ±2.3	25.0 ±2.5	18.9 ±3.2*	17.1 ±3.2	23.4 ±1.8*	19.0 ±2.4*

表内のBUN濃度は平均値±標準偏差で表した。

* : $P < 0.05$ (CDDPおよび生理食塩水投与群に対し)

試験例 6

[CDDP多回投与後のマウス腎毒性に対するSAmEの効果 (BUN)]

マウス (体重約 24~28 g) を 3 群に分け、第 1 群には CDDP 8 mg / 8 ml / kg、第 2 群には CDDP 8 mg / 8 ml / kg および SAmE 塩を SAmE として 30 mg / kg、第 3 群には CDDP 8 mg / 8 ml および SAmE 塩 90 mg / kg を、それぞれ、5 日間隔で 2 回静脈内投与した (SAmE 塩は CDDP の投与直前に SAmE 塩を pH 5 に調整し、CDDP 投与時とその 30 分後と 60 分後に 10 mg / kg または 30 mg / kg ずつ 3 回に分け静脈内投与した)。対照群には生理食塩水を投与した。投与後 BUN 値を経日的に測定した。

その結果を下記表に示す。

表 7

CDDP (mg/kg)	SAm塩 (mg/kg)	動物数	BUN濃度 (mg/dl)			
			3	4	7	8(日目)
—	—	4	39.6 ±5.3	39.2 ±5.0	41.4 ±4.2	34.8 ±1.9
8	—	4	36.8 ±7.9	44.4 ±12.4	140.6 ±47.8	196.3 ±82.2
8	10×3 ¹⁾	5	36.0 ±8.8	41.6 ±5.0	59.4* ±27.6	60.9* ±36.5
8	30×3 ²⁾	5	31.5 ±2.2	39.3 ±11.6	90.9 ±47.1	99.3 ±72.8

5

表内のBUN濃度は平均値±標準偏差で表した。

* : P < 0.05 (CDDPおよび生理食塩水投与群に対し)

1) 10 mg/kgを30分毎に3回静脈内投与した。

2) 30 mg/kgを30分毎に3回静脈内投与した。

試験例 7

15

(SAm類によるCDDPの抗腫瘍効果増強作用(iv vitro))

マウス白血病細胞L1210およびP388をRPMI1640培養液で 10^4 細胞数/mlとし、その2 mlを培養試験管 (Falcon No. 2054) に分注し、炭酸ガスインキュベータ中、5%炭酸ガス存在下、37℃で5時間培養した後、CDDPおよび/またはSAm類を各培養試験管に加え、さらに1時間培養した。次いで1,600rpmで5分間遠心し、培養液を吸引除去した後、RPMI1640を2 ml加え、上記と同じ条件で72時間培養した後、培養液中の細胞数をコールター・カウンター (Model ZB) で計測した。

20

25

その結果を表8に示す。

表 8

SAMe類によるCDDPの抗腫瘍効果
増強作用 (in vitro)

番号	被 検 薬	IC ₅₀ (μM)
1	CDDP + SAMe ²⁾	1.7
2	CDDP + SAMe ¹⁾	6.6
3	CDDP	16.2
4	SAMe	> 1000

1) CDDPに対するSAMeの量はモル比で1 : 10。

2) CDDPに対するSAMeの量はモル比で1 : 100。

抗腫瘍効果をIC₅₀値(CDDP無添加時のL1210細胞の増殖を50%抑制するCDDPの濃度)で表すと、CDDPを単独で用いた場合には、IC₅₀値が16.2μMであった。これに対してCDDPと本発明の実施例1の製法で得られた薬剤をCDDPに
対しモル比で10倍量、100倍量併用したときの各々のIC₅₀値は、6.6および1.7μMであった。

一方、上記の本発明の薬剤を単独で用いたときのIC₅₀値は、1,000μM<であった。

試験例 8

(SAMe類によるCDDPの抗腫瘍効果増強作用 (in vivo))

1群6匹の8週令のCDF1マウス(雄性; 体重24~28g)を用い、その腹腔内にマウス白血病細胞L1210を10⁵個移植(day 0)した。1日後(day 1)および5日後(day 5)にCDDPおよび/または実施例1記載の製法で得られた薬剤を各群の腹腔内に投与した。

CDDPおよびCDDPと上記薬剤の併用時のL1210に対する抗腫瘍効果を下記の式によって求められる生命延長率 (ILS) で示した。

$$I L S (\%) = (T / C - 1) \times 100$$

5 式中、Tは、CDDP投与群のマウスの平均生存日数を表し、Cは、CDDP非投与群（対照群）のマウスの平均生存日数を表す。

なお、30日以上生存した場合の生存日数は30日として計算した。

10 なお、投与方法は、ip-ip (day 1、5) であり、表9中の被検薬の用量 (mg/kg) については、たとえば、番号1では、CDDPとSAmE塩をSAmEとして各々4mg、400mgを併用したことを示している。また、体重変化は各群の
15 day 1とday 7での平均体重の差 (day 7の平均体重 - day 1の平均体重) を示している。

その結果を下記表に示す。

表 9

SAmE類によるCDDPの抗腫瘍効果増強作用 (in vivo)

番号	被検薬	用 量 (mg/kg)	ILS (%)	30日生存 マウ ス	体重変化 (g)
1	CDDP	4			
	SAmE	400	184	2/6	-2.8
2	CDDP	6			
	SAmE	400	241	5/6	-4.8
3	CDDP	4	73	0/6	-2.4
4	CDDP	6	121	0/6	-4.5

上記の試験結果から、CDDP（4または6 mg/kg）と本発明の実施例1記載のSAmEの複合塩（SAmEとして400mg/kg）を併用したとき、30日以上生存するマウスが多く現れ、本発明の薬剤がCDDPの抗腫瘍効果を著しく増強していることがわかる。一方、本発明の薬剤とCDDPとを併用したときの体重の減少は、CDDPを単独投与した場合と同様であった。

試験例9

マウス結腸腫瘍細胞Colon 26をMEM培養液で 5×10^3 細胞/mlとし、その2mlを培養ペトリ皿に分注した。5%CO₂下37°で24時間培養した後、各濃度のCDDPまたはCDDPの10倍～100倍モル量のSAmE共存下1時間培養した。その後培地を吸引しコールド（cold）PBS（-）で1回洗浄後新しい培地を2ml加え、さらに72時間培養した。細胞をトリプシン処理し、希釈後、細胞数をコールターカウンタで計測した。

CDDPの抗腫瘍活性はトリプリケートの値より算出し、IC₅₀値で示した（表10）。

試験例10

ヒト腫瘍に対する抗腫瘍効果増強作用

下記のヒト腫瘍細胞をRPMI1640培地（註1）またはMEM培地（註2）で $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 細胞/mlとし、その2mlを培養ペトリ皿に分注した。5%CO₂下37℃で24時間培養した後、各濃度のCDDPまたはその10倍～100倍モル量のSAmE共存下1時間培養した。その後培地を吸引し、

5 コールドPBS(-)で1回洗浄後、新しい培地を2ml加え、さらに72時間培養した。細胞をトリプシン処理し、希釈後、細胞数をコールターカウンターで計測した。CDDPの抗腫瘍活性はトリプリケートの値より算出し、 IC_{50} 値で示した(表11、12)。

註1:

RPMI 1640培地: 10%牛胎児血清、 $20\mu M$ 2-メルカプトエタノール、カナマイシン($100\mu g/ml$)。

註2:

10 MEM培地: 10%牛胎児血清、カナマイシン($60\mu g/ml$)。

使用したヒト腫瘍細胞:

15 A549: 肺腺癌、LU65: 肺癌、MKN28: 胃腺癌、MKN45: 胃腺癌、DLD-1: 結腸腺癌、WiDr: 結腸腺癌、PA-1: 卵巢奇形腫、MCAS: 卵巢囊胞腺癌、ACHN: 腎腺癌。

その結果を表10、11および表12に示した。

各表中、化合物欄の表示は以下の意味を表わす。

1) CDDPに対して10倍量のSAmEを併用

2) CDDPに対して100倍量のSAmEを併用

20

25

表 10

化 合 物	IC ₅₀ (μM)		
	L1210	P388	Colon26
CDDP	16.2 (1.0)	3.5 (1.0)	41.7 (1.0)
CDDP+SAMe ¹⁾	6.6 (2.5)	2.2 (1.6)	18.8 (2.2)
CDDP+SAMe ²⁾	1.7 (9.5)	0.9 (3.9)	14.9 (2.8)

表中 () 内の数値は、下記式で表される、SAMe併用時のCDDPの抗腫瘍活性増強の割合を示す。

$$(\text{CDDPのIC}_{50}) / (\text{SAMe併用時のCDDPのIC}_{50})$$

表 11

化 合 物	IC ₅₀ (μM)				
	A549	Lu65	MKN28	MKN45	DLD-1
CDDP	18.7 (1.0)	20.3 (1.0)	62.8 (1.0)	25.4 (1.0)	23.5 (1.0)
CDDP+SAMe ¹⁾	15.7 (1.2)	15.4 (1.3)	31.0 (2.0)	14.7 (1.7)	16.4 (1.4)
CDDP+SAMe ²⁾	16.2 (1.2)	9.9 (2.1)	42.3 (1.5)	15.6 (1.6)	18.1 (1.3)

表 12

化 合 物	IC ₅₀ (μM)			
	WiDr	MCAS	PA-1	ACHN
CDDP	37.7 (1.0)	149.9 (1.0)	4.1 (1.0)	48.4 (1.0)
CDDP+SAMe ¹⁾	24.6 (1.5)	27.4 (5.5)	3.8 (1.1)	28.5 (1.7)
CDDP+SAMe ²⁾	17.2 (2.2)	31.0 (4.8)	3.6 (1.1)	16.8 (2.9)

上記表に示された試験結果から、マウスおよびヒト腫瘍細胞に対するCDDPの抗腫瘍活性は、 IC_{50} 値で表すとマウス腫瘍に対しては $3.5 \sim 41.7 \mu M$ 、ヒト腫瘍に対しては $4.1 \sim 149.9 \mu M$ であった。一方、CDDPの10倍モル量あるいは100倍モル量のSAmEを共存させるといずれの腫瘍細胞に対してもCDDPの抗腫瘍活性は増強され、 IC_{50} 値で比較すると増強の割合は $1.1 \sim 9.5$ 倍であった。また、SAmEの各腫瘍細胞に対する IC_{50} 値はいずれにおいても $1,000 \mu M$ 以上であった。

10 試験例11

(SAmE類によるマウス腫瘍に対する抗腫瘍効果増強作用
(腹腔内または静脈内投与))

1群6匹の8～9週令(体重 $24 \sim 28 g$)の雄性CDF1マウスを用い、その腹腔内にマウス白血病細胞L1210(10^5 個)を移植した(day 0)。次いでday 1およびday 5にCDDPあるいはCDDPとSAmEを同時に腹腔内もしくは静脈内(iv)投与した。

CDDPおよびCDDPとSAmEを併用した時の抗腫瘍効果はILSで求めた。

20

25

表 1 3

SAMe類によるCDDPの抗腫瘍効果増強作用
(腹腔内投与)

5

10

用 量 (mg/kg)			30日生存マウス
CDDP	SAMe	ILS (%)	
4	—	78	3/6
4	100	113	
4	200	204	
4	400	239	
6	—	84	2/6
6	100	126	
6	200	192	
6	400	201	

15

上記表に示すように、CDDP(4または6 mg/kg)とSAMe
(100~400mg/kg)を同時に腹腔内投与した時、CDDPの
みを投与した場合に比べ抗腫瘍効果が著しく増強し、30
日以上生存するマウスが多く現れた。

表 1 4

SAMe類によるCDDPの抗腫瘍効果増強作用(静脈内投与)

20

用 量 (mg/kg)		ILS (%)
CDDP	SAMe	
4	—	28
4	10	36
4	10×3 ¹⁾	38
4	30	48
4	30×3 ¹⁾	53

25

1) CDDPとSAMeを投与後、30分間隔でさらに同量の
SAMeを2回投与した。

CDDP (4 mg/kg) と SAME (10~90mg/kg) を同時に静脈内投与したとき、CDDPのみを投与したときに比べ抗腫瘍効果は投与した SAME の用量に依存して増強された。また同量の SAME を分割して投与したときの方が大きな抗腫瘍効果が得られた。

ヒト腫瘍に対する抗腫瘍効果増強作用

1 群 3~4 匹の 6~8 週令 (体重 24~28 g) の BALB/c 雌性ヌードマウスを用い、下記のヒト腫瘍 ($10^6 \sim 10^7$ 個) を皮下 (sc) に移植した。腫瘍体積が一定の大きさ (200~300mm³) に達した日 (day 1) から CDDP あるいは CDDP と SAME (400mg/kg) を同時に腹腔内 (ip) もしくは静脈内 (iv) 投与した。腫瘍の長径、短径およびその高さを各々 a、b、h (mm) とし、腫瘍体積を下記の式で算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1 / 2 \times a \times b \times h$$

抗腫瘍効果は、個々のマウスにおける腫瘍体積増殖率 (day 1 に対する day n の腫瘍体積比) にて求めた。

使用したヒト腫瘍細胞は、A549: 肺腺癌、LU65: 肺癌、MKN28: 胃腺癌、MKN45: 胃腺癌、DLD-1: 結腸腺癌、WiDr: 結腸腺癌、PA-1: 卵巣奇形腫、MCAS: 卵巣嚢胞腺癌および ACHN: 腎腺癌 (Renal, adenocarcinoma) 等である。

試験例 12

ヒト肺癌 (Lu65) を有するマウスに CDDP (6 mg/kg) と SAME (400mg/kg) を day 1 および day 5 に腹腔内投与

した。

その結果CDDPとSAmEを併用した場合には、CDDPのみを
投与した場合に比べ強い抗腫瘍効果を示し、腫瘍の増殖
が強く抑制された。さらにCDDPとSAmE併用群中、腫瘍が
5 縮小するものも現れた。

また、試験した他のヒト癌に対してもCDDPとSAmEを併
用した場合、CDDPのみを投与した場合に比べ同等あるい
はそれより強い腫瘍増殖抑制効果を示した。

本発明により、白金錯体化合物類を本発明の薬剤と一
10 緒に投与すると腎毒性および神経毒性のような、該抗腫
瘍剤を単独投与するときに観察される副作用の著しい軽
減ばかりでなく、生存日数の延長など該抗腫瘍剤の抗腫
瘍効果の著しい増強が見られた。

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. 生体内に投与された薬剤による腎毒性を軽減するための腎毒性軽減剤として使用する医薬用組成物であって、S-アデノシル-L-メチオニン、もしくは、その塩類を有効成分として含有し、薬学的に許容される賦形剤および／又は佐薬を含有する医薬用組成物。
5
2. 前記の生体内に投与された薬剤がシスプラチンである請求の範囲1記載の医薬用組成物。
3. 白金錯体化合物による抗腫瘍活性を増強する薬剤として使用する医薬用組成物であって、S-アデノシル-L-メチオニンを有効成分として含有し、薬学的に許容される賦形剤および／又は佐薬を含有する医薬用組成物。
10
4. 前記の白金錯体化合物がシスプラチンである請求の範囲3記載の医薬用組成物。
15

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A61K31/70, A61K33/24, A61K31/28, A61K31/555

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. Cl⁵ A61K31/00, A61K33/00, C07H19/16

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)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, A, 59-139320 (Nippon Zeon Co., Ltd.), August 10, 1984 (10. 08. 84), & DE, A1, 3403324 & IT, B, 1174476	1-4
A	JP, A, 61-263925 (Kanebo, Ltd.), November 21, 1986 (21. 11. 86), (Family: none)	1-4

☐ 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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step 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

November 16, 1993 (16. 11. 93)

Date of mailing of the international search report

December 7, 1993 (07. 12. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A 61K 31/70, A 61K 33/24, A 61K 31/28,
A 61K 31/555

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 A 61K 31/00, A 61K 33/00, C 07H 19/16

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)

CAS ONLINE

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
X	JP, A, 59-139320 (日本ゼオン株式会社), 10. 8月. 1984 (10. 08. 84) & DE, A1, 3403324 & IT, B, 1174476	1-4
A	JP, A, 61-263925 (鐘紡株式会社), 21. 11月. 1986 (21. 11. 86) (ファミリーなし)	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 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

16. 11. 93

国際調査報告の発出日

07.12.93

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)

横 尾 俊

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4 C 7 8 2 2