

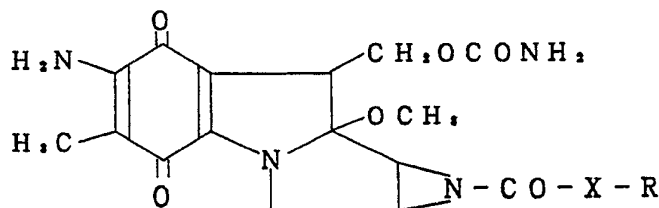


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 A61K 31/40, 9/107, 9/127 A61K 9/14</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 91/10431</p> <p>(43) 国際公開日 1991年7月25日 (25. 07. 1991)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP91/00006 (22) 国際出願日 1991年1月9日 (09. 01. 91)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平 2/5203 1990年1月11日 (11. 01. 90) JP</p> <p>(71) 出願人 日本新薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP] 〒601 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 関 純造 (SEKI, Junzo) 〒666-02 兵庫県川辺郡猪名川町白金3丁目6-16 Hyogo, (JP) 牛丸 紘一 (USHIMARU, Kouichi) 〒602 京都府京都市上京区上立売通り室町西入ル17 Kyoto, (JP) 杉山 信 (SUGIYAMA, Makoto) 〒607 京都府京都市山科区音羽乙出町6-23 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 片岡 宏, 外 (KATAOKA, Hiroshi et al.) 〒601 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 日本新薬株式会社内 Kyoto, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DE, DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GB, GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許).</p>		<p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title : FAT EMULSION

(54) 発明の名称 脂肪乳剤



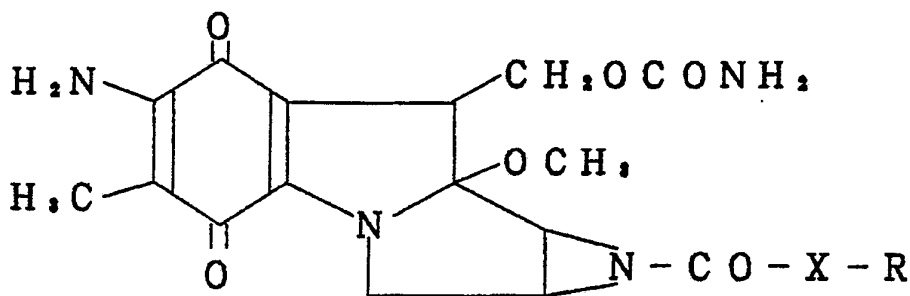
( I )

(57) Abstract

A fat emulsion mainly comprising 0.001 to 10 % (w/v) of a mitomycin C derivative of general formula (I), 0.5 to 30 % (w/v) of a simple lipid, a phospholipid in an amount of 0.05 to 2 times by weight as large as the simple lipid, and an appropriate amount of water: (I) wherein X represents  $-(CH_2)_n-O-$  or  $-(CH_2)_n-NHCOO-$ ; n represents an integer of 0 to 4; and R represents a linear or branched, open-chain or cyclic, saturated or unsaturated hydrocarbon group containing 3 to 25 carbon atoms. This emulsion causes efficient migration of a prodrug of mitomycin C with a carcinostatic action in the form of an injection into the tissues, helps to maintain its blood level, and allows safe administration of an effective dose.

(57) 要約

本発明に係る脂肪乳剤は、次の一般式〔I〕



〔I〕

〔式中、Xは、 $-(CH_2)_n-O-$  又は、 $-(CH_2)_n-NHCOO-$  を表し、n は、0~4の整数を表し、Rは、炭素数3~25の、直鎖又は分岐した、鎖状又は環状の、飽和又は不飽和の炭化水素を表す。〕

で表されるマイトマイシンC誘導体 (0.001~10% (w/v))、単純脂質 (0.5~30% (w/v))、リン脂質 (単純脂質に対して0.05~2倍 (重量比))、及び水 (適当量) を主構成成分とする。

本発明によれば、抗癌作用を有するマイトマイシンCのプロドラッグを注射剤として効率的に組織内へ移行させることができ、血中濃度を持続させ、安全に有効量投与することができる。

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 オーストラリア  
AU オーストラリア  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ共和国  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コート・ジボアール  
CM カメルーン  
CS チェコスロバキア  
DE ドイツ  
DK デンマーク

ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GI ギニア  
GB イギリス  
GR ギリシャ  
HU ハンガリー  
IT イタリア  
JP 日本  
KP 朝鮮民主主義人民共和国  
KR 大韓民国  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリランカ  
LU ルクセンブルグ  
MC モナコ  
MG マダガスカル

ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
PL ポーランド  
RO ルーマニア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SN セネガル  
SU ソビエト連邦  
TD チャド  
TG トーゴ  
US 米国

明 細 書  
脂 肪 乳 剤

技 術 分 野

本発明は、抗癌活性を有するマイトマイシンC誘導体の製剤に関する。さらに詳しくは、マイトマイシンC誘導体、単純脂質、リン脂質および水を含む含有してなる抗癌剤医薬組成物に関する。

背 景 技 術

マイトマイシンCは優れた抗癌作用を示し、広く臨床に用いられている。しかし、多くの深刻な副作用を有し、この製剤の臨床使用は、著しく制限され十分な薬物療法を行うことができない難点を有しており、マイトマイシンCの腫瘍部位への移行性の改善および副作用の軽減が望まれていた。

これまで、マイトマイシンCの種々の誘導体についてスクリーニングが行われるとともに、マイトマイシンCのプロドラッグである一般式〔I〕で表されるマイトマイシンC誘導体（例えばノニルオキシカルボニルマイトマイシンC）について、リポソーム等に代表される製剤学的手法により上記の問題を解決すべく種々の努力がなされてきた。

上記マイトマイシンC誘導体のリポソーム製剤は、投与後リポソームより薬物が速やかに遊離し、容易に代謝されることなどにより満足な抗癌活性の改善効果は得られず、

より一層の改善が望まれていた。

また、薬物の血液中又は適用部位から病変組織への移行性を改善するための製剤学的工夫に関する研究はこれまで種々行われてきているが、上記のリン脂質で調製したリポソームに薬物を包含させて利用する方法では、①水層を脂質二重層で包含するリポソームには保存時の安定性に問題が多いこと、②上記マイトマイシンC誘導体はきわめて脂溶性が高くリポソーム製剤とした場合リン脂質二分子膜中に存在するのでリポソーム膜構造に損傷を与え、薬物を安定に保持できないこと、等の欠点を有していた。

これは、リポソームがリン脂質二分子膜によって内外の水層を隔てる構造を有しているため種々の力に対して安定ではないためであると考えられ、凝集による粒子径の増大も又、保存時の欠点として知られていた。

#### 発 明 の 開 示

本発明者らは、上記マイトマイシンC誘導体を安定に保持し、また腫瘍部位への移行性をも改善し、安全で有効な新規の製剤を提供することを目的に検討し続けた結果、ようやく本発明を完成させることに成功したものである。

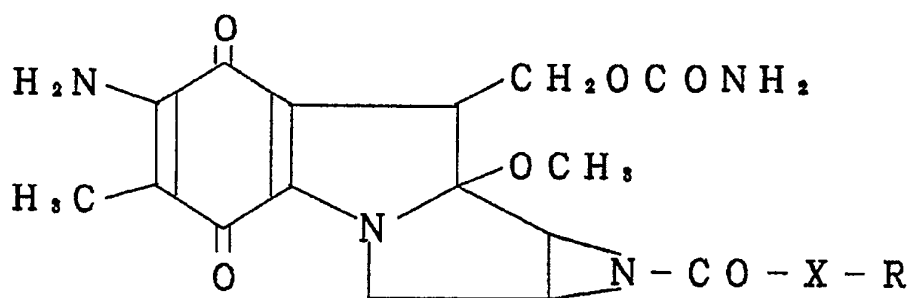
通常、投与された薬物は、その薬物分子の持つ固有の性質により生体内を移動分布する。そして作用部位に到達し薬効を発現する。このとき薬効発現に必要な部位にのみ薬物が集中することが好ましいが、一般には身体全体に薬物は分布し、不要な部位にも薬物が移動する。時にこれが副

作用の原因となる。そこで、薬物の体内動態を改善することの重要性及び必要性が生じる。

本発明者らは、上記の事情に鑑み、①薬物の薬理作用そのものに影響を与えることなく、②薬物の効率的な病巣組織内への選択的移行を可能たらしめ、③薬物の血中濃度を持続させることができる、安全で一層有効なマイトマイシンC誘導体の新規の製剤を検討し続けた結果、ついに本発明を完成させることに成功したものである。

本発明の要旨は、マイトマイシンC誘導体を主成分とする脂肪乳剤を製造するにあたって、単純脂質、リン脂質および水のそれぞれの構成成分の組成比を限定したところにある。

本発明に係るマイトマイシンC誘導体としては、次の一般式〔I〕



( I )

〔式中、Xは、 $-(CH_2)_n-O-$  又は、 $-(CH_2)_n-NHCOO-$  を表し、n は、0~4の整数

を表し、Rは、炭素数3～25の、直鎖又は分岐した、鎖状又は環状の、飽和又は不飽和の炭化水素を表す。] で表わされる化合物を挙げるができる。

Rとして例えば、イソブチル、ノニル、セチル、ゲラニル、コレステリル等を挙げるができるが、これらに限定されるものではない。

本発明に係る一般式 [ I ] で表される化合物のうち、アルキルオキシカルボニルマイトマイシンC (一般式 [ I ] でXが $-(CH_2)_n-O-$  かつnが0の化合物) 及びRがコレステリルであるマイトマイシンC誘導体 (例えば、N-コレステリルオキシカルボニルグリシルマイトマイシンC、コレステリルオキシアセチルマイトマイシンC等) を除く化合物は文献未記載の新規化合物であって、本発明者らが初めて見出したものである。

本発明に係るマイトマイシンC誘導体は、生体内で既知のマイトマイシンC誘導体とは異なる速度でマイトマイシンCへと代謝されるため、マイトマイシンCのプロドラッグとして有用なものである。

一般式 [ I ] で表される化合物は特に、人の血漿や腫瘍細胞での遊離のマイトマイシンC生成に優れている。マイトマイシンC誘導体は、それ自体は活性を有さずに腫瘍中を初めとした体内で活性型であるマイトマイシンCへと代謝されることによりその効力を発現するものである。

本発明においては、マイトマイシンC誘導体は全体の脂

肪乳剤に対して10% (w/v) 以下が望ましい。

本発明においては、単純脂質は全体の脂肪乳剤に対して0.5~30% (w/v) 含有するようにする。

本発明においては、リン脂質は上記の単純脂質に対して重量比にして0.05~2倍量含有するようにする。

これより少ない量では、粗大粒子の混入が避けられず、薬物を含有した安定な脂肪乳剤とすることができない。これより多い量のリン脂質を用いた場合は、リポソーム粒子の混入が避けられず、均一な脂肪乳剤が得られない。

本発明の構成成分である水は、適当量含有するようになる。

これらの成分構成により、安定な微粒子化乳剤が得られ、このものがきわめて優れた特徴を有する医薬組成物であり、新規のマイトマイシンC誘導体制剤として利用できることが本発明により初めて明かとなった。

本発明の脂肪乳剤は、乳剤粒子中にマイトマイシンC誘導体を安定に保持することができる。

本発明の脂肪乳剤の平均粒子径は0.5 $\mu$ 以下である。本発明の脂肪乳剤は1 $\mu$ 以上の乳剤粒子を含まないきわめて微細で安定なものである。

本発明の脂肪乳剤の乳剤粒子は、①腫瘍に起因する炎症及び生体防御反応により局所に集合するマクロファージ等の貪食性細胞や腫瘍細胞に移行するため、②腫瘍血管は血管透過性が亢進しているので、腫瘍部位で血管内から病巣

組織内に選択的に容易に漏出するため、等の理由により効率的な病巣部位への薬物移行が達成されるからである。

また、約 100nm以下の乳剤粒子は、肝臓等の細網内皮系による非特異的な取り込みが回避され、薬物の血中濃度がいっそう高く保たれる効果を得ることができる。これは、より多くの本発明乳剤粒子の腫瘍組織内移行につながる。

乳剤粒子の病巣内移行にともない乳剤粒子に包含されている薬物も病巣内に移行する。このことにより、薬物が容易にそして選択的に病巣部に移行するから、病巣部位での薬物濃度が高まりその効果を増大させることができる。

本発明によれば、マイトマイシンC誘導体は脂質の油滴中にあるため、周囲の環境から遮断された状態で存在するので、酵素的又は非酵素的な分解を抑制することができ、投与後においても薬物の安定性を改善することができる。

これらの結果、本発明に適應するマイトマイシンC誘導体より遊離する活性型のマイトマイシンCが病巣組織内において持続的に作用することとなる。

本発明の脂肪乳剤に使用される単純脂質としては、例えば、精製大豆油、綿実油、菜種油、胡麻油、コーン油、落花生油、サフラワー油、トリオレイン、トリリノレイン、トリパルミチン、トリステアリン、トリミリスチン、トリアラキドニン等の中性脂質を挙げることができる。また、コレステリルオレート、コレステリルリノレート、コレステリルミリステート、コレステリルパルミテート、コレス

テリルアラキデート等のステロール誘導体をも挙げる事ができる。これは、血管内皮等に存在する種々のリパーゼ類により中性脂質は比較的容易に分解されるのに対し、コレステロール誘導体はこれらの酵素による分解を受けにくいいため、体内での安定性が更に増すからである。

リン脂質としては、例えば、卵黄、大豆、牛、豚等由来のリン脂質または、純あるいは半合成的に得られるリン脂質が挙げられる。即ち、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール等が挙げられる。例えば、卵黄ホスファチジルコリン、大豆ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール等が挙げられる。それらの水素添加物も用いることができる。なかでも好ましい代表例として、精製卵黄レシチンを挙げる事ができる。また、乳剤粒子に表面荷電を賦与するためにステアリルアミン、ジセチルホスフェート、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール等の荷電を有する脂質をも用いることができる。

本発明の脂肪乳剤及びこれを使用した製剤の製造にあたっては、従来から行われてきた種々の乳剤製造法をそのまま応用することができる。

例えば、薬物を含めた全構成成分をマントン-ガウリン型等の加圧噴射式ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー、超音波ホモジナイザー等により十分に微細化して形成せしめる方法が一般的である。この時、一般に知られる乳化補助剤または安定化剤として生理的に受け入れられるステロール類、脂肪酸あるいはそれらの誘導体等を加えることもできる。これらの代表例としては、コレステロール、オレイン酸等があげられる。

本発明の脂肪乳剤の形状や粒子径は、電子顕微鏡、光散乱方式の粒子径分析装置、メンブレンフィルターによる濾過等により容易に確認することができる。

本発明の脂肪乳剤の製剤には、本発明の必須構成成分のほかにその他の成分として、一般に注射剤に用いられる添加剤及び補助物質などを添加することができる。例えば、酸化防止剤、防腐剤、安定化剤、等張化剤、緩衝剤等を添加することができる。これらの添加剤、補助物質等の要求量及び最適量は、その目的に応じて変化させることができる。

上記のようにして得られる本発明の医薬組成物は、必要に応じて滅菌（例えば濾過滅菌や高圧蒸気滅菌等）し、窒素ガスとともにアンプル中に封入することができる。又、必要に応じて凍結乾燥することができる。凍結乾燥させた本発明医薬組成物は、適当な溶液の添加によって復元することができる。

本発明の脂肪乳剤は、各種悪性腫瘍等の治療を目的としてヒトまたは種々の動物の静脈内に投与するのが一般的である。この場合、乳剤粒子の粒子径等の管理を十分に行う必要がある。なぜならば、一般に1 $\mu$ 以上の粒子が混在すると、種々の毒性発現が知られるからである。

また本発明の脂肪乳剤は、必要に応じて動脈内、筋肉内、及び皮下等に注射剤として投与することもできる。また、本発明に係る医薬組成物は、点眼剤、点鼻剤、経口投与剤、吸入剤、膀胱注入剤または坐剤や軟膏等としても製剤化し使用することができる。この場合においても、医薬上許容される基剤、賦形剤等の添加剤を任意の成分として挙げるることができる。

本発明の脂肪乳剤よりなる製剤の投与量は、投与ルート、剤形、症状、目的によって異なるが、乳剤として一般に、1~1000ml/回である。

## 効 果

本発明によれば、マイトマイシンC誘導体の臨床上的利用価値を著しく高めることができる。本発明の効果は、前記した従来の問題点を克服し、抗腫瘍効果の改善および、臨床上的最大の問題である副作用（毒性）を著しく軽減したことなどにより、安全で一層有効なマイトマイシンCの新規な製剤化を達成したことに集約することができる。これらの効果は、本発明により初めて成されたものである。

本発明の脂肪乳剤の構成成分は、従来から医療現場にお

いて医療用として用いられてきた医療上許容される脂質を主とするため、極めて安全に使用することができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の脂肪乳剤の製造に関する実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明がこれらのみに限定されるものではないことは明白である。

#### 製造例 1

ノニルオキシカルボニルマイトマイシンCの3mg、精製大豆油0.5g及び精製卵黄レシチン0.5gをクロロホルム/メタノール(1/1, v/v)混液100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに0.24Mグリセリン水溶液を8ml加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。0.24Mグリセリン水溶液を加えて10mlに定容した後、氷冷下超音波ホモジナイザー(ブランソン モデル185)で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含む脂肪乳剤を得た。

#### 製造例 2

ノニルオキシカルボニルマイトマイシンCの2g、精製大豆油50g及び精製卵黄レシチン6gを約60℃で加温混合し、これに、0.24Mグリセリン水溶液を500ml加え、ホモミキサーで攪拌し、粗乳化液とする。粗乳化液をマントン-ガウリン型ホモジナイザーにより高圧乳化し、きわめて微細なマイトマイシンC誘導体を含む脂肪乳剤を得た。

## 製造例 3

ノニルオキシカルボニルマイトマイシンCの40mg、精製大豆油 0.5g 及び精製卵黄レシチン 0.5g をクロロホルム/メタノール (1/1、v/v)混液 100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、等張リン酸緩衝液 8 mlを加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。等張リン酸緩衝液を加えて10mlに定容した後、氷冷下、超音波ホモジナイザー (ブランソン モデル185) で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含有する脂肪乳剤を得た。

## 製造例 4

N- (コレステリルオキシカルボニル) グリシルマイトマイシンCの2g、精製大豆油20g 及び精製卵黄レシチン 25g を約60℃で加温混合し、これに、0.24Mグリセリン水溶液を 100ml加え、ホモミキサーで攪拌し、粗乳化液とする。粗乳化液をマイクロフルイダイザーにより高圧乳化し、きわめて微細なマイトマイシンC誘導体を含有する脂肪乳剤を得た。

## 製造例 5

ノニルオキシカルボニルマイトマイシンCの1mg、コレステリルオレート 0.5g 及び精製卵黄レシチン 0.5g をクロロホルム/メタノール (1/1、v/v)混液 100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、0.24Mグリセリン水溶液 8 mlを

加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。0.24M グリセリン水溶液を加えて10mlに定容した後、超音波ホモジナイザー（ブランソン モデル185）で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含む脂肪乳剤を得た。

#### 製造例 6

コレステリルオキシアセチルマイトマイシンCの3mg、精製大豆油 0.5g 及び精製卵黄レシチン 0.4g、ジミリストイルホスファチジルグリセロール 0.1g をクロロホルム/メタノール（1/1, v/v）混液 100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、9%ラクトース水溶液 8mlを加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。9%ラクトース水溶液を加えて10mlに定容した後、超音波ホモジナイザー（ブランソン モデル185）で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含む脂肪乳剤を得た。

#### 製造例 7

ノニルオキシカルボニルマイトマイシンCの5mg、精製大豆油 0.5g 及び水素添加卵黄レシチン 0.4g、コレステロール 0.1g をクロロホルム/メタノール（1/1, v/v）混液 100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、9%ラクトース水溶液 8mlを加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。9%ラクトース水溶液を加えて10mlに定容した後、

超音波ホモジナイザー（ブランソン モデル185）で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含む脂肪乳剤を得た。

#### 製造例8

N-（ノニルオキシカルボニル）グリシルマイトマイシンCを以下に示す合成方法により得た。

水3mlにグリシン300mg、トリエチルアミン808mgを加えた溶液に、ノニルクロロカルボネートの824mgをジオキサン20mlに溶解した溶液を0℃にて滴下する。3時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮に付し、残渣に1N塩酸10mlを加え析出した沈澱をクロロホルム20mlで抽出する。有機層を水10mlで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮に付すと白結晶（N-（ノニルオキシカルボニル）グリシン）570mgが得られる。この結晶をジオキサン10mlとクロロホルム2mlの混液に溶解し、0℃にて、N-ヒドロキシサクシンイミドの270mgとジシクロヘキシルカルボジイミドの470mgを加える。4℃で12時間放置した後、析出した沈澱を濾過して除き、濾液を減圧濃縮し無色の油状残渣772mgを得る。

マイトマイシンCの150mgをN,N-ジメチルホルムアミドの5mlに溶解した溶液に上記の油状残渣150mgとピリジン36mgを室温下に加え、4時間攪拌する。反応液を減圧濃縮後、残渣をクロロホルム20mlに溶解し、水15mlで洗浄する。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮に付すと赤

紫色の残渣を得る。この残渣をシリカゲルカラムに付シクロロホルム/メタノール混液で溶出した赤紫色の画分を減圧濃縮すると赤紫色の結晶 (N-(ノニルオキシカルボニル)グリシルマイトマイシンC) 225mg (収率89%) が得られる (融点 250℃以上 (分解))。

このもののFAB-MSスペクトルは  $m/z$ ; 563 (M+2) を示し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは以下のピークを示し、その構造が確認できる。

- $\delta$  : 5.36 ~5.08 (3H, m,  $-\text{COCH}_2\text{NHCOO}-$ ,  $\text{NH}_2$ )  
4.43 (1H, d,  $J=13.5\text{Hz}$ , 3-H)  
4.16 ~3.89 (4H, m,  $-\text{COCH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{COOCH}_2-$ )  
3.71 (1H, dd,  $J=10.8, 10.8\text{Hz}$  10-H)  
3.59 (1H, d,  $J=4.6\text{Hz}$  10-H)  
3.57 (1H, dd,  $J=1.6, 13.5\text{Hz}$  3'-H)  
3.48 (1H, dd,  $J=1.6, 4.6\text{Hz}$  2-H)  
3.18 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ )  
1.78 (3H, s,  $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$ )  
1.66 ~1.48 (2H, m,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2-$ )  
1.42 ~1.16 (12H, m,  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ )  
0.88 (3H, t,  $J=7\text{Hz}$ ,  $-(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ )

このようにして得たN-(ノニルオキシカルボニル)グリシルマイトマイシンCの3mg、精製大豆油0.5g及び精製卵黄レシチン0.5gをクロロホルム/メタノール(1/1, v/v)混液100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレ

ーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、0.24Mグリセリン水溶液を8 ml加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。0.24Mグリセリン水溶液を加えて10mlに定容した後、氷冷下、超音波ホモジナイザー（ブランソンモデル185）で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含む脂肪乳剤を得た。

#### 製造例9

N-（イソブチルオキシカルボニル）グリシルマイトマイシンCを以下に示す方法により得た。

水3 mlにグリシン 300mg、トリエチルアミン 808mgを加えた溶液にイソブチルクロロカルボネート 544mgをジオキササン20mlに溶解した溶液を0℃で滴下する。3時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮に付し、残渣に1 N塩酸10mlを加え、析出した沈澱をクロロホルム20mlで抽出する。有機層を水10mlで洗浄し硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮に付すと白結晶（N-（イソブチルオキシカルボニル）グリシン） 409mgが得られる。

この結晶をジオキササン10mlとクロロホルム2 mlの混液に溶解し、0℃にて、N-ヒドロキシサクシンイミド 270mgとジシクロヘキシルカルボジイミド 470mgを加える。4℃で12時間放置した後、析出した沈澱を濾過して除き、濾液を減圧濃縮し、無色の油状残渣 772mgを得る。

マイトマイシンC 150mgを、N,N-ジメチルホルムアミド 5 mlに溶解した溶液に上記の油状残渣 150mgとピリジン36

mgを室温下に加え、4時間攪拌する。反応液を減圧濃縮後、残渣をクロロホルム20mlに溶解し、水15mlで洗浄する。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮に付すと赤紫色の残渣を得る。この残渣をシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール混液で溶出した赤紫色の画分を減圧濃縮すると赤紫色の結晶（N-（イソブチルオキシカルボニル）グリシルマイトマイシンC）161mg（収率73%）が得られる（融点250℃以上（分解））。

このようにして得たN-（イソブチルオキシカルボニル）グリシルマイトマイシンCの3mg、精製大豆油0.5g及び精製卵黄レシチン0.5gをクロロホルム/メタノール（1/1, v/v）混液100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、

0.24Mグリセリン水溶液を8ml加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。0.24Mグリセリン水溶液を加えて10mlに定容した後、氷冷下、超音波ホモジナイザー（ブランソンモデル185）で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含む脂肪乳剤を得た。

#### 製造例10

セチルオキシアセチルマイトマイシンCを以下に示す合成方法により得た。

セチルアルコール（1.2g）とエチレングリコール（10ml）をベンゼン（100ml）中に加え、さらにp-トルエンスルホン酸一水和物（100mg）を加えて8時間還流する。

反応物を減圧濃縮に付し、残渣をエーテル抽出後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮に付すと残渣が得られる。水酸化リチウムアルミニウム (0.5g) と塩化アルミニウム (2g) を乾燥エーテル (50ml) に溶解し、上記残渣のエーテル溶液を滴下し、4時間攪拌を続ける。希硫酸を若干加えた後、不溶物を濾過し、エーテル層を水及び5%炭酸水素ナトリウムで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮に付すと残渣が得られる。この油状残渣をジョーンズ試薬で酸化するとセチルオキシ酢酸が得られる。

得られたセチルオキシ酢酸を製造例8の方法と同様にN-ヒドロキシサクシンイミドを用いてマイトマイシンCに結合させることで、セチルオキシアセチルマイトマイシンCを得た(融点 110~120℃(分解))。

このようにして得たセチルオキシアセチルマイトマイシンCの3mg、精製大豆油0.5g及び精製卵黄レシチン0.5gをクロロホルム/メタノール(1/1, v/v)混液100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、0.24Mグリセリン水溶液を8ml加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。

0.24Mグリセリン水溶液を加えて10mlに定容した後、氷冷下、超音波ホモジナイザー(ブランソン モデル185)で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含有する脂肪乳剤を得た。

## 製造例11

製造例8において用いたノニルクロロカルボネートの代わりにゲラニルクロロカルボネートを同モル用いて製造例8と同様に操作し、N-(ゲラニルオキシカルボニル)グリシルマイトマイシンCを合成した(融点250℃以上(分解))。このマイトマイシンC誘導体40mg、精製大豆油0.5g及び精製卵黄レシチン0.5gをクロロホルム/メタノール(1/1, v/v)混液100ml中で混合溶解した後、ロータリーエバポレーターで減圧下溶媒を完全に除去する。これに、等張リン酸緩衝液8mlを加え、ホモジナイザーで攪拌し、粗乳化液とする。等張リン酸緩衝液を加えて10mlに定容した後、氷冷下、超音波ホモジナイザー(ブランソンモデル185)で60分間乳化し、極めて微細なマイトマイシンC誘導体を含有する脂肪乳剤を得た。

## 製造例12

製造例1、5、6及び8で得られた脂肪乳剤にアルブミン0.5gを加え、その後凍結乾燥処理を行い、乾燥製剤を得た。

本発明の脂肪乳剤の特性評価試験結果を以下に記す。

試験例1、試験例2および試験例3においては、製造例3で得られた本発明の脂肪乳剤を検体試料とした。試験例4においては、製造例4で得られた本発明の脂肪乳剤を検体試料とした。

比較のために対照試料として市販のマイトマイシンC注

射用製剤（マイトマイシン協和S（登録商標）、協和発酵）を用いた。

#### 試験例1：毒性評価試験

実験動物としてd d Y系雄性マウス（体重約30g）を用い、検体試料又は対照試料を尾静脈より静脈内投与した。投与量は遊離のマイトマイシンC換算として5 mg/kgとした。投与は隔日実施し、計3回行った。最終投与4日後のマウスの平均体重を表1に示した。

検体試料を投与したマウスは、無処置群と同様に正常に体重が増加し、毒性は観察されなかったが、対照試料を投与したマウスは、著しく体重が減少し、重篤な消化管の損傷も認められた。

表1 体重変化による毒性評価

	マウスの平均体重 (g)
無処理	34.0
検体試料	33.6
対照試料	22.0

(平均値 n=10)

本発明の脂肪乳剤は従来知られるマイトマイシンC製剤に比べ顕著な毒性の低下が認められ、より安全な薬物療法が達成されることが明白である。

#### 試験例2：抗腫瘍活性の評価

実験動物としてCDF1系雄性マウス（体重約20g）を用い、P388腫瘍細胞を腹腔内投与（移植）した後、2

日後及び4日後の計2回、検体試料又は対照試料を尾静脈より静脈内投与して治療した。投与量は遊離のマイトマイシンC換算として5 mg/kg/回とした。コントロール群は生理食塩水を同様に静脈内投与した。コントロール群との比較により求めたそれぞれの延命効果 ( I L S % ) を表2に示した。

表2 抗腫瘍効果

	延命率 ( I L S % )
検体試料	75.8
対照試料	16.5

抗腫瘍効果 (延命率) は、検体試料は対照試料より著しく優れることが認められる。

本発明の脂肪乳剤は従来知られるマイトマイシンC製剤に比べ、顕著な抗腫瘍効果 (延命率) を示し、より有効で安全な薬物療法が達成されることが明白である。

### 試験例3：血中濃度推移

実験動物としてCDF1系雄性マウス (体重約25g) を用い、検体試料及び対照試料を尾静脈より静脈内投与した。投与量は遊離のマイトマイシンC換算として5 mg/kgとした。投与後、1分後、30分及び60分において少量採血した。血中のマイトマイシンC濃度は高速液体クロマトグラフィーにて測定した。その結果を表3に示した。

表 3 血中濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

	1分後	30分後	60分後
検体試料	0.1	0.6	0.5
対照試料	4.5	0.4	0.1

(平均値  $n = 3$ )

検体試料を投与した場合の血中マイトマイシンC濃度推移は、対照試料より高く持続することが示された。

本発明の脂肪乳剤は従来知られるマイトマイシンC製剤に比べ、マイトマイシンCの血中濃度の持続が達成されることが明白である。

また、対照試料を投与した直後の極めて高いマイトマイシンC濃度は検体試料では観察されず、毒性の発現という観点でも望ましいものであった。

#### 試験例 4 : 腫瘍部位への薬物移行性

実験動物として ddY 系雄性マウス (体重約 25g) を用い、S-180 腫瘍細胞を皮下投与した後、約 10 日後、検体試料または対照試料を尾静脈より静脈内投与した。投与量は遊離のマイトマイシンC換算として 5 mg/kg とした。30 分後固形腫瘍摘出しポモジナイズし、腫瘍中の総マイトマイシンC濃度 (マイトマイシンC換算) を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。その結果を表 4 に示した。

(以下次頁)

表4 腫瘍中の総マイトマイシンC濃度

	総マイトマイシンC濃度
検体試料	0.84 ± 0.22
対照試料	0.15 ± 0.08

(平均±標準偏差 n=3)

検体試料を投与した場合の腫瘍中マイトマイシンC濃度は、対照試料よりも高いことが示された。

本発明の脂肪乳剤は従来知られるマイトマイシンC製剤に比べ、顕著な腫瘍部位への集積性を有し、より有効で安全な薬物療法が達成されることが明白である。

試験例5：マイトマイシンC誘導体からのマイトマイシンCの生成

ノニルオキシカルボニルマイトマイシンC（誘導体1）、N-（ノニルオキシカルボニル）グリシルマイトマイシンC（誘導体2）、及び、N-（コレステリルオキシカルボニル）グリシルマイトマイシンC（誘導体3）からのマイトマイシンCの生成を表5に示した。

ddY系マウスの皮下で増殖させたS-180固形腫瘍およびヌードマウスの皮下で増殖させた人由来の固形腫瘍細胞（MX-1）を摘出し等張リン酸緩衝生理食塩水を用いてそれぞれ10%ホモジネートを作製した。これに、それぞれのマイトマイシンC誘導体を最終濃度として10 $\mu$ Mとなるように加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした後、遊離したマイトマイシンCを高速液体クロマトグラフィーにて

測定した。

いずれのマイトマイシンC誘導体も腫瘍中で活性型である遊離のマイトマイシンCを生成することが明かである。またこれらの遊離のマイトマイシンCの生成は、添加した誘導体の分解と量的関係が完全に対応していた。

これらの誘導体は、マイトマイシンCのプロドラッグとしての性質を備えていることが確かめられた。

また、遊離のマイトマイシンCの生成速度は、個々の誘導体によって異なり、N-(ノニルオキシカルボニル)グリシルマイトマイシンC(誘導体2)が誘導体1及び誘導体3に比べ速やかにマイトマイシンCを遊離した。人由来の腫瘍細胞においても同様であった。

表5 マイトマイシンCの生成(%)

	S-180	MX-1
誘導体1	3.0	5.7
誘導体2	16.0	11.4
誘導体3	10.7	8.3

#### 試験例6：粒子径の測定

製造例2及び製造例3の乳剤粒子の粒子径について、レーザー光による動的光散乱粒子径測定装置を用いその粒子径について評価した。

その結果、製造例2の平均粒子径は、約150～250nmであり、1 $\mu$ 以上の粒子を含まなかった。製造例3の平均粒子径は、約20～100nmであり、1 $\mu$ 以上の粒子を含まな

った。

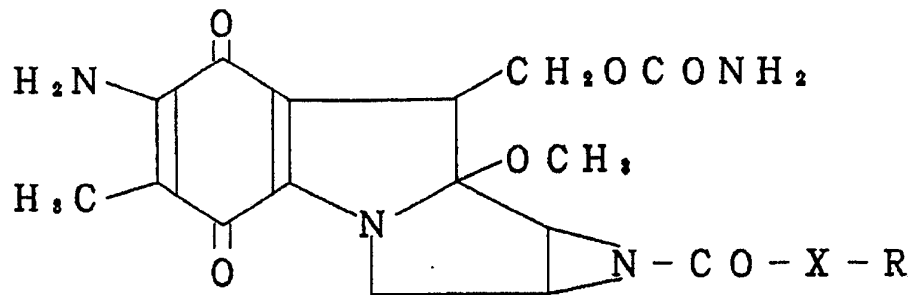
本発明の脂肪乳剤はきわめて微細で、均一な乳剤粒子よりなり、静脈内に投与する際、毒性上問題となる $1\mu$ 以上の粒子をも含まないので、有効で安全な薬物療法が達成されることが明白である。

#### 産業上の利用可能性

— 以上のように、本発明によれば、マイトマイシンCのプロドラッグであるマイトマイシンC誘導体〔I〕を注射剤として安全に有効量投与することができることから、医薬品産業において有用である。

## 請求の範囲

1. (a) 全体の 0.001~10% (w/v) の、次の一般式〔I〕



〔I〕

〔式中、Xは、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$  又は、  
 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCOO}-$  を表し、nは、0~4の整数  
 を表し、Rは、炭素数3~25の、直鎖又は分岐した、鎖状  
 又は環状の、飽和又は不飽和の炭化水素を表す。〕

で表わされるマイトマイシンC誘導体、

(b) 全体の 0.5~30% (w/v) の単純脂質、

(c) 単純脂質に対して 0.05 ~ 2倍 (重量比) のリン脂質、

及び、

(d) 適当量の水

の上記(a)、(b)、(c)、及び(d)を含有することを特徴とする脂  
 肪乳剤、又はその凍結乾燥製剤。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00006

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl <sup>5</sup> A61K31/40, A61K9/107, A61K9/127, A61K9/14				
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>				
Classification System	Classification Symbols			
IPC	A61K31/40, A61K9/107, A61K9/127, A61K9/14			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>				
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>				
Category <sup>*</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>		
A	Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Vol. 33, No. 7, (1985), H. Sasaki et al. Blood Dispositions of Mitomycin C and a Lipophilic Prodrug after Intravenous Administration in Liposomes and O/W Emulsion , p. 2968 - 2973	1		
A	JP, A, 60-115517 (Bayer A.G.), June 22, 1985 (22. 06. 85) & US, A, 4711902 & EP, A, 143305	1		
P	Journal of Organic Chemistry, Vol. 55, No. 9, (1990), P.D. Senter et al. Development of a drug-release strategy based on the reductive fragmentation of benzyl carbamate disulfides , p. 2975 - 2978	1		
P	JP, A, 2-167217 (Shiseido Co., Ltd.), June 27, 1990 (27. 06. 90), Upper left column, page 3,	1		
<p><sup>*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>			
<b>IV. CERTIFICATION</b>				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
March 27, 1991 (27. 03. 91)	April 8, 1991 (08. 04. 91)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
Japanese Patent Office				

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
upper column, page 8 (Family: none)	
<b>V. <input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup></b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claim numbers _____, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> Claim numbers _____, 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. <input type="checkbox"/> Claim numbers _____, because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).	
<b>VI. <input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup></b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.	
2. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:	
3. <input type="checkbox"/> 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 claim numbers:	
4. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.	
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 91/00006

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>8</sup> A61K31/40, A61K9/107, A61K9/127, A61K9/14		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	A61K31/40, A61K9/107, A61K9/127 A61K9/14	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 第33巻, 第7号, (1985), H. Sasaki, et al [Blood Dispositions of Mitomycin C and a Lipophilic Prodrug after Intravenous Administration in Liposomes and O/W Emulsion], p. 2968-2973	1
A	JP, A, 60-115517 (バイエル・アクチエン・ゲゼルシャフト), 22. 6月. 1985 (22. 06. 85) & US, A, 4711902 & EP, A, 143305	1
P	Journal of Organic Chemistry, 第55巻, 第9号, (1990), P.D. Senter, et al [Development of a drug-release strategy based on the reductive fragmentation of benzyl carbamate disulfides], p.2975-2978	1
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
27. 03. 91	08.04.91	
国際調査機関	権限のある職員	4 0 7 2 5 2
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 佐伯 とも子	

第2ページから続く情報

( 頁欄の続き )

P JP, A, 2-167217 (株式会社 資生堂),  
27. 6月. 1990 (27. 06. 90),  
第3頁左上欄, 第8頁上欄 (ファミリーなし)

1

V.  一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度に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。
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI.  発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
3.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
4.  追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたため、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。