(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4256930号
(P4256930)
(45)発行日　平成21年4月22日(2009.4.22)　(24)登録日　平成21年2月6日(2009.2.6)

(51)Int.Cl.　F I
A61K 31/7028 (2006.01)　A61K 31/7028
A61K 9/127 (2006.01)　A61K 9/127
A61K 47/22 (2006.01)　A61K 47/22
A61P 35/00 (2006.01)　A61P 35/00

請求項の数 18　(全 15 頁)

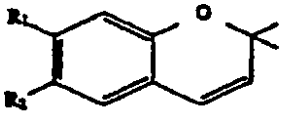
(21)出願番号　特願平7-514856
(86)(22)出願日　平成6年11月25日(1994.11.25)
(65)公表番号　特表平8-506124
(43)公表日　平成8年7月2日(1996.7.2)
(86)国際出願番号　PCT/ES1994/000127
(87)国際公開番号　WO1995/014459
(87)国際公開日　平成7年6月1日(1995.6.1)
審査請求日　平成13年3月14日(2001.3.14)
審判番号　不服2007-16334(P2007-16334/J1)
審判請求日　平成19年6月11日(2007.6.11)
(31)優先権主張番号　P9302481
(32)優先日　平成5年11月25日(1993.11.25)
(33)優先権主張国　スペイン(ES)

(73)特許権者
リポテック，エス．アー．
スペイン国　イー―０８９０２　ロスピタレット　デロブレガット　サンタ　ユーラリア　２３６―２４０
(74)代理人
弁理士　狩野　彰
(74)代理人
弁理士　岸田　正行
(74)代理人
弁理士　水野　勝文
(74)代理人
弁理士　高野　弘晋
(74)代理人
弁理士　水本　敦也

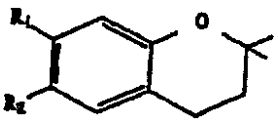
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ドキソルビシンを被包するリポソーム

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
脂質類、ドキソルビシン及び一般式ＡもしくはＢ：

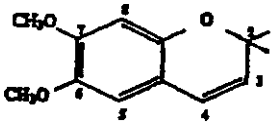


A

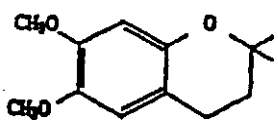


B

の化合物を含み、ここに式中、R_1およびR_2は、等しいことも異なることもあり、そして、ＨＯ－、CF_3CH_2O－及びCH_3O－から成る群からそれぞれ独立に選ばれることを特徴とする、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項２】
前記化合物が式１もしくは５：



1

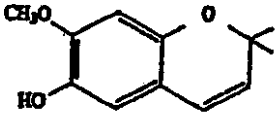


5

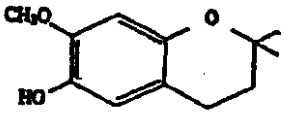
から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。

【請求項３】

前記化合物が式２もしくは６：



2

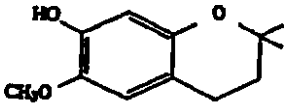


6

から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。

【請求項４】

前記化合物が式７：

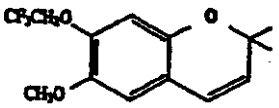


7

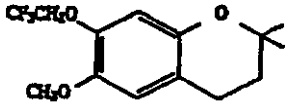
から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。

【請求項５】

前記化合物が式３もしくは８：



3

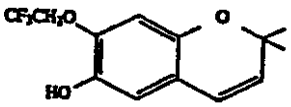


8

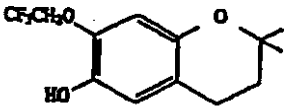
から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。

【請求項６】

前記化合物が式４もしくは９：



4



9

から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。

【請求項７】

リポソームを形成する全脂質類とドキソルビシンとの比率が２０：１と２：１との間であることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。

【請求項８】

リポソームを構成する脂質類成分がコレステロール及びリン脂質類であり、当該リン脂質類が天然起源のリン脂質類、合成由来のリン脂質類およびそれらの混合物とから成る群から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。

【請求項９】

リン脂質類が、陰性荷電のリン脂質類と中性のリン脂質類との混合物であることを特徴と

する、請求項８に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１０】
中性リン脂質類と陰性荷電のリン脂質類との比率がそれぞれ１０：２と１０：１０との間であることを特徴とする、請求項９に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１１】
全脂質類の量に対するコレステロールの比率が０と５０％との間であることを特徴とする、請求項８に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１２】
全脂質類に対する前記化合物の比率が、０．０１％と１５％との間であることを特徴とする、請求項１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１３】
リポソームを形成する全脂質類とドキソルビシンとの比率が（好ましくは）１０：１であることを特徴とする、請求項７に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１４】
中性リン脂質類と陰性荷電のリン脂質類との比率が（好ましくは）それぞれ１０：７と１０：１０との間であることを特徴とする、請求項１０に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１５】
全脂質類の量に対してコレステロールの比率が３５％と５０％との間であることを特徴とする、請求項１１に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１６】
全脂質類に対して前記化合物の比率が０．１％と１０％との間であることを特徴とする、請求項１２に記載の、ドキソルビシンを被包するリポソーム。
【請求項１７】
有効成分として請求項１から１６のいずれか１つに記載のリポソームを含有させた、人又は他の動物における悪性の腫瘍の治療の薬剤。
【請求項１８】
有効成分として請求項１から１６のいずれか１つに記載のリポソームを含有させた、ドキソルビシンの毒性を減少させる薬剤。
【発明の詳細な説明】
発明の要約
本発明は、抗腫瘍剤に関し、詳しくは前記薬剤の毒性を減少させるための抗フリーラジカル剤を含むリポソーム内への、同薬剤の被包に関する。
発明の背景
抗生物質であるドキソルビシン（ＤＸＲ）およびその誘導体は、他のカチオン性アンスラサイクリンと同様に、白血病および充実性腫瘍を初めとする癌の治療において、最近、臨床上大いに興味を集めている。
その上、リポソームの利用に関しては、生物活性試薬の輸送系としての大きな期待が集まっている。これらの系においては、薬剤が親水性である場合にはその薬剤はリポソームの水性部分内にとり込まれ、また、その薬剤がより強い親油性を示す場合にはその薬剤はリポソームの水性部分と脂質類二重層との間に分散される。一旦薬剤が被包されれば、その薬剤を治療すべき患者に投与することができる。
抗腫瘍剤を投与する多くの場合にリポソームを利用することにより、従来からの投与法が改善されることが様々な研究者により確立されている。例えば、Gabizon et al.:Cancer Res.（1982）42,4734-4739およびVan Hossel et al.:Cancer Res.（1984）44,3698-3705を参照せよ（両引用文献とも引用することにより本明細書に取り込まれる）。
様々な動物モデルを利用することにより、リポソーム内にドキソルビシンを被包すると慢性および急性の二次毒性効果が有意に減少することが観察されている。一例としては、Rahman et al.:Cancer Res.（1980）40,1532-1537、Forssen et al.:Proc.Nat1.Acad.Sci.USA（1981）78,1873-1877、Olson et al.:Eur.J.Cancer Clin.Oncol.（1982）18,167-176

、Rahman et al.:＂Cancer Res.（1985）45,796-803、およびGabizon et al.:J.Natl.Cancer Inst.（1986）77,459-467、を参照せよ（これら全ての引用文献は引用することにより本明細書に取り込まれる）。その上、脱毛、体重減少、悪心、嘔吐、および更に溢血により生じる皮膚の壊死のような毒性の他の兆候も、ドキソルビシンをリポソーム内に収容して投与することにより有意に減少することができる。Forssen et al.:Cancer Treat.Rep.（1983）67,481-484（この引用文献は引用することにより本明細書に取り込まれる）、およびこの段落においてこれまでに引用されている引用文献も参照せよ。

更に、係る毒性の有意な減少は、抗腫瘍効力の減少という犠牲の上に生じているものではないということが様々な腫瘍モデルにおいて立証されている。既述の引用文献に加えて、Rahman et al.:Chemoter,Pharmacol.（1986）16,22-27、Gabizon et al.:Cancer Res.（1983）43,4730-4735およびBr.J.Cancer（1985）51,681-689、Maythew et al.:J.Natl.Cancer Inst.（1987）78,707-713、Forssen et al.:Cancer Res.（1983）43,546-550、およびStorm et al.:Cancer Res.（1987）47,3366-3362も参照せよ（これら全ての引用文献は、引用することにより本明細書に取り込まれる）。

ドキソルビシンでの治療に際して観察される心筋症は、α－トコフェロール欠乏症を示す実験動物の心筋において見られる病変に似ている（Tomasz:Chem-Biol Interact.（1976）13,89）。これらの結果により、この薬剤により引き起こされる病変は、皮膜の脂質類が関与していると見られているフリーラジカル反応の増加により引き起こされることが示唆される。従って、リポソームの脂質類二重層内へドキソルビシン（今後ＤＸＲという）を取り込ませることによりフリーラジカルタイプの反応を容易に回避することができる。

ＤＸＲを含有するリポソーム内にα－トコフェロールを取り込ませることにより、動物体内の毒性を低減し、α－トコフェロール／ＤＸＲもしくはリポソーム／ＤＸＲの組合せ物を別々の形で投与する場合と比べて心筋症の発症率がより低くなることが観察されている。Olson et al.:Eur.J.Clin.Oncol.（1982）12（2）.167（この引用文献は、引用することにより本明細書に取り込まれる）。α－トコフェロールとＤＸＲとをリポソーム内に一緒に被包することにより達成される毒性の低下は、その薬剤をリポソーム内に被包したことによるその薬剤の生物分散の変化と、フリーラジカルがα－トコフェロールに捕獲されることにより生ずるそれらのフリーラジカルによる損傷効果の低減、との組合せから生じた結果であるものと思われる。

リポソーム内への抗フリーラジカル剤を組込むことについては様々な特許に記載されている。それらの特許とは、

国際公開第８５／００９６８号、国際公開第８５／０４５７８号、
国際公開第８７／０２２１９号、国際公開第８７／０４５９２号、
国際公開第８８／０９１６８号、および欧州特許第２７４１７４号

である（これらの引用文献は全て、引用することにより本明細書に取り込まれる）。

引用した大部分の特許においては、α－トコフェロールの存在が共通して請求の範囲とされており、α－トコフェロールの塩および／またはエステルと、Ｎ－アセチルシステイン、ナイアシン、インクエン酸もしくはＢＨＴのような他の化合物でさえも請求の範囲となっていた。

従って、脂質過酸化の阻害剤としての活性が改善される化合物の探索が研究の活発な分野になっている。この意味において、フリーラジカル除去の優れた活性を有するビタミンＥの類似ファミリーがBattoni et al.:Biochem.Biophys.Res.Commun.（1991）174,1103により記載されている。この特許内の同じ文脈中に、２，２－ジメチルクロメン類およびクロマン類の構造を有する化合物類の脂質過酸化の活性を阻害することについて記載されており、それらは、アンスラサイクリンがリポソーム内に取り込まれる調製物を安定化に応用すると、その結果として、その薬剤の所望されない効果を顕著に減少する可能性がある。

発明の要約

当該技術分野における前述の状況を考慮して、一般式ＡもしくはＢ（図１）である脂質過酸化の阻害剤を含むリポソーム中にアンスラサイクリンを取り込む処方を取得することが、本発明の広い目的である。

本発明の一つの目的は、脂質類と薬剤との両方の過酸化効果を実質的に減少させる、アンスラサイクリンをリポソーム内に収容した組成物を提供することである。
本発明の基本的な目的は、酸化反応およびフリーラジカルに関連する薬剤の毒性を減少させる目的で、ドキソルビシン、その塩、および類似化合物をリポソーム中に収容した組成物を取得することである。
本発明の最終目的は、ヒトの新生物、具体的には、肝臓における原発性もしくは転移性腫瘍、増殖性造血性疾患および白血病を、薬剤の通常の副次効果を有意に減少させるリポソーム内に被包されたＤＸＲで治療するための方法を提供することである。
本発明は、以下に記載される事柄を特徴とするリポソームの形成を含む。
ａ）脂質類濃度が１０mg/mlと１００mg/mlとの間、好ましくは約５０mg/ml。
ｂ）構成成分としての脂質類が天然起源および合成起源の両方のリン脂質類、ならびにコレステロールである。
ｃ）脂質類総量に対するコレステロールの比率は０％と５０％との間、好ましくは３５％と５０％との間である。
ｄ）提示されるリン脂質類は、実効電荷を示さないホスファチジルコリンおよび陰性に荷電している他のリン脂質類であり、好ましくはホスファチジルグリセロールである。
ｅ）陰性荷電物と中性リン脂質類との比率は各々１０：２と１０：１０との間であり、好ましくは１０：７と１０：１０との間である。
ｆ）脂質類に対する一般式ＡもしくはＢ（図１）の保護剤の比率は、0.01%と１５％との間である。
ｇ）リポソームは、水溶液中に形成され、緩衝化されていてもいなくてもよく、生理学的に等張である。例えばＮａＣｌが0.9%である。
このようにして得られる、ドキソルビシンを被包するリポソーム懸濁液の特徴は、以下に列挙するとおりである。
ａ）それらのリポソームは上で引用された特徴を取り込んでいる。
ｂ）被包される薬剤のパーセンテージは当初の量の７０％と９０％との間である。
ｃ）リポソーム懸濁液は、安定であり、再現性があり、且つ、そのサイズおよび被包されるドキソルビシンの量の面で産業化することが可能である。
ｄ）リポソーム懸濁液は、これらの条件下において、癌治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

図１は、脂質過酸化の阻害剤として調査したクロメン類（１－４）、クロマン類（５－９）、および対照化合物ＢＨＴ（１０）の式を示している。
図２は、濃度１５、１、６および５μＭにおけるそれぞれクロメン類５、６、８および９により示される、ＮＡＤＰＨを加えてインキュベートしたラット肝臓ミクロソーム中における脂質過酸化の阻害におけるインキュベーション時間に対する効果のグラフである。
図示される値は、実施した６重試験の決定値の平均値±ＳＤ（標準偏差）である。連続する時間の間に違いが生じる場合、星印をつけた。
＊・・Ｐ＜0.001、＊＊・・Ｐ＜0.005。
図３は、大豆ホスファチジルコリンのリポソーム中での脂質過酸化の増加を、ＵＶ－Ｃ照射時間および親油性抗酸化剤の存在量の関数として示したグラフである。
図４は、Ｌ（Ｃ６）、Ｌ（Ｃ６）－ＤＸＲ及びＦ－ＤＸＲを腹膜内投与した場合の健康なＢＡＬＢ／Ｃラットの生存率曲線を示す。
図５は、Ｌ（Ｃ６）、Ｌ（Ｃ６）－ＤＸＲ及びＦ－ＤＸＲの静脈内投与した場合の健康なＢＡＬＢ／Ｃラットの生存率曲線を示す。
図６は、Ｌ（Ｃ６）、Ｌ（Ｃ６）－ＤＸＲ及びＦ－ＤＸＲの腹膜内投与した場合の健康なＢ６Ｄ２Ｆ１ラットの生存率曲線を示す。
本明細書および図面において、略語は以下に示す意味を有する。

DXR	ドキソルビシン
PC	ホスファチジルコリン
PL	卵の水素化済みリン脂質類

DPPC　ジパルミトイルホスファチジルコリン
PG　ホスファチジルグリセロール
DPPG　ジパルミトイルホスファチジルグリセロール
CHOL　コレステロール
F-DXR　遊離のDXR
L-DXR　リポソーム内に被包してあるDXR
L（C6）-DXR　クロマン６を含むリポソーム内に被包したDXR
L（C6）　クロマン６を含むリポソーム（DXRは含まない）

発明の詳細な説明

ドキソルビシン（ＤＸＲ）を含むリポソームの調製

ａ）脂質類構成成分

リポソームを形成する脂質類は広く知られている。一般的に、脂質類には、実効電荷が中性および／または陰性であるリン脂質類、ならびにコレステロールのようなステロールが含まれる。上記の脂質類の選定は、リポソームの最終的なサイズ、被包すべき薬剤、およびその調製物に所望される安定性に関する必要事項に基づいて実施する。

通常、リポソームの内で最も多い脂質類成分はホスファチジルコリン（ＰＣ）である。ＰＣの内でも、それらのアシル基の長さおよび飽和度が異なったものがあり、それらは天然もしくは合成原料から単離することができる。

陰性に荷電したリン脂質類が含まれているとリポソーム溶液の安定化には都合がよく、リポソームの自発的な凝集が防がれる。中でも最も多く利用される陰性荷電のリン脂質は、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）、ホスファチジルセリン（ＰＳ）およびホスファチジルイノシトール（ＰＩ）である。

中性リン脂質類と陰性荷電リン脂質類との使用比率は、各々１０：２から１０：１０までの範囲である。

コレステロールが含まれていると、一般的にはリポソームの安定化に都合がよく、イオンおよび極性小分子に対する膜透過性が減少し、そして同様に、二重層の乱雑さをより大きくする要因となる一連の蛋白質の浸透能力が減少する。典型的には、利用されるコレステロールの比率は全脂質類量の０％から５０％までである。

ｂ）脂質過酸化の阻害剤

脂質類の過酸化反応の阻害剤として本発明に記載される化合物は、それぞれ一般式ＡおよびＢ（図１）の一連の２，２－ジメチルクロメン類およびクロマン類であり、そしてこれらが図１に示される化学式（１－９）に相当するものであることが好ましい。これらの中からフッ素化物（具体的には、化合物３、４、８および９）はこれまでの刊行物に記載されてはいない。

本発明の実施例１において得られた結果を考慮すると、上記の引用した化合物が示す脂質過酸化に対する強い阻害効果が十分に実証されている。その上、選択した位置にフッ素置換基を導入することによる酸化的代謝に対して保護することと、Ｃ６位置に遊離のヒドロキシル基を存在させること（既に存在しているか、あるいは代謝的脱アルキル化により潜在的能力により産生される）を適切に組み合わせることにより、より持続する固有の活性を示す脂質過酸化の阻害剤（すなわち化合物６および９）が誘導されるか、あるいは、代謝依存性がより強い化合物５および８の抗酸化効果が誘導される。

ＤＸＲの毒性を減少させる目的でこの種の化合物をリポソーム中に入れて利用することは、実施例４および５に明瞭に例証してある。被包されているＤＸＲの毒性は、ＤＸＲを含むリポソーム中にクロマン６が含まれている場合は、クロマン６を含まない場合と比較して、有意に減少することが判明した（図６）。

ｃ）リポソームの調製

好ましい方法は、Bangham et al.が記載する方法であって（J.Mol.Biol.（1964）8,660-668）（この引用文献は、引用することにより本明細書に取り込まれる）、この方法においては多重層リポソーム（ＭＬＶ）は不均一なサイズで取得される。この方法において構成脂質類は適切な有機溶媒に溶解され、その後この有機溶媒は減圧下回転式蒸発法により除

去される。形成される脂質類フィルムは、手動もしくは機械的震盪により、薬剤を含む適切な水性培地を用いる水和処理（hydratation）に供する。このＭＬＶの不均質懸濁液には、サイズの減少および均質化についての既知のいずれの技術も適用される。例えば２つの好ましい方法は、ＶＥＴリポソームを取得する目的でＭＬＶ溶液を、チタン探針を使用する超音波処理する方法、あるいはポリカーボネートフィルター通す押し出す方法である。

本発明の範囲を制限することなく、より詳細に説明するために、実施例を以下に記載する。

実施例１

ａ）ラット肝臓ミクロソーム内での脂質過酸化の評定

インキュベーション。Sprague-Dawley種の雄ラットの肝臓ミクロソームのクレブス－リンゲル（Krebs-Ringer）（KRP）リン酸緩衝液中の懸濁液を、Fraga et al.:Free RadicalBiol.Med.（1988）4,155-161の方法に従って調製した。酵素的に誘導される脂質過酸化の実験として、１mlのＫＲＰ緩衝液中でミクロソーム蛋白質（２mg）を、評定すべき化合物を適切な濃度で含む0.1mMのＮＡＤＰＨと２μｌのＤＭＳＯとの存在下において、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーションを３時間にまで延長させた実験においては、ＮＡＤＰＨ（２mM濃度）を毎時間0.1mlそのインキュベーション培地に添加した。化学的に誘導される脂質過酸化の実験として、１mlのＫＲＰ緩衝液中で２mgのミクロソーム蛋白質を、評定すべき化合物を適切な濃度で含む５０μMのFeS0４、0.5mMのアスコルビン酸、および２μｌのＤＭＳＯの存在下において、３７℃で３０分間インキュベートした。全ての場合において、0.2mlの４％ＢＨＴを添加することによりインキュベーションを停止した。

TBARSテスト。インキュベーションが完了した時点で脂質過酸化を、Fraga et al.（Free Radical Biol.Med.（1988）4,155-161）（この引用文献は、引用することにより本明細書に取り込まれる）に記載の要領でチオバルビツール酸（TBARS）と反応する物質の産生量により評定した。簡潔に述べると、ミクロソームインキュベーション培地0.5mlに対して３％ドデシル硫酸ナトリウム0.5mlという比率で添加した。これらを混合した後、0.1ＮのＨＣｌを２ml、タングストリン酸0.3mlおよび２－チオバルビツール酸１mlを添加した。この混合物を３０分間１００℃に維持し、そしてＴＢＡＲＳを3mlの１－ブタノールで抽出した。遠心分離後に、ブタノール相の蛍光は、５１５nmで励起させ５５５nmで読みとることにより決定した。得られた値をＴＢＡＲＳのナノモル数として表示した（マロンジアルデヒド等量）。マロンジアルデヒドの標準液は、１，１，３，３－テトラメトキシプロパンから調製した。実験は３重試験で実施した。IC_{50}の値は、少なくとも５つの異なる濃度を用いて、ｌｏｇ［Ｉ］に対する阻害のパーセンテージの表現により決定した。阻害パーセンテージの値をＤＭＳＯ（２μｌ）の存在下において実施した決定値とみなした。表Ｉには、ＮＡＤＰＨによって誘発され又はＦｅ－アスコルビン酸によってシミュレートされたラット肝臓ミクロソームのインキュベーションの際に、フッ素化され（fluorated）ているかもしくはされていない幾つかの２，２－ジメチルクロメン類およびクロマン類が示す脂質過酸化の阻害の結果が示されており、ＴＢＡＲＳの産生阻害についてのIC_{50}値として表現されている。

ＢＨＴすなわち化合物１０についての値も、効果の比較用として決定した。

表Ｉ

ＴＢＡＲＳ産生のＩＣ$_{50}$値（μＭ）

化合物	ＮＡＤＰＨ	Ｆｅ－アスコルビン酸
1	11.4	(35%)[a]
2	1.4	3.8
3	55.4	ＮＤ[b]
4	3.7	6.0
5	15.0	(17%)[a]
6	0.3	1.9
7	3.4	19.0
8	6.0	(5%)[a]
9	3.9	5.3
１０	0.8	2.7

a・・括弧内の値は 0.5 ｍＭの濃度において算出された阻害パーセンテージを示す。

b・・決定されず。

ＮＡＤＰＨを加えてインキュベートした際に、２，２－ジメチルクロメン類およびクロマン類ファミリーにより引き起こされるラット肝臓ミクロソーム中の脂質過酸化の阻害が、ビタミンＥの作用様式で作用するものに類似する、フリーラジカルの脱離メカニズムよるという仮説は、本発明において示される結果に基づくものである。従って、フッ素化されていない誘導体に関しては、脂質過酸化がＦｅ－アスコルビン酸により誘発される場合には、遊離のヒドロキシル基を有するもの（すなわち、２、６、および７）のみが有望な阻害効果を示したに過ぎなかった（表Ｉ）。これらの誘導体は、効果を示すものの、その効果はＮＡＤＰＨを使用した試験において得られるものと比較すると６倍低いものであった。同じ様な関係は、比較のために試験した化合物であるＢＨＴ（１０）の場合にも得られており、ここで観察される違いは２方法の間の本質的な違いが原因となっていることが示されている。その上、Ｆｅ－アスコルビン酸を加えてインキュベートした際には脱アルキル化的代謝作用が存在しないため、フェノール性の種の形成が妨害されており、その結果、６，７－アルコキシ誘導体（化合物１および５）は前記条件下において不活性となっていた。

ヒドロキシクロマン６は、ＮＡＤＰＨを加えてインキュベートした際に起こったのと同様に、Ｆｅ－アスコルビン酸を用いた場合にも最大の阻害力（ＩＣ$_{50}$＝1.9μＭ）を示し、その活性はやはりＢＨＴのもの（ＩＣ$_{50}$＝2.7μＭ）よりも勝っていた。その上、化合物６により生じる阻害が化合物７の場合より桁違いの大きさであるという事実（このことはＮＡＤＰＨを用いる検査で生じたことである）は、強力な抗酸化効果にとってはＣ６位の遊離のヒドロキシル基が重要であることを示している。これらの結果は、ビタミンＥの場合に似た作用メカニズムの、前記の仮説と一致する。

フッ素化クロメン類については、ＮＡＤＰＨを加えてインキュベートした場合では、ヒドロキシ誘導体４が最大の阻害活性を示した（表Ｉ）。従って、ＮＡＤＰＨを加えてインキュベートした際、上記誘導体が代謝産物として検出されれば、６，７－ジアルコキシクロ

メン３が示す阻害活性を正当化することができる。Ｆｅ－アスコルビン酸を加えてインキュベートした場合は、上記の化合物４が、フッ素化されていない化合物２の場合に近い阻害活性を示した。
フッ素化クロマン類に関しては、クロマン８（IC_{50}＝6.0μＭ）により示される阻害活性はクロメン３（IC_{50}＝55.4μＭ）に相当するものより９倍大きいことが観察された。その上、化合物８とフッ素化されていないその類似化合物５との阻害活性を比較したところ、Ｃ７位にフッ素置換基が存在することにより脂質過酸化の阻害効果が改善されたことが示されていた。更に、クロマン８はそれ自体阻害活性を示さないことを簡潔に記載する価値がある（Ｆｅ－アスコルビン酸を加えて行ったインキュベーション、表Ｉを参照せよ）。実施した研究によれば、クロマン９が前者の代謝産物として存在していることが実証された。ＮＡＤＰＨを加えて行ったインキュベーションの際には、試験したフッ素化クロマンの内でヒドロキシル基を有する誘導体９が最高の阻害活性（IC_{50}＝3.9μＭ）を示したことから、この概念が６，７－ジアルコキシクロマン８により示される有望な阻害活性の原因であるとして再確認された。
その上、Ｆｅ－アスコルビン酸の存在下に行ったインキュベーションの際には、ヒドロキシル基を有する誘導体フッ素化物９はそれ自体脂質過酸化の阻害物であることが確認された（IC_{50}＝5.3μＭ）。しかしながら、この化合物の阻害活性はヒドロキシクロマン６により示されるものより僅かながら劣っていた。
前述の結果から、２，２－ジメチルクロマン類は、フッ素化されていてもいなくても、それらに対応する２，２－ジメチルクロメン類よりも高い脂質過酸化の阻害活性を示すことを演繹することができる。それ故、阻害活性の持続性を研究する目的でこれらの四種のクロマン類（すなわち、化合物５、６、８および９）を選択した。これらの阻害剤を、それら各々のIC_{50}値付近の濃度を採用してＮＡＤＰＨの存在下において３時間以上別々にインキュベートし、得られた結果を図２に示した。フッ素化されていない化合物の場合には、クロマン５により示される阻害活性は一定の値のままであるのに対して、ヒドロキシクロマン６の活性はインキュベーション２時間および３時間の後には有意に減少する。この低下は、インキュベーション培地中に前記の化合物により生じる不活化代謝の結果である可能性がある。その上、ジアルコキシクロマン５の活性が全ての実験を通して本質的に不変のままであるという事実により、前記化合物からの抗酸化剤のような活性種、すなわち代謝産生物６が定常的に産生されていることが示唆される。その結果、化合物５を、内在的に持続性の活性機構を有する脂質過酸化の阻害剤として、利用することが可能である。
フッ素化誘導体に関しては、クロマン８により生じる阻害効果はインキュベーション２時間目には僅かに高くなっており、このことにより活性種、すなわちヒドロキシルを有する誘導体９が持続的に産生されることが示唆される。この化合物が化合物８の代謝産生物であると同定することにより、この仮説が裏付けられている。３時間目に阻害活性が有意に低下しているのは、抗酸化活性を有する種の形成を誘導する脱アルキル化代謝の減速が原因であると思われる。表示したその低下が、インキュベーション１時間目について決定した阻害値パーセントと比較した場合には、有意なものではない（ｐ＞0.005）ことを記載するのは興味深い。従って、このフッ素化されたクロマンは、持続性活性機構を有する脂質過酸化の有望な阻害剤であることを示している。
更に、化合物９の阻害活性は、ヒドロキシクロマン６の場合に観察されたように、インキュベーション２時間目および３時間目に減少する。しかしながら、この減少は化合物６について得られたものほど顕著なものではなく、このことにより活性種は、インキュベーション培地中で、より持続的であることが示される。
ｂ）リポソーム中での脂質過酸化の評価
次に、微細な改変事項を加えて、Pelle et al.:Annals of the New York Academy of Sciences（1989）570,491-494（この引用文献は、引用することにより本明細書に取り込まれる）の提案するモデルに従って、大豆のレシチン２７mgを秤量し、そしてｐＨ7.4のリン酸緩衝液（ＰＢＳ）1.5mlを添加した。脂質過酸化からの保護剤として研究されている化合物を、存在するレシチンが１％モル溶液となるのに必要な量のエタノール中に溶解させ

て添加した。全ての場合において、１分間機械的に震盪することにより多重層リポソームを取得した。
いったん取得後、抗酸化剤を取り込んでいるリポソームと、取り込んでいないリポソームとの、両方のリポソームをＵＶ－Ｃ照射（２５４nm）に曝した。抗酸化剤を含まず、かつ、その照射に曝していない試料を対照として調製した。ＵＶ－Ｃ照射は、それによりＵＶ－Ｂのものに類似する効果を遥かに短い時間で生じるという理由で採用した。例えば、１時間のＵＶ－Ｃ照射は７時間のＵＶ－Ｂ照射に匹敵する効果を生じる。
ＵＶ露出の間、脂質過酸化の量を決定する目的で、部分サンプルを様々な時刻に採取した。
ＴＢＡＲＳテスト。
脂質過酸化を実施して、チオバルビツール酸（ＴＢＡＲＳ）と反応する物質の産生量の増加を分光光度測定により決定した。簡便に記載すると、リポソーム懸濁液0.2ml、２０％トリクロロ酢酸３ml、および１％チオバルビツール酸１mlを１００℃で２５分間インキュベートした。その後これを２０００rpmで１０分間遠心分離し、そして５３２nmにおける吸光度を決定した。
図３に示されるように、照射済みリポソームは、対応するＵＶ－Ｃ照射に供していない類似対照物と比較して脂質過酸化物の産生量がより多くなっていた。このモデルを利用して、クロマン６により誘導される脂質過酸化に対する保護力を、親油性抗酸化剤として認められているビタミンＥ－酢酸化合物およびＢＨＴと比較した。この結果、検査した濃度においては、クロマン６およびＢＨＴは、同程度の脂質過酸化の内在的な阻害性を有し、ビタミンＥ－酢酸化合物の場合より顕著に優れていることが示された。
実施例２
ＤＸＲを被包するリポソームの調製
選択した脂質類（表II）および7.5mgのクロマン６を含むクロロホルム溶液を丸底フラスコ内に調製した。その後、回転式蒸発法により有機溶媒の除去を行い、さらに微量の溶媒をN_2の通気によりもしくは凍結乾燥により除去した。このようにして得られた脂質類フィルムは、ＤＸＲを含む0.9%NaCl溶液３mlを用い、ボルテックスミキサー中において３０秒間隔で震盪することにより水和させ、そしてその後に６０℃の恒温槽内に同じ時間静置し、そして１０分間震盪を実施した。このようにして、好ましくは多重層小胞（ＭＬＶ）を含むリポソーム分散液が得られた。このリポソーム溶液に、濁度の変化が観察されるまでチタン探針による超音波放射による音波処理を施した。音波処理の手順は、氷水槽内かつN_2雰囲気下で、２分間の音波処理と１分間の静止期を交互に行って実施した。超音波処理の間に生じるチタンの粒子を除去する目的で、この溶液を３０００rpmで２０分間遠心分離処理した。このようにして、小さな単層リポソーム（ＳＵＶ）を含むリポソーム懸濁液が得られた。
別に、既述の要領で取得された多重層リポソームの懸濁液を、順に孔径0.4μmおよび0.2μmのポリカーボネート製フィルターを通して押し出し、ＶＥＴと名付けたリポソームを取得した。
ＤＸＲの被包率の決定は、0.9%NaClを用いた溶離液としてのセファデックス（Sephadex）Ｇ－５０Ｍの手段によりリポソーム懸濁液の一部分をクロマトグラフィー法分離することにより実施した。
表IIには、利用した様々な方法および組成物についての被包の結果が示されている。これらの所見により、陰性荷電を有するリン脂質類を混入することが高い被包率を得るには必須であることが注目される。従って、ＭＬＶもしくは中性のＳＵＶリポソームにおいては、コレステロールが存在していてもしていなくても、被包されるＤＸＲ量はその薬剤の初期量の最高１５％に達する。それとは対照的に、脂質類組成中にホスファチジルグリセロールが含まれる場合には、被包値は、ホスファチジルグリセロール：ＤＸＲの比を５：1.5に一定のまま維持して実施した全ての試験において８０％を上回っていた。ＤＸＲの比率が５：３に上昇した場合には、被包される薬剤の減少が生じ、このことによりリポソームの調製に際しては、被包すべきＤＸＲに対しては陰性荷電を有する最低量のリン脂質類

が存在する必要性が確認された。
更に、採用した方法の場合では、天然起源（水素化されていてもいなくても）および合成物のリン脂質類は、共に類似の被包結果を生じるということが観察された。

表Ⅱ

種類	組　　成	比率(mg)	被包率(%)
MLV	PC:DXR	150:15	10
MLV	PC:CHOL:DXR	100:50:15	14
MLV	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	80
SUV	PC:CHOL:DXR	100:50:15	15
SUV	PL:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	88
SUV	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	90
SUV	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:30	55
SUV	DPPC:DPPG:CHOL:DXR	50:50:50:15	85
VET	PL:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	87
VET	PC:PG:CHOL:DXR	50:50:50:15	89
VET	DPPC:DPPG:CHOL:DXR	50:50:50:15	87

この実験は、7.5mgのクロマン６の存在下において実施した。

実施例３

ＤＸＲを被包するリポソームの調製

実施例２において記載されたのと類似する方法で、ＰＬ：ＰＧ：ＣＨＯＬ：ＤＸＲの重量比として５０：５０：５０：１５を用い、且つ、使用する抗酸化剤を変化させつつ、ＶＥＴリポソームの取得を行った。得られた結果からは、様々な脂質過酸化阻害剤を用いても、被包率には認識できるほどの違いが見られなかった（表III）。

表Ⅲ

種類	化合物	被包率(%)
VET	1	８９
VET	2	８５
VET	3	８７
VET	4	８４
VET	5	８６
VET	6	８７
VET	7	８８
VET	8	９０
VET	9	８３

組成：　PL:PG:CHOL:DXR(50:50:50:15)

実施例４

インビボでの調査（Ｉ）。

実施例１における要領で、ＰＬ：ＰＧ：ＣＨＯＬ：ＤＸＲ（５０：５０：５０：１５）組成とクロマン６（7.5mg）組成のＶＥＴリポソームを調製した。

腹膜経路による接種。

腹膜経路により健康なＢＡＬＢ／Ｃラットに前記調製物を用いて処理を施し、そしてその生存率曲線を、同一用量（１８mg／kg）の遊離の薬剤を投与した場合と比較した（図４）。この実験においては、ＤＸＲを含むリポソームに相当する同一特性を示しかつ同一の脂質類濃度であるが、その薬剤は含まないリポソーム調製物が対照として含まれていた。

静脈内投与による接種。

健康なＢＡＬＢ／Ｃラットに、静脈内経路により既述のＬ－ＤＸＲの調製物を用いて処理

を施し、そして同一用量（１６mg／kg）での遊離薬剤の投与した場合と生存率曲線を比較した（図５）。この実験においては、ＤＸＲを含むリポソームに相当する同一特性を示し、かつ脂質類濃度は同一であるがその薬剤は含まないリポソーム調製物が対照として含まれていた。

腹膜内接種および静脈内接種の両方における生存率曲線から得られる結果により、リポソーム自体すなわち前記薬剤を含まないものには毒性が存在しないことが示された。同様に、ＤＸＲをリポソームに取り込んで投与した際には死亡例は全く生じなかった。それとは対照的に、ＤＸＲの同一用量を遊離形態で腹膜内もしくは静脈内接種した際には、投与後２週間の間に１００％の死亡率が観察された。

実施例５

インビボでの調査（II）

実施例１と同様にして、ＰＬ：ＰＧ：ＣＨＯＬ：ＤＸＲ（５０：５０：５０：１５）およびクロマン６（7.5mg）組成のＶＥＴリポソームを調製した。

同様にして、抗酸化剤を取り込まないでＰＬ：ＰＧ：ＣＨＯＬ：ＤＸＲ（５０：５０：５０：１５）の組成のＶＥＴリポソームを調製した。

静脈内投与による接種。

健康なＢ６Ｄ２Ｆ１ラットに、腹膜内経路によりクロマン６を含むＬ－ＤＸＲの調製物で処理した。そして、その生存率曲線（図６）を、抗酸化剤は含まないで被包した同一用量（２４mg／kg）の薬剤を投与した場合と比較した。この実施例においては、対照として、薬剤は含まないがクロマン６は含み、ＤＸＲを含む前記のリポソームに相応するものと同じ特性を持ち、且つ、同一の脂質類濃度を持つリポソームの調製物が組み込まれていた。

上記の生存率曲線から得られる結果により、リポソーム自体、すなわち薬剤を含まないもの、には毒性が存在しないことが示された。同様に、クロマン６が存在しない場合の生存率２０％からそれが存在する場合の生存率６０％に変化したように、クロマン６を含むリポソーム調製物の場合はＤＸＲ毒性が明らかに減少することが観察された。

以上、好ましい態様のみを特に具体的に例証し、説明したが、本発明の精神および意図する範囲から逸脱することのない限り、上記の教示の範囲内且つ添付した請求の範囲内で、本発明の多くの応用および変更が可能であることが認識されるものとする。

【図１】

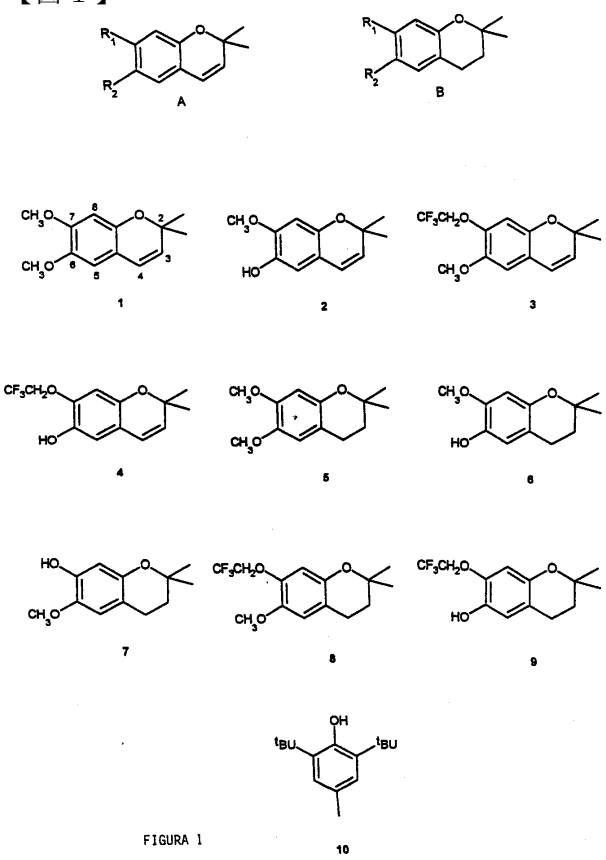


FIGURA 1

【図２】

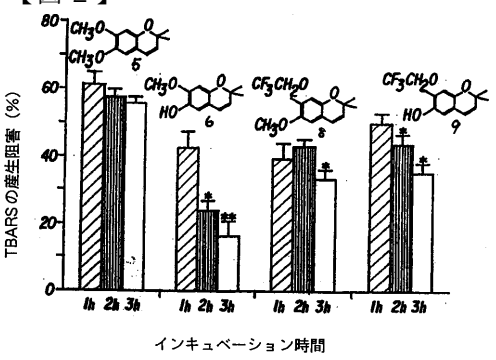


FIGURE 2

【図３】

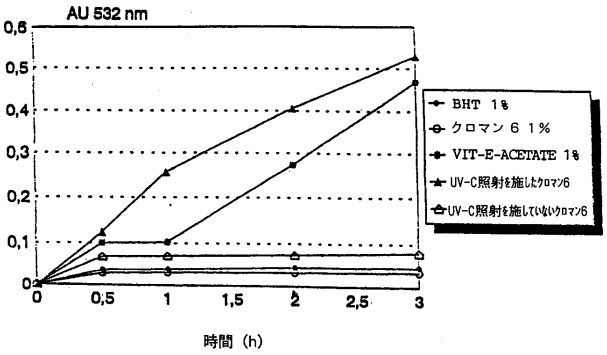


FIGURE 3

【図４】

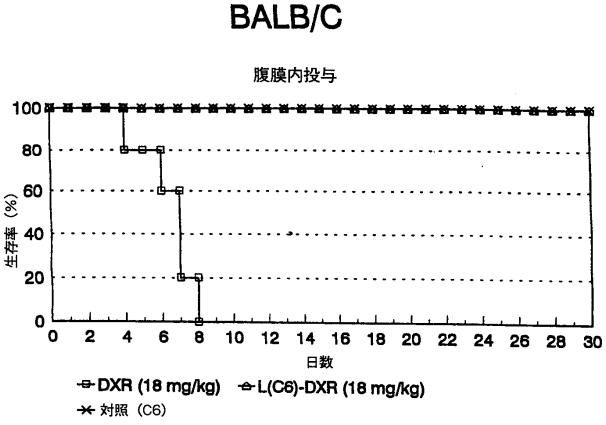


FIGURE 4

【図５】

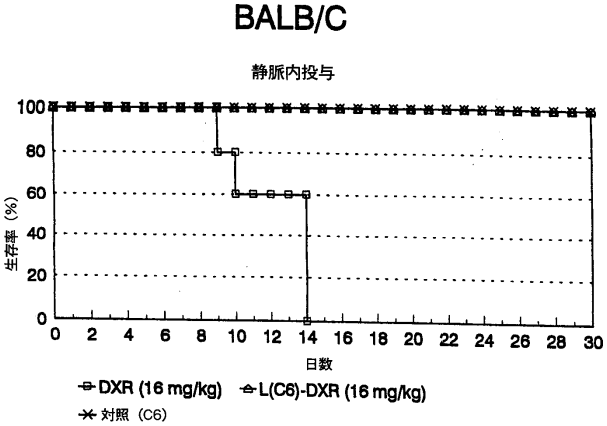


FIGURE 5

【図６】

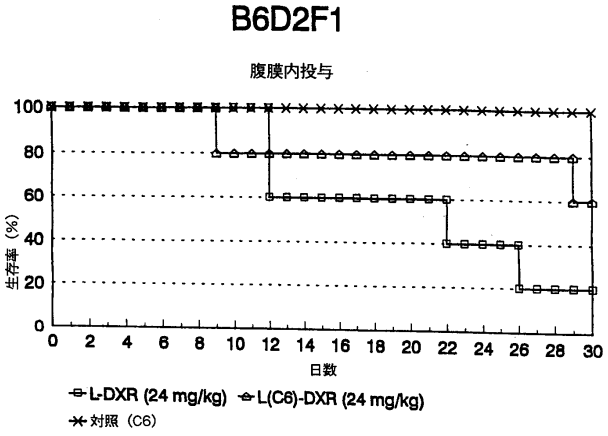

B6D2F1
腹膜内投与
生存率（%）
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
日数
L-DXR (24 mg/kg)
L(C6)-DXR (24 mg/kg)
対照（C6）

FIGURE 6

フロントページの続き

(74)代理人
弁理士 新部 興治
(72)発明者 ポンズ ランビエズ, フェルナンド
スペイン国 イー－０８７５０ モリンズ ピンター フォーチュニー ２８－３０
(72)発明者 デルガード ゴンザレツ, ラケル
スペイン国 イー－０８０３１ バルセロナ ペドレト ５
(72)発明者 パレンテ デュエナ, アントニオ
スペイン国 イー－０８９６０ サン ジュスト デスヴェルン パセージ キャン サグレラ １７－２１

合議体
審判長 森田 ひとみ
審判官 弘實 謙二
審判官 星野 紹英

(56)参考文献 国際公開第８５／００９６８（WO, A1）
特開昭６３－２５８４２３（JP, A）
Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ, 英国, Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ Ｌｔｄ, １９９３年9月, Ｖｏｌ. １, Ｎｏ. ３, ２１９－２２５
Ｊ. Ａｇｒｉｃ. Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍ., 米国, Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ, １９９２年, Ｖｏｌ. ４０, ５８５－５９０
Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ｒｅｓ. Ｃｏｍｍｕｎ., 米国, Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ, Ｉｎｃ. １９９１年2月14日、Ｖｏｌ. １７４, Ｎｏ. ３, １１０３－１１０８
Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ, ｂｅｉｋｏｋｕ, １９８５年2月25日, Ｖｏｌ. ２６０／Ｎｏ. ４, ｐ. ２１９１－２１９６

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K31/00,9/127
C07D311/72
CAS(STN)
REGISTRY(STN)