

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3955992号  
(P3955992)

(45) 発行日 平成19年8月8日(2007.8.8)

(24) 登録日 平成19年5月18日(2007.5.18)

(51) Int. Cl.		F I
<b>CO8G 81/00</b>	<b>(2006.01)</b>	CO8G 81/00
<b>CO8G 65/32</b>	<b>(2006.01)</b>	CO8G 65/32
<b>A61K 31/282</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 31/282
<b>A61K 31/785</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 31/785
<b>A61K 33/24</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 33/24

請求項の数 15 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-516235 (P2005-516235)  
 (86) (22) 出願日 平成16年12月8日(2004.12.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2004/018679  
 (87) 国際公開番号 W02005/056641  
 (87) 国際公開日 平成17年6月23日(2005.6.23)  
 審査請求日 平成18年11月21日(2006.11.21)  
 (31) 優先権主張番号 特願2003-412315 (P2003-412315)  
 (32) 優先日 平成15年12月10日(2003.12.10)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 899000024  
 株式会社東京大学TLO  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号  
 (74) 代理人 100060782  
 弁理士 小田島 平吉  
 (72) 発明者 片岡 一則  
 東京都中野区上鷲宮5-17-22  
 (72) 発明者 西山 伸宏  
 東京都台東区東上野5-7-3 セブンス  
 ターマンション上野604  
 (72) 発明者 カブラル ホラシオ  
 東京都北区中里3-23-18-105  
 (72) 発明者 岡崎 総一郎  
 静岡県焼津市小土1131-1 ソフィア  
 M205号室

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジアミノシクロヘキサン白金 (I I) とポリ (カルボン酸) セグメント含有ブロック共重合体との配位錯体、その抗腫瘍剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ジアミノシクロヘキサン白金(II)と、一般式(A):

PEG - block - ポリ(carbo) (A)

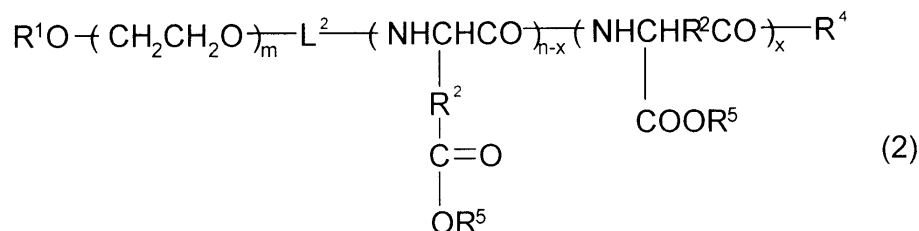
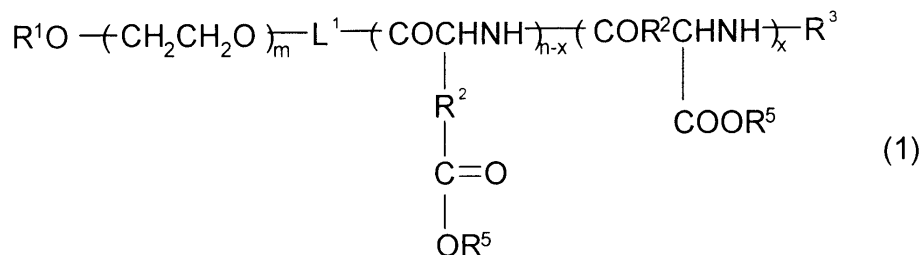
(式中、PEGはポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを表し、そしてポリ(carbo)はポリ(グルタミン酸)鎖セグメントおよびポリ(アスパラギン酸)鎖セグメントからなる群より選ばれるカルボキシル基有するポリマー鎖セグメントを表す。)

で示される構造を含んでなるブロック共重合体との配位錯体であって、ポリ(carbo)のカルボキシルアニオンと白金との結合を介してジアミノシクロヘキサン白金(II)が該ブロック共重合体に固定化されている配位錯体。

【請求項2】

ブロック共重合体が、下記一般式(1)または(2)またはそれらの塩である請求項1記載の配位錯体:

## 【化1】



上式中、 $R^1$ は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の $C_{1-12}$ アルキル基を表し、 $L^1$ は $-(CH_2)_b-NH-$ を表し、 $b$ は1～5の整数であり、 $L^2$ は $-(CH_2)_c-CO-$ を表し、 $c$ は1～5の整数であり、 $R^2$ はメチレン基またはエチレン基を表し、 $R^3$ はそれぞれ独立して、水素原子、ベンジルオキシカルボニル基、 $t$ -ブチルオキシカルボニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルカルボニル基、ベンズヒドリルカルボニル基、アクリロイル基およびメタクリロイル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し、 $R^4$ はそれぞれ独立して、ヒドロキシ基、ベンジルオキシ基、 $t$ -ブチルオキシ基、メトキシ基、ベンズヒドリルオキシ基、アリルオキシ基およびビニルフェニルメトキシ基からなる群より選ばれる基を表し、 $R^5$ はそれぞれ独立して水素原子、アルカリ金属のイオン、ベンジル基、ベンズヒドリル基および $C_{1-6}$ アルキル基からなる群より選ばれる基を表し、 $m$ は5～20,000の整数であり、 $n$ は2～5,000の整数であり、但し、 $x$ は0～5,000の整数であるが、 $x$ は $n$ より大きくなく、そして $n-x$ および $x$ 個の $R^5$ 中、水素原子またはアルカリ金属のイオンが50%以上を占める。

## 【請求項3】

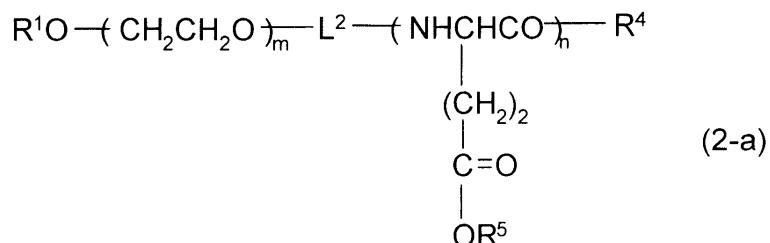
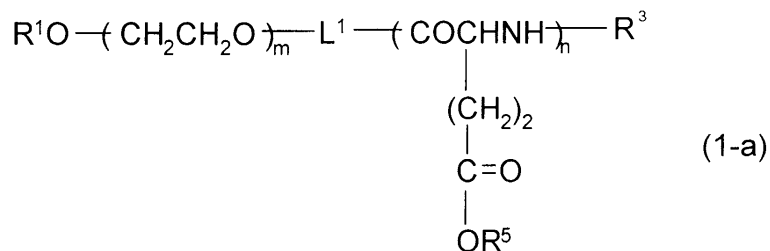
ブロック共重合体の構造が、下記一般式(1-a)または(2-a)で表される請求項1記載の配位錯体：

10

20

30

## 【化2】



上式中、 $R^1$ は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の $C_{1-12}$ アルキル基を表し、 $L^1$ は $-(CH_2)_b-NH-$ を表し、 $b$ は1~5の整数であり、 $L^2$ は $-(CH_2)_c-CO-$ を表し、 $c$ は1~5の整数であり、 $R^3$ はそれぞれ独立して、水素原子、ベンジルオキシカルボニル基、 $t$ -ブチルオキシカルボニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルカルボニル基、ベンズヒドリルカルボニル基、アクリロイル基およびメタクリロイル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し、 $R^4$ はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基、ベンジルオキシ基、 $t$ -ブチルオキシ基、メトキシ基、ベンズヒドリルオキシ基、アリルオキシ基およびビニルフェニルメトキシ基からなる群より選ばれる基を表し、 $R^5$ はそれぞれ独立して水素原子、アルカリ金属のイオン、ベンジル基、ベンズヒドリル基および $C_{1-6}$ アルキル基からなる群より選ばれる基を表し、 $m$ は5~20,000の整数であり、 $n$ は2~5,000の整数であり、但し、 $n$ 個の $R^5$ 中、水素原子またはアルカリ金属のイオンが50%以上を占める。

## 【請求項4】

一般式(1-a)または(2-a)における $R^5$ の全てが水素原子またはアルカリ金属イオンを表す請求項3に記載の配位錯体。

## 【請求項5】

錯体が、水または、無機もしくは有機緩衝剤の水性媒体中で、ポリ(エチレングリコール)鎖セグメントをシェルとし、ポリ(グルタミン酸)鎖セグメントおよびポリ(アスパラギン酸)鎖セグメントからなる群より選ばれるポリマー鎖セグメントをコアとするナノ粒子にジアミノシクロヘキサン白金(II)が内包された形態にある、請求項1に記載の配位錯体。

## 【請求項6】

ジアミノシクロヘキサン白金(II)の白金(Pt)対該ブロック共重合体のカルボキシル基の当量比(Pt/COO<sup>-</sup>)が0.3~1である請求項1に記載の配位錯体。

## 【請求項7】

ジアミノシクロヘキサン白金(II)と、一般式(1-a)または(2-a):

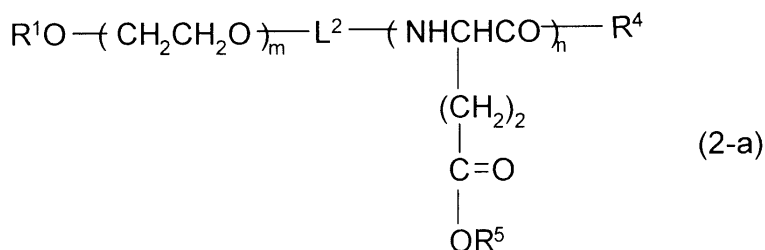
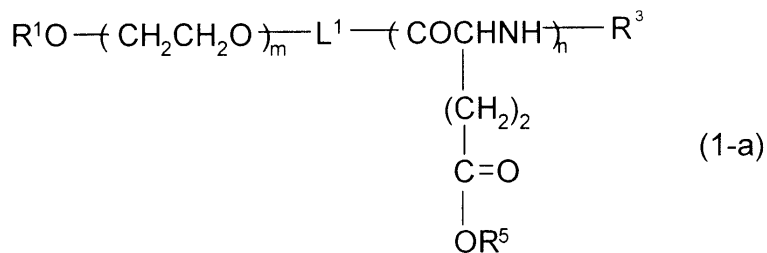
10

20

30

40

## 【化3】



(上式中、 $R^1$ は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の $C_{1-12}$ アルキル基を表し、 $L^1$ は $-(CH_2)_b-NH-$ を表し、 $b$ は1~5の整数であり、 $L^2$ は $-(CH_2)_c-CO-$ を表し、 $c$ は1~5の整数であり、 $R^3$ はそれぞれ独立して、水素原子、ベンジルオキシカルボニル基、 $t$ -ブチルオキシカルボニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルカルボニル基、ベンズヒドリルカルボニル基、アクリロイル基およびメタクリロイル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し、 $R^4$ はそれぞれ独立して、ヒドロキシ基、ベンジルオキシ基、 $t$ -ブチルオキシ基、メトキシ基、ベンズヒドリルオキシ基、アリルオキシ基およびビニルフェニルメトキシ基からなる群より選ばれる基を表し、 $R^5$ はそれぞれ独立して水素原子、アルカリ金属のイオン、ベンジル基、ベンズヒドリル基および $C_{1-6}$ アルキル基からなる群より選ばれる基を表し、 $m$ は5~20,000の整数であり、 $n$ は2~5,000の整数であり、但し、 $n$ 個の $R^5$ 中、水素原子またはアルカリ金属のイオンが50%以上を占める。)

で示される構造を含んでなるブロック共重合体との配位錯体であって、一般式(1-a)または(2-a)で表されるブロック共重合体のカルボキシルアニオンと白金との結合を介してジアミノシクロヘキサン白金(II)が該ブロック共重合体に固定化されており、ジアミノシクロヘキサン白金(II)の白金(Pt)対該ブロック共重合体のカルボキシル基の当量比(Pt/COO<sub>-</sub>)が0.3~1である配位錯体。

## 【請求項8】

ジアクオジアミノシクロヘキサン白金(II)錯体(Diaquo DACH Platin)と、一般式(A):



(式中、PEGはポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを表し、そしてポリ(carbo)はポリ(グルタミン酸)鎖セグメントおよびポリ(アスパラギン酸)鎖セグメントからなる群より選ばれるポリマー鎖セグメントを表す。)

で示される構造を含んでなるブロック共重合体を、水性溶媒中で、Diaquo DACH Platin(II)の白金(Pt)と該ブロック共重合体のカルボキシルアニオンとの結合を形成することのできる、該Pt対該カルボキシル基の当量比及び条件下で反応させ、こうして得られるジアミノシクロヘキサン白金(II)と該共重合体との配位錯体を回収することを特徴とする請求項1に記載の配位錯体の製造方法。

## 【請求項9】

Diaquo DACH Platinが、水性溶媒中で、ジクロロ(1,2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II)と硝酸銀とを反応させ、副生成物である塩化銀を除去して得られる水溶液中に存在するものである、請求項8に記載の製造方法。

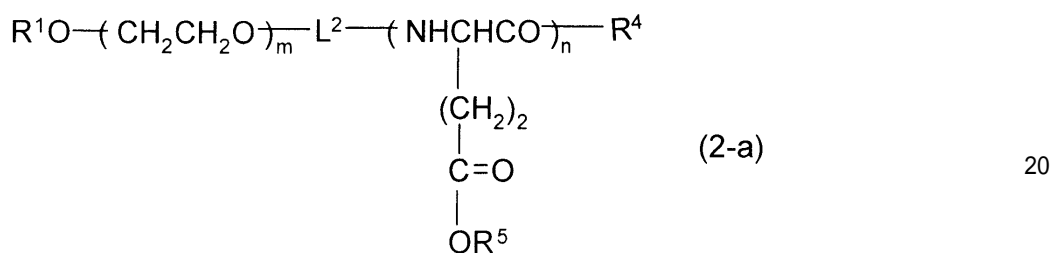
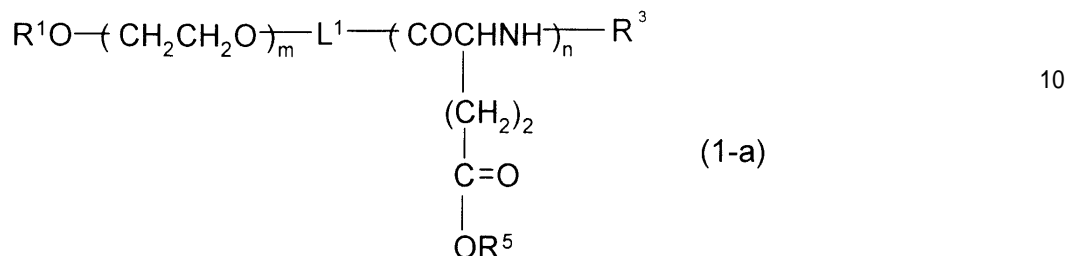
## 【請求項10】

Ptとカルボキシル基の当量比が、0.1以上であり、そして反応温度5～60 である、請求項8に記載の製造方法。

## 【請求項11】

ブロック共重合体の構造が、下記一般式(1-a)または(2-a)で表される請求項8に記載の製造方法：

## 【化4】



上式中、 $R^1$ は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の $C_{1-12}$ アルキル基を表し、 $L^1$ は $-(CH_2)_b-NH-$ を表し、 $b$ は1～5の整数であり、 $L^2$ は $-(CH_2)_c-CO-$ を表し、 $c$ は1～5の整数であり、 $R^3$ はそれぞれ独立して、水素原子、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブチルオキシカルボニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルカルボニル基、ベンズヒドリルカルボニル基、アクリロイル基およびメタクリロイル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し、 $R^4$ はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基、ベンジルオキシ基、t-ブチルオキシ基、メトキシ基、ベンズヒドリルオキシ基、アリル 30 オキシ基およびビニルフェニルメトキシ基からなる群より選ばれる基を表し、 $R^5$ はそれぞれ独立して水素原子、アルカリ金属のイオン、ベンジル基、ベンズヒドリル基および $C_{1-6}$ アルキル基からなる群より選ばれる基を表し、 $m$ は5～20,000の整数であり、 $n$ は2～5,000の整数であり、但し、 $n$ 個の $R^5$ 中、水素原子またはアルカリ金属のイオンが50%以上を占める。

## 【請求項12】

ジアミノシクロヘキサン白金(II)と、一般式(A)：



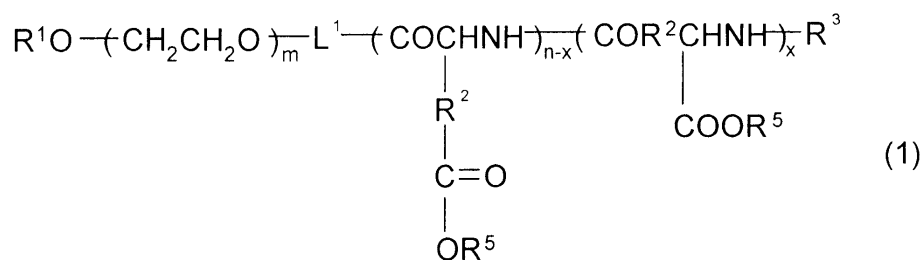
(式中、PEGはポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを表し、そしてポリ(carbo)はポリ(グルタミン酸)鎖セグメントおよびポリ(アスパラギン酸)鎖セグメントからなる群より 40 選ばれるカルボキシル基を有するポリマー鎖セグメントを表す。)

で示される構造を含んでなるブロック共重合体との配位錯体であって、ポリ(carbo)のカルボキシルアニオンと白金との結合を介してジアミノシクロヘキサン白金(II)が該ブロック共重合体に固定化されている配位錯体の抗腫瘍有効量と製薬学的に許容されるキャリアーを含んでなる抗腫瘍用組成物。

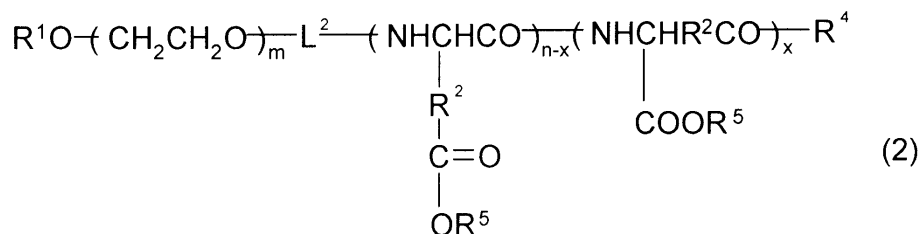
## 【請求項13】

ブロック共重合体が、下記一般式(1)または(2)またはそれらの塩である請求項12記載の抗腫瘍用組成物：

## 【化5】



10



上式中、 $R^1$ は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の $C_{1-12}$ アルキル基を表し、 $L^1$ は $-(CH_2)_b-NH-$ を表し、 $b$ は1～5の整数であり、 $L^2$ は $-(CH_2)_c-CO-$ を表し、 $c$ は1～5の整数であり、 $R^2$ はメチレン基またはエチレン基を表し、 $R^3$ はそれぞれ独立して、水素原子、ベンジルオキシカルボニル基、 $t$ -ブチルオキシカルボニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルカルボニル基、ベンズヒドリルカルボニル基、アクリロイル基およびメタクリロイル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し、 $R^4$ はそれぞれ独立して、ヒドロキシ基、ベンジルオキシ基、 $t$ -ブチルオキシ基、メトキシ基、ベンズヒドリルオキシ基、アリルオキシ基およびビニルフェニルメトキシ基からなる群より選ばれる基を表し、 $R^5$ はそれぞれ独立して水素原子、アルカリ金属のイオン、ベンジル基、ベンズヒドリル基および $C_{1-6}$ アルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し、 $m$ は5～20,000の整数であり、 $n$ は2～5,000の整数であり、但し、 $x$ は0～5,000の整数であるが、 $x$ は $n$ より大きくなく、そして $n-x$ および $x$ 個の $R^5$ 中、水素原子またはアルカリ金属のイオンが50%以上を占める。

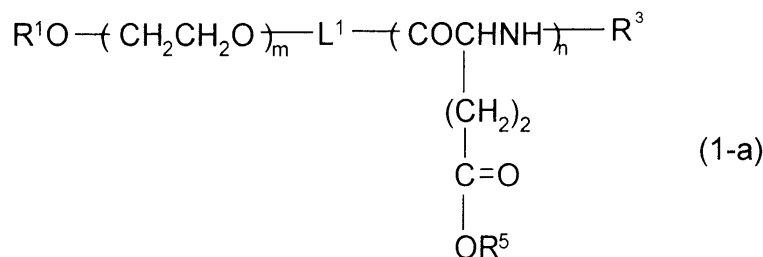
20

30

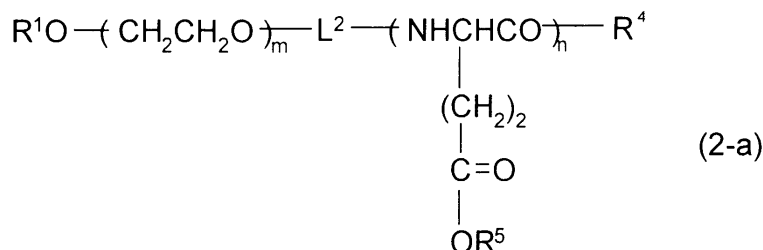
## 【請求項14】

さらに、抗腫瘍有効成分として、シスプラチンと、一般式(1-a)または(2-a)：

## 【化6】



10



(上式中、 $R^1$ は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の $C_{1-12}$ アルキル基を表し、 $L^1$ は $-(CH_2)_b-NH-$ を表し、 $b$ は1~5の整数であり、 $L^2$ は $-(CH_2)_c-CO-$ を表し、 $c$ は1~5の整数であり、 $R^3$ はそれぞれ独立して、水素原子、ベンジルオキシカルボニル基、 $t$ -ブチルオキシカルボニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルカルボニル基、ベンズヒドリルカルボニル基、アクリロイル基およびメタクリロイル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し、 $R^4$ はそれぞれ独立して、ヒドロキシ基、ベンジルオキシ基、 $t$ -ブチルオキシ基、メトキシ基、ベンズヒドリルオキシ基、アリルオキシ基およびビニルフェニルメトキシ基からなる群より選ばれる基を表し、 $R^5$ はそれぞれ独立して水素原子、アルカリ金属のイオン、ベンジル基、ベンズヒドリル基および $C_{1-6}$ アルキル基からなる群より選ばれる基を表し、 $m$ は5~20,000の整数であり、 $n$ は2~5,000の整数であり、但し、 $n$ 個の $R^5$ 中、水素原子またはアルカリ金属のイオンが50%以上を占める。)

20

30

で示されるブロック共重合体とのシスプラチンの配位錯体が組み合わされた、請求項12に記載の抗腫瘍用組成物。

## 【請求項15】

ジアミノシクロヘキサン白金(II)の配位錯体とシスプラチンの配位錯体の比が、白金の重量を基準にして、1/3~3/1で組み合わされる請求項14に記載の抗腫瘍用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

本発明は、ジアミノシクロヘキサン白金(II)とポリ(エチレングリコール)-ポリ(カルボン酸)ブロック共重合体との配位錯体、ならびに該配位錯体の製造方法および該配位錯体を有効成分として含んでなる抗腫瘍剤に関する。

40

## 【背景技術】

白金化合物であるシスプラチンやその類似体であるカルボプラチン(シスプラチンの離脱基であるジクロライドが1,1-シクロブタンジカルボキシレートで置換された化合物に相当する)は、特に生殖器官の癌に有効であるとして、早くより臨床使用されている。他方、シスプラチンの離脱基である二つのアミン基(またはアミノ配位子)のジアミノシクロヘキサン(以下、DACHともいう。)による置換誘導体〔ジクロロジアミノシクロヘキサンプラチン(Dichloro DACH platinum)〕が良好な抗腫瘍活性を有し、かつ、安定な錯体であることは知られている。しかし、かようなDACH白金錯

50

体は水に実質的に不溶性であることから、水溶性を改善すべく、該錯体のクロライド離脱基（または配位子）を多種多様なアニオン性配位子で置換した誘導体が提案されてきた。このような誘導体のあるものは、例えば、シスプラチン耐性L-1210白血病細胞に対して活性を示すことからさらに興味を持たれてきた。殊に、オキザレート置換DACH白金錯体は、良好な水溶性を示すと同時に、高い治療係数（therapeutic index）を有し、第三世代の抗腫瘍性白金化合物として臨床試験に供された（下記の非特許文献1、2および3参照）。

他方、上記誘導体の中には、オキザレートとは逆に、脂溶性を高めるために、2分子の高級脂肪酸によるカルボキシレート置換DACH白金錯体を合成し、それらを安定にリポソーム内に封入したりリポソーム複合体も提案されている（下記の非特許文献4参照）。

上記のオキザレート置換DACH白金錯体〔Pt(oxalato)-(dach)とも称する〕は、具体的には、非特許文献1の1856頁左欄で言及されているように、幾何異性体として、transおよびcis異性体が、さらにtrans異性体は2つの光学異性体として、trans-1およびtrans-d異性体も単離されている。これらのうちPt(oxalato)-(trans-1-dach)またはcis-[(1R,2R)-1,2-シクロヘキサンジアミン-N,N']オキザラト(2-)-0,0-白金(II)(オキサリプラチン(oxaliplatin)とも称されている)は、水溶性が高く7.5mg/mL(37における1.0M KCl水溶液中)の溶解性を示す。また、Pt(oxalato)-(dach)は、腹水肉腫ザルコーマー180を移植した実験動物にたいして優れたED<sub>50</sub>を示す。かようなオキサリプラチン(oxaliplatin)に対し、オキザレートと同様にジカルボン酸であるが、2つのカルボキシル基の間にメチレン基が1個加入されていることで異なるマロネートを配位子とするPt(malonato)-(dach)は、Pt(oxalato)-(dach)に比べて、ED<sub>50</sub>値を示すための薬物用量が約5倍以上になり(すなわち、薬効が五分の一以下になる)、治療係数がPt(oxalato)-(cis-dach)に比べて半分以下になることが報告されている(例えば、下記の非特許文献5参照)。

上記の様なDichloro DACH platinumの、所謂、低分子プロドラッグの他に、ポリマーを用いる高分子プロドラッグも提案されている(下記の非特許文献6参照)。非特許文献6には、かような高分子プロドラッグ系で用いることのできるポリマーの例として、ポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド](HPMA)、ポリ(L-グルタミン酸)、ポリ(エチレングリコール)-block-ポリ(アスパラギン酸)、酸化デキストラン(OX-Dex)等が挙げられているが、具体的には、酸化デキストランまたはカルボキシメチルーデキストラン(CM-Dex)を用いて作製したDACH白金錯体のポリマー複合体が提供されているだけである。さらに、非特許文献6には、OX-Dex複合体がCM-Dex複合体に比べて、血清含有媒体中での実験腫瘍細胞に対する残存細胞毒性活性がより長期にわたり存在し、かつ、より高い細胞毒性を示すことも記載されている。そしてこのようなOX-Dex複合体の優位性は、OX-Dexの方が、CM-Dexに比べて、DACH白金錯体とのより強い配位結合を形成し、かつ、担持ポリマーの立体障害がより大きいことによる旨の示唆もある。

#### 文献リスト

- 【非特許文献1】Olivier Rixe et al., Biochemical Pharmacology, Vol. 52, pp 1855 - 1865, 1996、特に、1855頁の要約部および1856頁左欄、典型的な誘導体については1862頁
- 【非特許文献2】Jean Louis Misset et al., Critical Reviews in Oncology/Hematology 35(2000)75 - 93
- 【非特許文献3】Eric Raymond et al., Molecular Cancer Therapeutics Vol. 1, 227 - 235, 2002 Polymer Preprints, Japan Vol. 51, No. 5(2002)
- 【非特許文献4】Roman Perez-Soler et al., Cancer

10

20

30

40

50

Chemotherapy and Pharmacology 33(1994)378-384

【非特許文献5】Yoshinori Kidani et al., American Chemical Society, vol. 21, 1315-1318, 1978特に、1317頁表IIIおよびIV

【非特許文献6】Y. Ohya et al., J. Biomater. Sci. Polymer Edn. Vol. 7, No. 12, pp. 1085-1096 (1996)

【発明の開示】

抗腫瘍性白金化合物として、オキザリプラチン(oxaliplatin)は、Dichloro DACH platinumに比べて、水溶性が著しく向上し、効能が高く、しかも治療係数が高く安全に使用できる抗腫瘍性化合物であることが示唆されている。しかし、もし可能であるなら、オキザリプラチンよりもさらに安全に使用できる抗腫瘍性白金化合物が提供できれば、癌化学療法 of 進歩に貢献できるであろう。

10

本発明者等の幾人かは、先に、シスプラチンとポリ(エチレングリコール)鎖のセグメントとポリ(グルタミン酸)鎖のセグメントを有するブロック共重合体との配位錯体(「シスプラチン内包ポリマーミセル」ともいう。)が、シスプラチンそれ自体に比べ、シスプラチンの体外排泄を有意に遅延させ(または薬剤の血中半減期の上昇をもたらす)、しかも、優れた抗腫瘍活性を示し、低減した毒性も示すことを見出し特許出願した(国際公開番号: WO 02/26241A1参照)。

他方、上述したとおりDACH白金錯体では、アニオン性離脱基または配位子として、オキザレートとを担持するPt(oxalato)-(dach)錯体よりも、カルボキシル基間が一個のメチレン基により離れているマロネートとを担持するPt(malonato)-(dach)錯体の方が抗腫瘍剤としての薬効が劣り、しかも治療係数も劣ることが知られている。なお、かかるポリマー複合体が臨床試験に供されていることを示唆する文献の存在を本発明者は知らない。

20

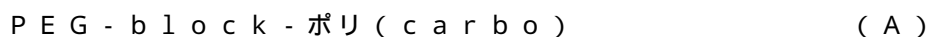
かような背景が存在するにも拘らず、本発明者等はDACH白金錯体とポリ(エチレングリコール)鎖のセグメントとポリ(グルタミン酸)鎖またはポリ(アスパラギン酸)鎖のセグメントを有するブロック共重合体との配位錯体(「DACH白金錯体内包ミセル」ともいう。)の合成を試みてみた。

その結果、意外にもDACH白金錯体内包ミセルは、その配位子(該共重合体)中のアニオン性離脱基としての2個のカルボキシレート(またはカルボキシルアニオン)基の間が、オキザレートに比べて遥かに離れているか、または無秩序であるにも拘らず、高い抗腫瘍効果を有し、血中半減期もオキザリプラチン(oxaliplatin)とは比較にならないほど上昇し、しかもシスプラチン内包ポリマーミセルに比べて、生理的条件を模した、10mMのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中で著しく長期にわたり安定なポリマーミセル構造を維持することが確認された。また、薬剤に結腸癌C-26細胞を長期間(48時間、72時間)さらした場合の増殖阻害活性(IC<sub>50</sub>)は、シスプラチン内包ポリマーミセルに比べDACH白金錯体内包ミセルの方が著しく高いことも確認できた。またさらに、カルボキシル基を側鎖に有する繰り返し単位がグルタミン酸以外のブロック共重合体であっても、場合によっては、DACH白金錯体内包ミセルに匹敵しうる作用効果を示すものがあることも見出した。

30

さらにまた、かようなDACH白金錯体内包ミセルとシスプラチン内包ポリマーミセルの組み合わせ使用は、相加ないし相乗的な抗腫瘍作用を示すことも確認された。

こうして、本発明は、ジアミノシクロヘキサン白金(II)と、一般式(A):



(式中、PEGはポリ(エチレングリコール)セグメントを表し、そしてcarboは側鎖にカルボキシル基を有する繰り返し単位を表す)

で示される構造を含んでなるブロック共重合体との配位錯体であって、carboのカルボキシル基と白金との結合を介してジアミノシクロヘキサン白金(II)が該ブロック共重合体に固定化されている配位錯体を、提供する。

50

また、かような配位錯体の製造方法、該配位錯体の抗腫瘍有効量と製薬学的に許容されるキャリアーを含んでなる抗腫瘍性組成物も提供される。また、かようなジアミノシクロヘキサン白金(II)の錯体の抗腫瘍有効量を、それを必要とする患者(哺乳動物、特にヒト)に投与することを含んでなる腫瘍の治療方法も本発明の一態様として提供される。前記抗腫瘍性組成物および腫瘍の治療方法では、上述したWO02/26241A1に記載されたシスプラチン内包ポリマーミセル(または共重合体とシスプラチンの錯体)を、さらに組み合わせて使用する態様の発明も提供される。

このような本発明に従う、配位錯体は、DACH白金錯体の誘導体の中でも最も優れた抗腫瘍剤といわれているオキサリプラチン(oxaliplatin)よりも有意に優れた特性を有するだけでなく、例えば、先に本発明者等の幾人かが開発したシスプラチン内包ポリマーミセルの生理学的環境下(体液中等)での安定性からも予期できない程のはるかに優れた安定性を示す一方で、有意に優れた抗腫瘍活性も示す。さらに、肝臓への滞積性は遊離のシスプラチン(またはシスプラチンそれ自体)とほぼ同等であるにも拘らず、腫瘍への集積性は遊離のシスプラチンとは比較できないほど高い値を示す。したがって、本発明によれば既知の、通常毒性の高いことが知られている、抗腫瘍性白金化合物に比べ、例えば、極めて安全に使用でき、かつ、抗腫瘍として効能の高い、特異なタイプのDACH白金錯体の誘導体が提供できる。

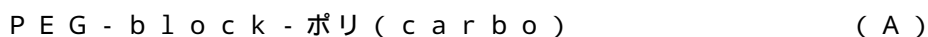
#### 本発明の具体的な記述

本発明に従う配位錯体は、Dichloro DACH platinumにおける離脱基(または配位子)クロライドがブロック共重合体の側鎖にカルボキシル基を有する1または2以上の繰り返し単位のカルボキシレート(またはカルボキシルアニオン)の少なくとも1個により置換されており、残りの離脱基はアクア化(水分子がその酸素原子の孤立電子対で白金イオンに配位している状態をいう)されていてよい。そして、上記のクロライドの2個が2個のカルボキシレートにより置換されている場合、該2個のカルボキシレートは単一のポリマー分子の隣接もしくは相当隔離したものに由来するか、または複数のポリマー分子に由来することができる。限定されるものでないが、該配位錯体の構造式およびそれらが水性媒体溶媒中で形成するとみなせるDACH白金錯体内包ミセルの概念図を図1に示す。

DACH白金錯体部分は、非特許文献1または4に記載されているとおり各種の異性体でありうるが、本発明の目的に従う限り、いずれか一種の異性体または各種異性体の混合物であることができる。

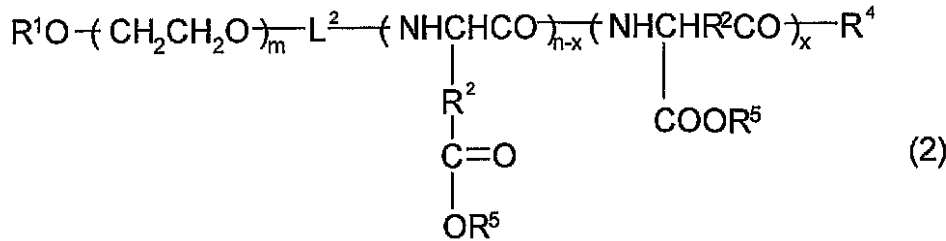
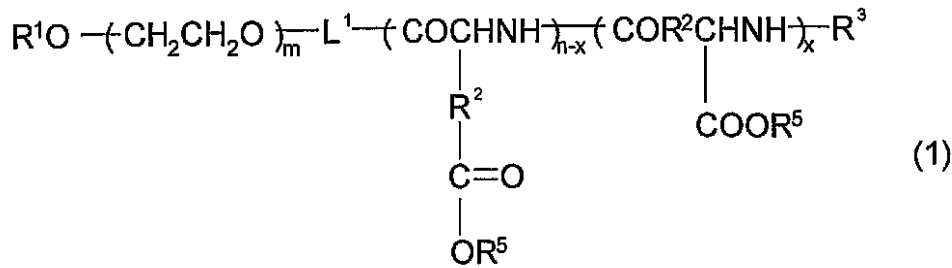
他方、上記の離脱基を置換するのに用いられるブロック共重合体は、親水性ポリマーセグメントとポリ(カルボン酸)セグメントを含んでなり、かつ、水性溶媒中でポリ(カルボン酸)セグメントのカルボキシレート(またはカルボキシルアニオン)がDACH白金錯体の白金(または白金イオン)と結合(所謂・配位結合)を形成できるものであれば、理論上いかなるブロック共重合体であってもよいが、好ましくは後述するものである。さらに、かかる共重合体は、水性溶媒中で親水性ポリマーセグメントからなる外層を形成するシェルとDACH白金錯体を固定したポリ(カルボン酸)セグメントからなる内部または中心層を形成するコアとのポリマーミセルを形成できるものが好ましい。

しかし、具体的には、親水性ポリマーセグメントとしてポリ(エチレングリコール)鎖またはポリ(エチレンオキシド)鎖セグメントを含んでなり、下記的一般式(A)で示されるブロック共重合体を挙げることができる。



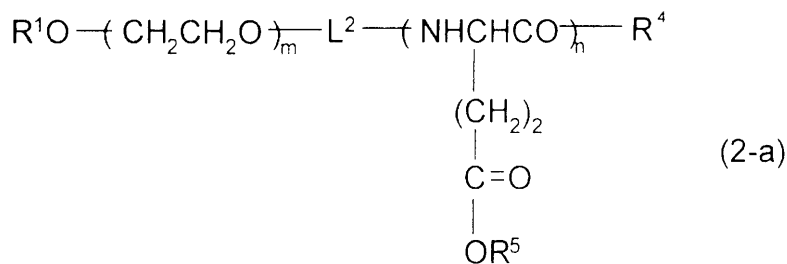
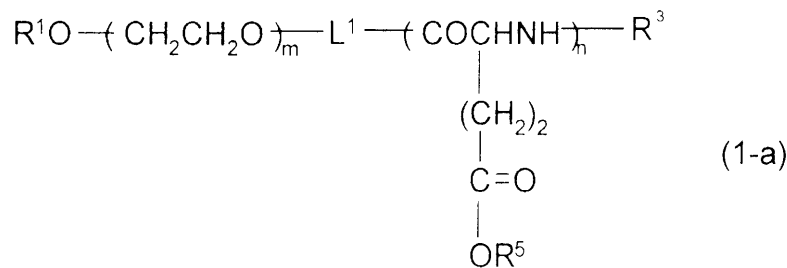
上式中、PEGはポリ(エチレングリコール)セグメントを表し、そしてcarboは側鎖にカルボキシル基を有する繰り返し単位を表す。該ポリ(carbo)は、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、からなる群より選ばれるポリマー鎖由来であることができる。

本発明の目的上より好ましいブロック共重合体としては、下記的一般式(1)または(2)で示されるものまたはその塩を挙げることができる。



上式中、 $R^1$  は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の  $C_{1-12}$  アルキル基を表し、 $L^1$ 、 $L^2$  は連結基を表し、 $R^2$  はメチレン基またはエチレン基を表し、 $R^3$  は水素原子、アミノ基の保護基、疎水性基または重合性基を表し、 $R^4$  はヒドロキシル基または開始剤残基を表し、 $R^5$  はそれぞれ独立して水素原子もしくはアルカリ金属のイオンまたはカルボキシル基の保護基を表し、 $m$  は 5 ~ 20, 000 の整数であり、 $n$  は 2 ~ 5, 000 の整数であり、但し、 $x$  は 0 ~ 5, 000 の整数であるが、 $x$  は  $n$  より大きくなく、そして  $n - x$  および  $x$  個の  $R^5$  中、水素原子もしくはアルカリ金属のイオンが 50% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 95% 以上、特に好ましくは実質的に 100% を占める。

本発明の目的上より一層好ましいブロック共重合体としては、下記の一般式 (1-a) または (2-a) で示されるものまたはその塩を挙げることができる。



上式中、 $R^1$  は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の  $C_{1-12}$  アルキル基を表し、 $L^1$ 、 $L^2$  は連結基を表し、 $R^3$  は水素原子、アミノ基の保護基、疎水性基または重合性基を表し、 $R^4$  はヒドロキシル基または開始剤残基を表し、 $R^5$  はそれぞれ独立して水素原子もしくはアルカリ金属のイオンまたはカルボキシル基の保護基を

表し、 $m$ は5～20、000の整数であり、 $n$ は2～5、000の整数であり、但し、 $n$ 個の $R^5$ 中、水素原子もしくはアルカリ金属のイオンが50%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましく実質的に100%を占める。

上記の一般式中の各基または部分の定義は、当業者が通常認識している意味または内容を有するものとして解釈されねばならない。限定されるものでないが、以下に、具体例を挙げる。

$R^1$  についていう、未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の $C_{1-12}$ アルキル基としては、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、*iso*-プロピル、 $n$ -ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、 $n$ -ペンチル、 $n$ -ヘキシル、デシル、ウンデシル等が挙げられる。また置換された場合の置換基としてはアセタール化ホルミル基、シアノ基、ホルミル基、カルボキシル基、アミノ基、 $C_{1-6}$ アルコキシカルボニル基、 $C_{2-7}$ アシルアミド基、同一もしくは異なるトリ- $C_{1-6}$ アルキルシロキシ基、シロキシ基またはシリルアミノ基が挙げられる。置換基がアセタール化ホルミル基であるときは、酸性の温和な条件下で加水分解して他の置換基であるホルミル基(-CHO:またはアルデヒド基)に転化できる。かようなホルミル基、または上記のカルボキシル基もしくはアミノ基は、例えば、本発明に従う配位錯体を形成した後に対応する保護された形態の基または部分から脱保護もしくは転換して生ぜしめ、次いで必要に応じ、適当な抗体もしくはその特異結合性を有する断片(F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)、または葉酸、等)を共有結合し、そして該配位錯体に標的指向性を付与するために利用できる。このような官能基を片末端に有するPEGセグメントは、例えば、WO96/32434、WO96/33233、WO97/06202に記載のブロック共重合体のPEGセグメント部の製造法によって、都合よく形成できる。

こうして形成されるPEGセグメント部分とポリ(carbo)セグメント部分とは、一般式(A)、(1)、(2)、(1-a)または(2-a)で示されるブロック共重合体の製造方法に応じて、どのような連結様式をもとり得、そして本発明の目的に沿う限り、どのような連結基で結合されていてもよい。製造方法は特に限定されるものではないが、一般式(1)、(2)、(1-a)または(2-a)の錯体を製造する場合の一方法として、末端にアミノ基を有するPEG誘導体を用いて、そのアミノ末端から、例えば、*p*-ベンジル-*L*-アスパルテートおよび/または *p*-ベンジル-*L*-グルタメートの*N*-カルボン酸無水物(NCA)を重合させてブロック共重合体を合成し、その後側鎖ベンジル基を他のエステル基に変換するか、または部分もしくは完全加水分解することにより目的のブロック共重合体を得る方法が挙げられる。この場合共重合体の構造は一般式(1)または(1-a)となり、連結基 $L^1$ は用いたPEGセグメントの末端構造に由来する構造となるが、好ましくは-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-NH-表す(ここで、 $b$ は1～5の整数である)。

また、ポリ(カルボン酸)またはポリ(アミノ酸またはその誘導体)セグメント部分を合成してから、予め用意したPEGセグメント部分と結合させる方法でも、本発明の共重合体は製造可能であり、この場合結果的に上記の方法で製造したものと同一の構造となることもあるが、一般式(2)または(2-a)に対応する構造となることもあり、連結基 $L^2$ は特に限定されるものではないが、好ましくは-(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-、-CO-を表す(ここで、 $c$ は1～5の整数である)。

一般式(1)、(2)、(1-a)または(2-a)中の $R^5$ は、それぞれ独立して水素原子またはカルボキシル基の保護基であることができる。カルボキシル基の保護基としては、限定されるものでないが、ベンジル、ベンズヒドリルまたは $C_{1-6}$ アルキル基が挙げられ、アルキル基の具体的なものとしては、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、*iso*-プロピル、 $n$ -ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、 $n$ -ペンチルおよび $n$ -ヘキシルを挙げることができる。

$R^3$ はそれぞれ独立して水素原子またはアミノ基の保護基、例えばベンジルオキシカルボニル、*t*-ブチルオキシカルボニル、アセチルまたはトリフルオロアセチル基等であることができ、また、ベンジルカルボニルまたはベンズヒドリルカルボニル基等の疎水性基

10

20

30

40

50

であることができ、また、アクリロイルまたはメタクリロイル基等の重合性基であることもできる。

$R^4$  はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基またはカルボキシル基の保護基、例えばベンジルオキシ、*t*-ブチルオキシまたはメトキシ基等であることができ、また、ベンジルオキシまたはベンズヒドリルオキシ基等の疎水性基であることができ、また、アリルオキシまたはビニルフェニルメトキシ基等の重合性基であることもできる。かような重合性基は、本発明に従う、配位錯体からなるポリマーミセルを形成した後、重合させることによりポリマーミセルの構造をより堅牢にすることができる。しかし、本発明の薬物内包ポリマーミセルは、生理学的環境下で、通常、薬物をミセル外に放出する間はミセル構造を維持している場合が多いので、かような重合反応に付する必要がないことが多い。

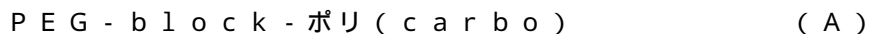
10

$m$  および  $n$  は、それぞれ 5 ~ 20, 000 の整数、好ましくは 10 ~ 5, 000、特に好ましくは 40 ~ 500、および 2 ~ 5, 000、より好ましくは 5 ~ 1, 000、特に好ましくは 10 ~ 200 である。したがって、本明細書では便宜上、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(カルボン酸)等と称しているが、「ポリ」の語には、所謂、「オリゴ」の範疇に入るものも包含される概念として用いている。

またポリ(アミノ酸またはその誘導体)セグメント、特に、ポリ(アスパラギン酸)の場合に存在しうる 2 種の繰り返し単位の構成割合を規定する、 $x$  は、0 ~ 5, 000 の整数(ただし  $n$  より大きくない)であることができる。この場合、各繰り返し単位はランダムに分布していることも、ブロック状に分布していることもできる。

本発明の配位錯体は、好ましくは、ジアミノシクロヘキサン白金(II)の白金(Pt)对该ブロック共重合体のカルボキシル基(カルボキシルアニオン)の当量比(Pt/COO<sup>-</sup>)が 0.05 以上より好ましくは 0.1 以上、特に好ましくは、0.3 ~ 1.0 または 1.2 である。該当量比の上限は、配位錯体としては、理論上 2.0 であることができるが、抗腫瘍剤とするときには本発明の目的に沿う限度において、ジアクオジアミノシクロヘキサン白金(II)錯体を該共重合と配位錯体を形成しているジアミノシクロヘキサン白金(II)錯体の他に、含んでいてもよい。本発明に従う、配位錯体は、例えば、図 1 に示されるように、ジアクオジアミノシクロヘキサン白金(II)錯体(Diaquo DACH Platin)と、一般式(A):

20



(式中、PEG はポリ(エチレングリコール)セグメントを表し、そして carbo は側鎖にカルボキシル基を有する繰り返し単位を表す。)

30

で示される構造を含んでなるブロック共重合体を、水性溶媒中で、Diaquo DACH Platin(II)の白金(Pt)と該ブロック共重合体のカルボキシルアニオンとの結合を形成することのできる、Pt とカルボキシル基の当量比および条件下で反応させ、こうして得られるジアミノシクロヘキサン白金(II)と該共重合体との配位錯体を回収することにより都合よく製造することができる。そして、Diaquo DACH Platin は、水性溶媒中で、ジクロロ(1, 2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II)と硝酸銀とを反応させ、副生成物である塩化銀を除去して得られる水溶液中に存在する状態のまま、上記の錯体形成反応に付すことができる。ジクロロ(1, 2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II)および Diaquo DACH Platin は既知の化合物である(例えば、非特許文献 5 または 2 参照)。

40

反応条件としては、目的の配位錯体得られる限りいかなる条件を設定してもよいが、Pt 対カルボキシル基の当量比が、0.1 以上、好ましくは、0.3 以上となり、そして最大で 1 となるように Diaquo DACH Platin とブロック共重合体の使用量を選び、そして両反応体が溶解または一部懸濁している濃度、反応温度 5 ~ 60 を選ぶのがよい。上記に言う、水性溶媒とは、水(特に、脱イオン水)または各種無機もしくは有機緩衝剤、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、エタノール等の水混和有機溶媒を、上記の錯体形成反応に悪影響を及ぼさない範囲で含んでいてもよい溶媒を意味する。生成した配位錯体は、通常、水性溶媒中で可溶化したポリマーミセル(通常、20 nm ~ 500 nm の平均粒径を有する。動的光散乱法により測定した場合)であるので、ポリマ

50

ーミセルを単離、精製する常法により、反応混合物から回収することができる。この方法の典型的なものとしては、限外濾過法、ダイアフィルトレーション、透析方法が挙げられる。

こうして単離、精製されたDACH Platinum内包ポリマーミセル溶液は、そのまま滅菌処理、必要により、注射剤として適するそれ自体既知の助剤を添加して、注射剤としてもよく、また、ポリマーミセル溶液を濃縮後、例えば、凍結乾燥して、固体状の微小粉体としてもよい。該微小粉体は、再度、注射可能な溶液中にかなり高濃度で溶解でき、しかも、本発明に従うDACH Platinum内包ポリマーミセルは、例えば、オキサリプラチン(oxaliplatin)に比べても、極めて安全性が高く、ポラス注入するための医薬製剤とすることもできる。前記微小粉体は、製薬学的に許容される、状されているキャリアーと配合して、各種の投与形式に適合する剤形に加工することができる。かようなキャリアーの代表例は、脱イオン水、一定のpHに緩衝化された水溶液、オリゴもしくはポリエチレングリコール、単糖もしくはオリゴ糖、糖アルコール、等であることができる。しかし、好ましくは、非経口的投与、特に静脈内もしくは皮下投与に適する剤形の組成物として提供する。

10

例えば静脈内投与をする場合の用量は、実験動物またはボランティアによる小実験を行い、それらの結果を考慮して、さらには患者の状態を考慮して専門医が決定するのが好ましい。しかし、限定されるものでないが、一般に、1日1回 $1.0 \sim 1000 \text{ mg/m}^2$  (患者の体表面積)であることができ、また、 $10 \sim 200 \text{ mg/m}^2$  (患者の体表面積)を1日1回数日間連続投与し、一定期間休薬するか、または、 $50 \sim 500 \text{ mg/m}^2$  (患者の体表面積)を1日1回投与した後、数日間休薬する等、投与スケジュールにより、適当な用量を選ぶことができる。

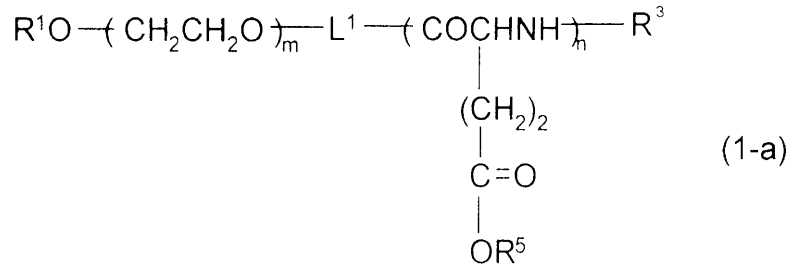
20

本発明の配位錯体は、ジクロロ(1,2-ジアミノシクロヘキサン)白金(II)、Diaquo DACH Platinumまたはオキサリプラチン(oxaliplatin)と同様の抗腫瘍活性スペクトルを有する。こうして、本発明は、上記の配位錯体を有効成分とする抗腫瘍剤も提供する。

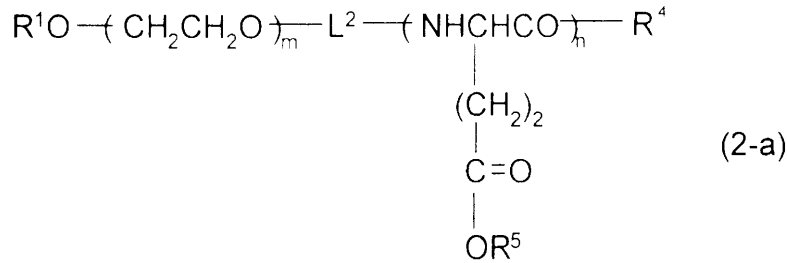
本発明によれば、本発明に従う、DACH Platinum内包ポリマーミセルまたはDACH Platinumと共重合体の錯体が有効である限り限定されないが、例えば、抗腫瘍、膀胱癌、腎盂・尿管腫瘍、前立腺癌、卵巣癌、頭頸部癌、胞肺癌、食道癌、子宮頸癌、神経芽細胞腫、胃癌、および直腸癌を挙げることができる。

30

本発明に従うDACH Platinum内包ポリマーミセルまたは錯体は、他の抗腫瘍剤または抗癌剤と組み合わせ使用できる。これらの抗腫瘍剤としては、組み合わせ使用により悪影響が生じないものであるなら、如何なる薬剤であってもよいが、例えば、シタラピン、5-FU、ドキソルピシン、タキソール、カルボプラチン、シスプラチン等であることができる。しかし、特に好ましいのは、上述した、W002/26241A1に記載されたシスプラチン内包ポリマーミセル(または共重合体とシスプラチンの錯体)、具体的には、抗腫瘍有効成分として、シスプラチンと、一般式(1-a)または(2-a)：



10



20

(上式中、 $R^1$  は水素原子または未置換もしくは置換された直鎖もしくは分枝の  $C_{1-12}$  アルキル基を表し、 $L^1$ 、 $L^2$  は連結基を表し、 $R^3$  は水素原子、アミノ基の保護基、疎水性基または重合性基を表し、 $R^4$  はヒドロキシル基または開始剤残基を表し、 $R^5$  はそれぞれ独立して水素原子、アルカリ金属のイオンまたはカルボキシル基の保護基を表し、 $m$  は 5 ~ 20, 000 の整数であり、 $n$  は 2 ~ 5, 000 の整数であり、但し、 $n$  個の  $R^5$  中、アルカリ金属のイオンが 50% 以上を占める)

で示されるブロック共重合体とのシスプラチンの配位錯体またはその薬剤内包ポリマーミセルを、上記の DACH Platinum 内包ポリマーミセルまたは DACH Platinum と共重合体の錯体と組み合わせて使用するものが挙げられる。これらの組み合わせ比は、限定されないが、好ましくは、DACH Platinum 内包ポリマーミセル（またはジアミノシクロヘキサン白金 (II) の配位錯体）と該シスプラチンの配位錯体の比が、白金の重量を基準にして、1/3 ~ 3/1 であるが、特に、1/1 ~ 3/1 が好ましい。

30

これらの組み合わせは、組み合わせられる 2 種以上の薬剤を同時もしくは時間を異にして、同一もしくは異なる投与経路にて患者に投与することができる。上記の DACH Platinum 内包ポリマーミセルと該シスプラチンの配位錯体の組み合わせは、一の製剤に組み合わせて都合よく、そして効果的に使用することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

図 1 は、本発明に従う、配位錯体およびそのポリマーミセルの概念図である。

図 2 は、DACH Pt ミセル（黒塗り四角）と CDDP ミセル（三角）の相対的散乱光強度変化を示すグラフである。

40

図 3 は、10 mM PBS (pH 7.4) に 150 mM NaCl 添加した溶液中の DACH Pt ミセル（黒塗り四角）および CDDP ミセル（三角）からの白金の放出挙動を示すグラフである。

図 4 は、血漿 (a)、各種器官（具体的には、腫瘍 (b)、腎臓 (c) および肝臓 (d)）への薬物、DACH Pt ミセル（黒塗り四角）およびフリーの CDDP（白抜き四角）の集積性を表すグラフである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

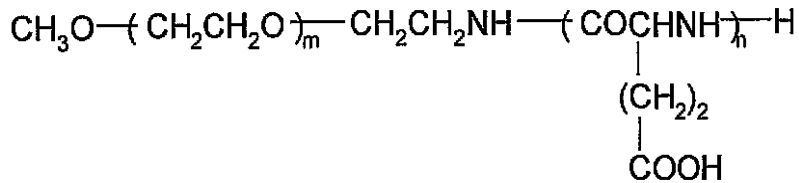
以下、本発明を、特定の例によりさらに具体的に説明するが、本発明をこれらに限定することを意図するものでない。

50

## 【実施例 1】

## ポリマーミセルの生成

本実施例で使用するブロック共重合体の構造式は次のとおりである。



(1. a.) 19 mg のジクロロ(1, 2 - ジアミノシクロヘキサン)白金(II) (dichloro-DACHPt) を 10 ml の蒸留水に懸濁し、12.3 mg の硝酸銀と混合した ([AgNO<sub>3</sub>] / [dichloro-DACHPt] のモル比 = 1.5)。混合液を、暗所で 24 時間、25℃ に保持した。反応後に塩化銀の沈殿が析出した。次いで、反応混合物を 3000 rpm で 5 分間遠心して塩化銀の沈殿を除去した。こうして得られる Diaquo-DACHPt 含有上澄液を、0.22 μm のフィルターを通して精製した。

(1. b.) ポリ(エチレングリコール)セグメントの分子量が約 12,000 になるような m 値を有し n が約 35 である上記の構造式で表されるブロック共重合体 (以下、PEG-P(Glu))<sub>12-35</sub> という) 24.4 mg を、上記の (1. a.) で得られた精製上澄液 10 ml に加えた (「Diaquo-DACHPt」 / [Glu] のモル比 = 1)。

こうして得られた溶液を、37℃ で 120 時間攪拌した。溶液を透析バッグ [分子量カットオフ (MWCO) = 1000] に入れ、蒸留水に対して 24 時間透析した。透析バッグ (膜) 外の水は、透析開始後、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間および 12 時間目に交換した。透析された溶液を、フィルター (MWCO = 100, 000) を用いて限外ろ過した。

## 【実施例 2】

## ポリマーミセルの特性

(2. a.) 10 mM PBS 中での安定性

実施例 1 に従って得られたポリマーミセル (以下、DACHPt ミセルという) の安定性を、上記に用いたのと同じブロック共重合体を用いて、上記の WO02/26241 A1 の実施例 1 に記載のとおり生成したシスプラチン内包ポリマーミセル (以下、CDDP ミセルという。) の安定性と比較した。

CDDP ミセルは、要約すると、次のように調製した：

水中にシスプラチン (CDDP) を溶解させた (5 mmol/l)。この溶液に上記の実施例 1 で用いたのと同じブロック共重合体を溶解させ ([CDDP] / [共重合体の Glu]) = 1.0)。37℃ で 73 時間反応させた。得られた溶液を限外ろ過 (MWCO = 100, 000) を繰り返して精製した。動的光散乱 (DLS) の測定によりポリマーミセルが形成されていることを確認した。

まず、特定体積のミセル溶液を凍結乾燥し、次いで残渣を秤量することによりミセル濃度を決定した。DACHPt ミセル溶液および CDDP ミセル溶液を、それぞれ 10 mM PBS (pH 7.4) に 150 mM NaCl 添加した溶液と混合し、1.5 mg/ml のミセル濃厚液を得た。これらの液を、暗所で 37℃ にて保持した。両液を、それぞれサンプリングし、次いで、動的光散乱 (SLS) 法で測定した。測定を 25℃ で行い、90° の角度の検出を行った。これらの液は、0.45 μm のフィルターを通して精製した。

## 安定性アッセイの結果：

相対的散乱光強度変化、即ち、初期の散乱光強度から特定時点での散乱光強度を図 2 に示す。図 2 から、CDDP ミセルは約 50 時間以内に解離するのに対し、DACHPt ミセルは 250 時間まで安定であることが分かる。

10

20

30

40

50

## (2. b.) ミセルからの白金の放出

異なる温度における、10 mM PBS (pH 7.4) に 150 mM NaCl 添加した溶液中の DACHPt ミセルおよび CDDP ミセルからの白金の放出を透析法 (膜の MWCO = 1,000) により評価した。硝酸銀を用いる dichloro-DACHPt の予備処理をジメチルホルムアミド (DMF) 中および水中の両方で行い、上記の (1. b.) の方法に従い、2 種の DACHPt ミセルを調製した。透析バッグの外液を特定の時間間隔でサンプリングし、白金の濃度を誘導プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) で測定した。

## 結果:

放出の結果を図 3 に示す。放出された白金は、CDDP ミセルと DMF 中で予備処理した場合の DACHPt ミセルとは同様であった。水中で予備処理された場合の DACHPt ミセルは僅かに高い白金の放出を示した。また、DACHPt ミセルは CDDP ミセルと比較して 150 mM NaCl 中で高い安定性を有するにも拘らず、CDDP ミセルと同様な白金リリース速度を示した。

## (2. c.) in vitro の細胞毒性

マウス結腸 26 (C-26) 細胞株に対する、遊離の CDDP、CDDP ミセル、DACHPt ミセル、異なる混合割合 (1/3、1/1 および 3/1) における DACHPt ミセルと CDDP ミセルの増殖阻害活性を、MTT 法で評価した。5000 個の細胞を、96 穴のマルチプレート中の 10% ウシ胎仔血清含有 RPMI 1640 培地 50  $\mu$ l において培養した。48 時間および 72 時間薬剤に細胞をさらした。MTT 溶液を加え、6 時間後に 0.01 M HCl を添加した 10 重量% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 含有溶液 150  $\mu$ l を加えた。次いで、24 時間後の 570 nm における生成されたホルマザンの吸光度により細胞の生存度を測定した。これらの結果から、50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を決定した結果を表 1 にまとめる。

表 1

培養時間 (時間)	IC50 ( $\mu$ g/ml)					
	遊離 CDDP	CDDP ミセル	0.25DACHPt + 0.75CDDP ミセル	0.5DACHPt + 0.5CDDP ミセル	0.75DACHPt + 0.25CDDP ミセル	DACHPt ミセル
48	1.5	20.3	8	3.5	3	2.3
72	0.65	7.5	2	0.8	1.25	1.5

表より、DACHPt ミセルは CDDP ミセルより約 10 倍高い細胞毒性 (抗腫瘍性) を示すことが分かる。また、ミセルの組み合わせは、細胞毒性を増大させる。

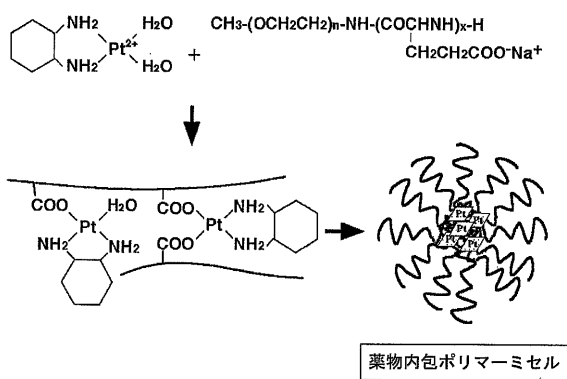
## (2. d.) 生体内分布

Balb/c マウス (n = 3、雌、6 週令、20 - 25 g) に、右側腹部から C-26 細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を皮下接種した。遊離の CDDP および DACHPt ミセル (各薬物 100  $\mu$ g) を尻尾の静脈から注入した。腫瘍接種後 21 日目にマウスを犠牲にした。1、4、24 時間目に、腫瘍、肝臓、腎臓、を切除し、そして同時に血液を集め、ヘパリン化した。遠心で血液から血漿を分離し、温硝酸に溶解した。器官を秤量し、温硝酸に溶解した。溶液を乾燥した。塩酸を加えた直後に ICP-MS で白金の量を測定した。結果を図 4 に示す。得られた結果から、DACHPt ミセルは血流中を長期滞留し、正常組織に特異な集積を示すことなく、固形がん効果的に集積することが分かる。

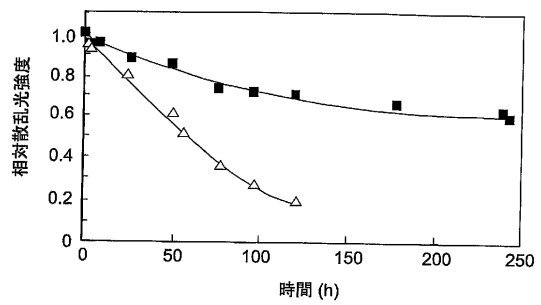
## 【産業上の利用可能性】

本発明の配位錯体は、ヒトの腫瘍の化学療法において安全に使用でき、しかも高い抗腫瘍活性を有するので、医療業、医薬製造業等で利用できる。

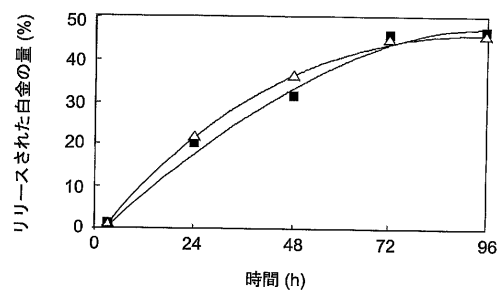
【 図 1 】  
Fig. 1



【 図 2 】  
Fig. 2

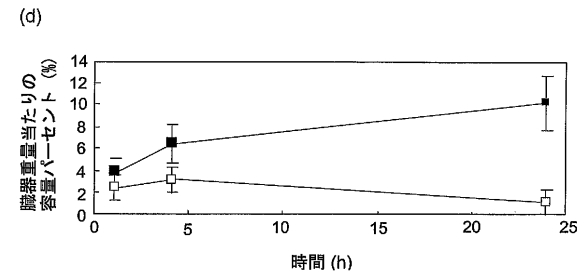
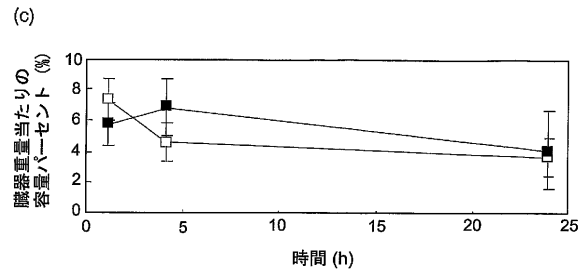
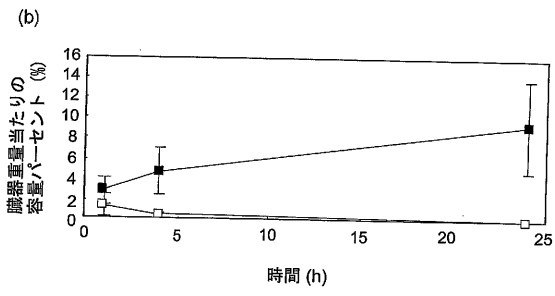
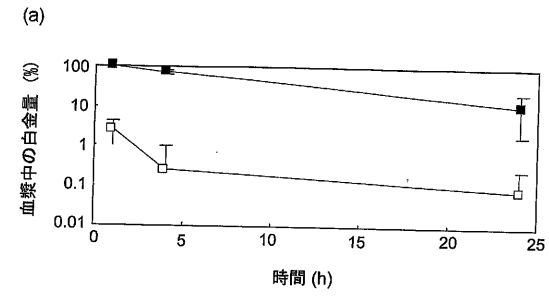


【 図 3 】  
Fig. 3



【 図 4 】  
Fig. 4

Fig. 4 続き



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	35/00
<b>C 0 7 C 211/36</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 C	211/36
<b>A 6 1 K 9/51</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	9/51
<b>A 6 1 K 47/48</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	47/48
C 0 7 F 15/00	(2006.01)	C 0 7 F	15/00
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K	47/42
			C S P F

審査官 佐々木 秀次

- (56) 参考文献 国際公開第 0 2 / 2 6 2 4 1 ( W O , A 1 )  
 特開平 0 6 - 3 2 9 6 9 2 ( J P , A )  
 特開平 0 6 - 2 7 1 5 9 3 ( J P , A )  
 特開平 0 5 - 3 0 1 8 8 4 ( J P , A )  
 特開昭 5 7 - 0 0 2 2 9 6 ( J P , A )  
 国際公開第 0 2 / 1 6 3 7 6 ( W O , A 1 )  
 国際公開第 0 3 / 1 7 9 2 3 ( W O , A 1 )

- (58) 調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C08G 81/00  
 A61K 47/48  
 CA(STN)  
 REGISTRY(STN)