

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年1月27日 (27.01.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/007172 A1

- (51) 国際特許分類: **A61K 31/704**, 31/7032, 9/127, 47/18, 47/24, A61P 35/00, C07J 17/00, C07H 15/18, 15/10
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/010103
- (22) 国際出願日: 2004年7月15日 (15.07.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-198476 2003年7月17日 (17.07.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535 東京都千代田区神田司町2-9 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 矢澤伸 (YAZAWA, Shin) [JP/JP]; 〒7700814 徳島県徳島市南堂三島町1-4-1 201 Tokushima (JP). 高井泉 (TAKAI, Izumi) [JP/JP]; 〒1540012 東京都世田谷区駒沢3-24-13 Tokyo (JP). 西村東洋 (NISHIMURA, Touyou) [JP/JP]; 〒7711273 徳島県板野郡藍住町勝瑞東勝地223-1 Tokushima (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号共同ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 2005/007172 A1

(54) Title: GLYCOSIDE-CONTAINING LIPOSOME

(54) 発明の名称: 配糖体含有リポソーム

(57) Abstract: A medical preparation which can maximize the effect of a cholestanol glycoside useful as an antitumor agent. It is a liposome which comprises: a hydrophobic-compound glycoside having an antitumor activity, having GlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc, or Gal- as a sugar, and capable of forming a liposome; a phospholipid; and a substance donating a positive charge.

(57) 要約: 本発明は、抗腫瘍剤として有用なコレスタノール配糖体の効果を最大限に発揮し得る製剤を提供するものである。すなわち、本発明は、抗腫瘍活性を有し、糖としてGlcNAc-Gal-、GlcNAc-Gal-Glc-、Fuc-Gal-、Gal-Glc又はGal-を有するリポソーム化可能な疎水性化合物の配糖体、リン脂質及び正電荷供与物質を含有するリポソームに関する。

明 細 書

配糖体含有リポソーム

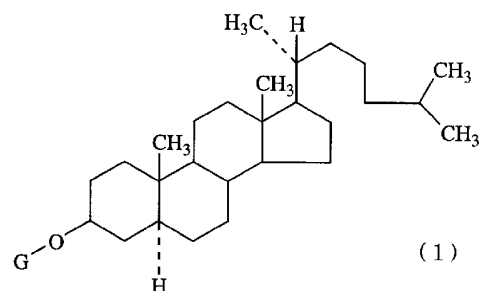
技術分野

[0001] 本発明は、抗癌剤として有用な配糖体を含むリポソームに関する。

背景技術

[0002] 例えばコレステロールのB環の二重結合が飽和されたコレスタノールに特定の糖鎖を結合させた下記のコレスタノール配糖体(1)は、癌細胞の増殖抑制作用を有し、抗癌剤として有用な化合物である(特許文献1及び2参照)。

[0003] [化1]



[0004] [式中、GはGlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc-又はGal-を示す。]

[0005] コレスタノールのような疎水性化合物は、細胞膜に親和性を有し、細胞に容易に取り込まれることから、それらの配糖体は種々の癌細胞に容易に取り込まれ十分にその効果を発揮できると考えられていた。しかしながら、当該配糖体は、溶解性の低さから使用が困難であったり、癌腫によってはその効果を十分に発揮できない場合があった。

特許文献1:特開平11-60592号公報

特許文献2:特開平2000-191685号公報

発明の開示

[0006] 本発明は、抗腫瘍活性を有する配糖体に対し、該化合物の本来有する抗腫瘍効果をより効率的に発揮せしめる製剤を提供することを目的とする。

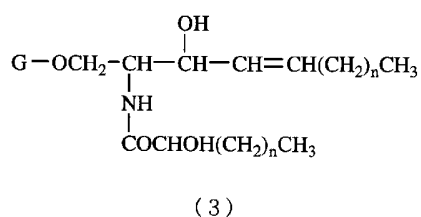
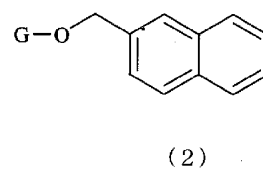
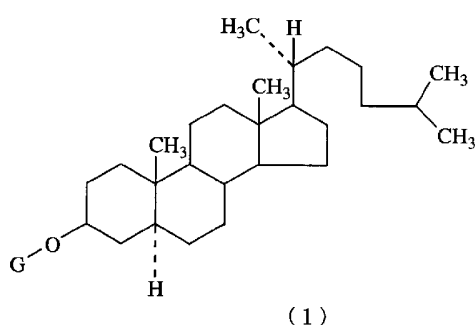
[0007] 本発明者らは、斯かる実情に鑑み、抗腫瘍活性を有する疎水性化合物の配糖体に

ついて、その投与形態を種々検討したところ、膜脂質として少なくともリン脂質を用い、且つ正電荷供与物質を共存させて、当該配糖体をリポソーム化した場合に、溶解性の低さのために使用が困難であった化合物の使用が可能になり、更に配糖体をそのまま投与した場合には殆ど効果を示さなかった腫瘍株に対しても強い抗腫瘍活性を示す等、該化合物の本来有する抗腫瘍効果をより効率的に発揮せしめる製剤となり得ることを見出した。

[0008] すなわち本発明は、抗腫瘍活性を有し、糖としてGlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc又はGal-を有するリポソーム化可能な疎水性化合物の配糖体、リン脂質及び正電荷供与物質を含有するリポソームを提供するものである。

[0009] また、本発明は、下記の式(1)～(3)：

[化2]



[0010] [式中、GはGlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc-又はGal-を示し、nは12～26の整数を示す。]

から選ばれる配糖体、リン脂質及び正電荷供与物質を含有するリポソームを提供するものである。

- [0011] 更に本発明は、当該リポソームを含有する抗癌剤を提供するものである。
- [0012] 本発明によれば、抗腫瘍活性を有する配糖体の溶解性が向上し、当該配糖体が本来有する抗腫瘍効果をより効率的に発揮せしめる製剤が提供できる。特に、コレスタノール配糖体(1)を用いた製剤は、そのまま投与した場合には抗腫瘍作用を発揮しづらかった癌細胞に対しても強い抗腫瘍活性を示し、当該化合物の持つ抗腫瘍作用を最大限に発揮せしめることができる。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]リポソーム化GlcNAc β 1, 4GalCholの癌細胞増殖阻害効果を表した図である。図中、-Lipoはリポソームであることを示す。
- [図2]リポソーム化Fuc α 1, 3GalCholの癌細胞増殖阻害効果を表した図である。図中、-Lipoはリポソームであることを示す。
- [図3]リポソーム化Gal β Cholの癌細胞増殖阻害効果を表した図である。図中、-Lipoはリポソームであることを示す。
- [図4]リポソーム化GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 1NMおよびリポソーム化GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc β 1, 1Ceramideの癌細胞増殖阻害効果を示した図である。図中、-Lipoはリポソームであることを示す。
- [図5]リポソーム化Fuc α 1, 3GalCholの粒子径の違いによる腹膜播腫抑制効果を表した図である。
- [図6]リポソーム化GlcNAc β 1, 4GalCholの腹膜播腫抑制効果を表したもので、特に腫瘍形成数を測定した図である。
- [図7]リポソーム化GlcNAc β 1, 4GalCholの腹膜播腫抑制効果を表したもので、特に腫瘍重量(g)を測定した図である。
- [図8]リポソーム化FucGalChol及びFucGalChol単独投与での腹膜播種抑制効果を比較したもので、特に腫瘍形成数を測定した図である。

発明を実施するための最良の形態

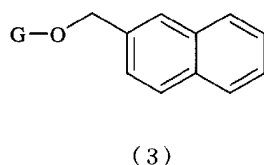
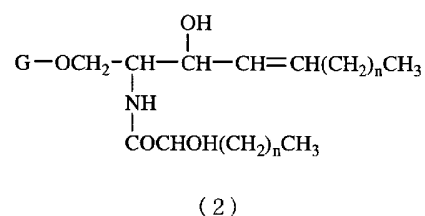
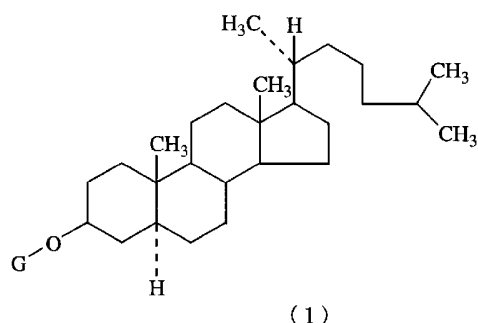
- [0014] 本発明リポソームに含有される配糖体は、糖として、GlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc又はGal-を有し、リポソーム化可能な疎水性化合物をアグリコンとする化合物であり、且つ抗腫瘍活性を有するものである。

ここで、リポソーム化可能な疎水性化合物としては、例えばコレステロール、セラミド、疎水性アミノ酸、脂肪酸(オレイン酸、リノール酸、リノレイン酸等)、脂溶性ビタミン等の生体構成成分や、例えばナフタレン誘導体(例えばナフタレンメタノール)等の芳香環を有する化合物、コレステロール誘導体(例えばコレスタノール)等が挙げられる。このうち、セラミド、ナフタレン誘導体、コレステロール誘導体が好ましく、コレステロールのB環の二重結合が飽和されたコレスタノールが特に好ましい。

[0015] また、糖部分がGlcNAc-Gal-であるものは、好ましくはGlcNAc β 1, 3-Gal β - 又はGlcNAc β 1, 4-Gal β -であり、GlcNAc-Gal-Glc-であるものは、好ましくはGlcNAc β 1, 3-Gal β 1, 4-Glc-であり、Fuc-Gal-であるものは、好ましくはFuc α 1, 3Gal-であり、Gal-Glc-であるものは、好ましくはGal β 1, 4Glc β -であり、Gal-であるものは、好ましくはGal β -である。

[0016] 更に好適な配糖体として、以下のコレスタノール配糖体(1)、ナフタレンメタノール配糖体(2)及びセラミド配糖体(3)が挙げられる。

[化3]



[0017] [式中、GはGlcNAc-Gal-、GlcNAc-Gal-Glc-、Fuc-Gal-、Gal-Glc-又はGal-を示し、nは12~26の整数を示す。]

[0018] 中でも、抗癌作用の点から、コレスタノール配糖体(1)が特に好ましく、更に式(1)

中の好ましい化合物として、以下に示すものが挙げられる。

(1) G = GlcNAc-Gal-

3-β-コレスタニル 3-O-(2-アセタミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)
-β-D-ガラクトピラノシド、

3-β-コレスタニル 4-O-(2-アセタミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)
-β-D-ガラクトピラノシド

(2) G = GlcNAc-Gal-Glc-

3-β-コレスタニル 4-O-{3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピ
ラノシル)-β-D-ガラクトピラノシル}-β-D-グルコピラノシド

(3) G = Fuc-Gal-

3-β-コレスタニル 3-O-(α-L-フコピラノシル)-β-D-ガラクトピラノシド

(4) G = Gal-Glc-

3-β-コレスタニル 4-O-(β-D-ガラクトピラノシル) β-D-グルコピラノシド

(5) G = Gal-

3-β-コレスタニル β-D-ガラクトピラノシド

[0019] 本発明の配糖体は、生体内からの抽出、公知の化学反応、或いはこれらを組み合
わせて製造することができる。例えば、上記コレスタノール配糖体(1)については、特
開平11-60592号公報又は特開平2000-191685号公報に記載の方法により、ナ
フタレンメタノール配糖体(2)については、J. Biol. Chem. 272(41)25608, 1997
記載の方法により製造することができ、セラミド配糖体(3)については、ヒト赤血球、肝
臓、消化管粘膜、胎便などからの抽出により得ることができる。

[0020] 当該配糖体は、抗腫瘍活性を有するものであるが、ここで抗腫瘍活性を有するとは
、インビボにおいては、少なくとも1種の癌種に対して抗腫瘍効果を発揮し得ることを
意味し、インビトロにあっては、少なくとも1種の癌細胞株に対して増殖阻害活性又は
、増殖抑制活性を有することを意味する。

[0021] 本発明リポソームにおいて、配糖体は、リン脂質1モルに対して、0.3-2.0モル、
好ましくは0.8-1.5モル含有するのが好ましい。

[0022] 本発明のリポソームにおいては、膜成分脂質として少なくともリン脂質が用いられる

。

斯かるリン脂質としては、ジラウロ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、ジパルミ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、ジリノレオイルホスファチジルコリン、ミリストイルパルミトイルホスファチジルコリン、ミリストイルステアロイルホスファチジルコリン、パルミトイルアラキドイルホスファチジルコリン等のホスファチジルコリン類、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、ホスファチジン酸等が挙げられ、これらは天然、又は半合成若しくは全合成により得ることができる。また、水素添加リン脂質等の加工リン脂質を用いることもできる。斯かるリン脂質は、単独で用いてもよく、2種以上を混合して用いてもよい。

このうち、電気的中性で安定なりポソームを形成し得る点から、ホスファチジルコリン類を用いるのが好ましく、特に1 α ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を用いるのが好ましい。

[0023] 正電荷供与物質は、脂質膜の表面を正に荷電させるために添加される物質である。リポソームの表面を正に荷電させることにより、膜表面が負の荷電状態にある細胞との無理のない接触が期待できる。

[0024] 正電荷供与物質としては、ステアリルアミン、オレイルアミン等の脂肪族アミン、フルオレンエチルアミン等の芳香族アミンが挙げられ、このうち脂肪族アミンが好ましく、特にステアリルアミンを用いるのが好ましい。

正電荷供与物質は、リン脂質1モルに対して、0.04~0.15モル、好ましくは0.1~0.15モル含有するのが好ましい。

[0025] 本発明のリポソームには、上記成分の他に、膜構造の安定剤としてコレステロール、脂肪酸、ジアセチルホスフェート等を必要に応じて加えることができる。

[0026] 膜成分を分散させる水溶液としては、水、生理食塩水、各種緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合物が好ましく用いられる。緩衝液としては、有機系、無機系を問わず体液水素イオン濃度付近に緩衝作用を有する緩衝液が好適に用いられ、例えばリン酸緩衝液を挙げることができる。

[0027] 本発明リポソームの調製は、特に限定されず常法に従って行えばよい。例えば特

開昭57-82310号公報、特開昭60-12127号公報、特開昭60-58915号公報、特開平1-117824号公報、特開平1-167218号公報、特開平4-29925号公報、特開平9-87168号公報、Methods of Biochemical Analysis(1988)33, p337、或いは「リポソーム」(南江堂)に記載の方法に準じて行えばよい。

- [0028] 以下に、特開平9-87168号公報に記載された方法に準じた本発明リポソームの調製手順について述べる。
- [0029] まず、本発明の配糖体、リン脂質及び正電荷供与物質に有機溶媒及び水を加え混合した後、ロータリーエヴァポレーター等を用い完全に有機溶媒を除去し、次いで水分除去を行なう。ここで、膜成分物質、正電荷供与物質及び配糖体の混合比率は、例えば、52:8:20(モル比)を例示できるが、その近辺の混合比率であれば特に問題はない。配糖体の混合比率が小さい場合はコレステロールに代表される膜構造安定剤を必要に応じて添加することができるが、該混合比率が高くなれば必ずしも膜構造の安定剤の添加を必要とはしない。
- [0030] 有機溶媒は、水に対し不溶性の揮発性有機溶媒であれば特に制限はなく、例えばクロロホルム、クロルメタン、ベンゼン及びヘキサン等を用いることができ、溶解性を考慮する場合は、エタノールあるいはメタノール等の比較的極性の高い有機溶媒を適宜添加調製した混合有機溶媒を使用することができる。該混合有機溶媒と水との混合比率は、均一になる比率であれば、特に制限はない。
- [0031] また、水分を添加調製した場合、水分除去法としては凍結乾燥法がごく一般に用いられるが、これに限定されるものではなく、減圧デシケーター中で乾燥してもよい。水分除去後、前述の分散水溶液を添加し、Vortexミキサー等で浸透することによりリポソーム化が達成される。
- [0032] 本発明リポソームの粒子径は、腫瘍抑制効果の点から10 μ m以下であるのが好ましく、3 μ m以下であるのがより好ましい。
- リポソームのサイズを揃える場合は、例えば超音波処理、多孔質メンブレンフィルターに対する押し出し処理、高圧噴射乳化装置による処理、あるいはこれらを組み合わせることによってサイズの均一化が可能である。また、より小さいリポソーム粒子を得たい場合は、たとえば超音波処理時間を長くすることにより達成することができる。

[0033] 斯くして調製された本発明リポソームは、後記実施例に示すように、極めて優れた癌細胞の増殖阻害作用を有する。特に、コレスタノール配糖体(1)については、そのまま投与した場合には抗腫瘍作用を発揮しづらかった癌細胞に対しても強い抗腫瘍活性を示す。リポソームは、一般にリン脂質二重膜を形成した小胞球であり、薬剤を内部に包み込む形で分散させ、細胞膜との融合により薬剤を細胞内に到達せしめることを目的として作製されるものであることから、薬剤自体の性質はリポソーム化によって変わるものではないと考えられていた。従って、当該コレスタノール配糖体をリポソーム化することにより、当該化合物の抗腫瘍活性が飛躍的に向上したことは、全く意外であった。

かように、当該リポソームを含有する製剤は、配糖体の本来有する抗腫瘍効果をより効率的に発揮せしめる抗癌剤として有用である。

[0034] 本発明の抗癌剤は、治療部位、治療目的に応じて適宜剤形を選択でき、リポソーム形状の安定性を損う添加剤等の使用がない限り、公知の調製方法に従い、例えば、経口剤、注射剤、坐剤、軟膏剤、貼付剤等とすることができる。

[0035] 経口用固形製剤を調製する場合は、本発明リポソームに、賦形剤、必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。そのような添加剤としては、当該分野で一般的に使用されるものでよく、例えば、賦形剤としては、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸等を、結合剤としては、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等を、崩壊剤としては乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖等を、滑沢剤としては精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコール等を、矯味剤としては白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等を例示できる。

[0036] 経口用液体製剤を調製する場合は、本発明リポソームに、矯味剤、緩衝剤、安定

化剤、矯臭剤等を加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等を製造することができる。この場合矯味剤としては上記に挙げられたもので良く、緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム等が、安定化剤としてはトラガント、アラビアゴム、ゼラチン等が挙げられる。

- [0037] 注射剤を調製する場合は、本発明リポソームに、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内及び静脈内用注射剤を製造することができる。この場合のpH調節剤及び緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等が挙げられる。安定化剤としてはピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA、チオグリコール酸、チオ乳酸等が挙げられる。局所麻酔剤としては塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等が挙げられる。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖等が例示できる。
- [0038] 坐剤を調製する場合は、本発明リポソームに公知の製剤用担体、例えば、ポリエチレングリコール、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセライド等を、更に必要に応じてツイーン(登録商標)のような界面活性剤等を加えた後、常法により製造することができる。
- [0039] 軟膏剤を調製する場合は、本発明リポソームに、通常使用される基剤、安定剤、湿潤剤、保存剤等を必要に応じて配合し、常法により混合、製剤化することができる。基剤としては、流動パラフィン、白色ワセリン、サラシミツロウ、オクチルドデシルアルコール、パラフィン等が挙げられ、保存剤としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が挙げられる。
- [0040] 貼付剤を製造する場合は、通常の支持体に前記軟膏、クリーム、ゲル、ペースト等を常法により塗布すれば良い。支持体としては、綿、スフ、化学繊維からなる織布、不織布や軟質塩化ビニル、ポリエチレン、ポリウレタン等のフィルムあるいは発泡体シートが適当である。
- [0041] 本発明抗癌剤の投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、通常成人1日あたり、コレスタノール配糖体(1)として約0.01～200mg/Kg、好適には0.1～50mg/Kgとすれば良く、これを1日一回又は2～4回程度に分けて投与するのが好ましい。

実施例

[0042] 次に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1 コレスタノール配糖体のリポソーム化

コレスタノール配糖体として、前記式(1)中のGがGlcNAc β 1, 4Galである「GlcNAc β 1, 4GalChol」、GがFuc α 1, 3Galである「Fuc α 1, 3GalChol」、GがGal β である「Gal β Chol」及び比較としてGがHである「Chol」を用い、これらの20 μ mol/ml(クロロホルム/メタノール=5/1, v/vに溶解)溶液を出発物質とした。

1 α ジパルミトイルフォスファチジルコリン、ステアリルアミン及び上記のコレスタノール配糖体を52/8/20(モル比)の割合で700 μ lとなるように混合し、次いで有機溶媒(クロロホルム/メタノール=2/1, V/V)300 μ l及び蒸留水1mlを添加混合した。その後、ロータリーエヴァポレーターにて有機溶媒を完全に除去した後、凍結乾燥操作を行ない、水分を完全に除去した。該凍結乾燥品は、PBS1ml中に溶解し、超音波処理(15W, 15分)を行なうことによりリポソームを粒子径2-4 μ m程度に均一化し、実施例2及び3に供した。

[0043] 実施例2 ナフタレンメタノール配糖体のリポソーム化

ナフタレンメタノール配糖体として、前記式(2)中のGがGlcNAc β 1, 4-Gal β 1, 1-である「GlcNAc β 1, 4Gal β 1, 1NM」(NM:ナフタレンメタノール)を用い、コレスタノール配糖体のリポソーム化と同様の条件にてリポソーム化を行なった。

[0044] 実施例3 セラミド配糖体のリポソーム化

セラミド配糖体として、前記式(3)中のGがGlcNAc β 1, 3-Gal β 1, 4-Glc-である「GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc β 1, 1Ceramide」を用い、コレスタノール配糖体のリポソーム化と同様の方法にてリポソーム化を行なった。但し、該リポソーム化の場合は安定化剤としてコレステロールを添加した。

[0045] 実施例4 リポソーム化コレスタノール配糖体による細胞増殖阻害効果

培養癌細胞株(colon26 wild)を96穴プレートに、 1×10^4 cells/100 μ l/wellとなるように播種した後、コレスタノール配糖体(GlcNAc β 1, 4GalChol、Fuc α 1, 3GalChol、Gal β Chol、Chol)及び実施例1で得られたリポソーム化コレスタノール配糖体を添加し、3日間37°Cにてインキュベートした。その後、MTTアッセイを行な

い細胞数を決定した。なお、増殖抑制率は以下の式に従って求めた。

[0046] 細胞増殖阻害率(CPI率)(%)

$$= (1 - \text{処理細胞におけるOD} / \text{未処理細胞におけるOD}) \times 100$$

[0047] その結果、単独ではほとんど効果を示さなかったFuc α 1, 3GalCholは、リポソーム化することによって著しい細胞増殖抑制効果を示した。また、従来より細胞増殖阻害効果を示していたGlcNAc β 1, 4GalCholは、リポソーム化することにより更に強い細胞増殖阻害効果を示すことが判明した(図1、2及び3)。

[0048] 実施例5 リポソーム化ナフタレンメタノール配糖体及びリポソーム化セラミド配糖体による細胞増殖阻害効果

培養癌細胞株(colo201)を96穴プレートに、 1×10^4 cells / 100μ l / wellとなるように播種した後、実施例2及び3で得られたリポソーム化ナフタレンメタノール配糖体およびリポソーム化セラミド配糖体を添加し、3日間 37°C にてインキュベートした。その後、MTTアッセイを行ない細胞数を決定した。なお、増殖抑制率は実施例4に同様にして求めた。

その結果、単独では不溶性のため殆ど効果を示さないGlcNAc β 1, 3Gal β 1 N MおよびGlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc β 1, 1Ceramideが、リポソーム化することによって著しい細胞増殖阻害効果を示すことが判明した(図4)。

[0049] 実施例6 リポソーム化コレスタノール配糖体による腹膜播腫抑制効果

(1)リポソーム化Fuc α 1, 3GalCholの粒子径による影響

Balb/cマウス(8週齢、雌)に対し、癌細胞株(colon26 wild, 5×10^4 cells / 200μ l)を腹腔内投与した。次いで、12時間、24時間及び48時間後に異なる超音波処理時間(15W \times 5, 10, 15分)により調製したリポソーム化Fuc α 1, 3GalChol(2μ mol / 100μ l)を腹腔内投与した。10日後、腸間膜における腫瘍数を測定した。超音波処理時間を長くしリポソーム粒子径を小さくするほど、腹膜播腫抑制効果示すことが判明した(図5)。

[0050] (2)リポソーム化GlcNAc β 1, 4GalCholの腹膜播腫抑制効果

Balb/cマウス(8週齢、雌)に対し、癌細胞株(colon26 wild, 5×10^4 cells / 200μ l)を腹腔内投与した。次いで、24時間及び48時間後、超音波処理(15W、15分

間)により調製したリポソーム化GlcNAc β 1, 4GalChol ($2 \mu \text{ mol} / 100 \mu \text{ l}$)を腹腔内投与した。10日後、腸間膜における腫瘍数を、21日後に大網及び腸間膜において形成した腫瘍重量を測定した。その結果、リポソーム化GlcNAc β 1, 4GalChol投与により良好な腹膜播腫抑制効果を示すことが判明した(図6及び7)。

[0051] (3)リポソーム化FucGalChol及びFucGalChol単独投与での腹膜播種抑制効果の比較

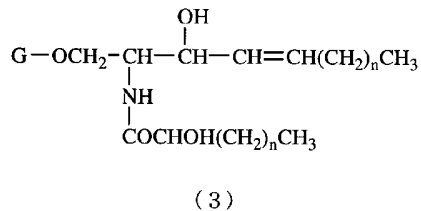
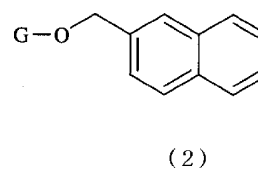
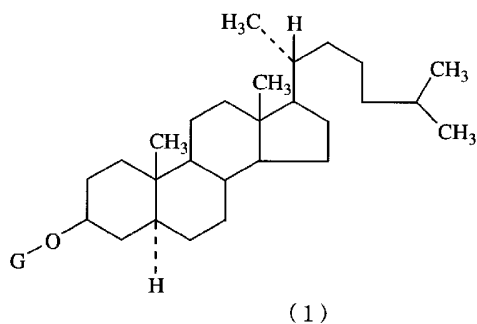
Balb/cマウス(8週齢、雌)に対し、癌細胞株(colon26 wild, $5 \times 10^4 \text{ cells} / 200 \mu \text{ l}$)を腹腔内投与した。次いで、0、24及び48時間後に超音波処理(15W、15分間)により調製したリポソーム化FucGalChol及びFucGalCholの腹腔内投与を行った(いずれも $2 \mu \text{ mol} / 100 \mu \text{ l}$)。10日後、腸間膜に形成された腫瘍数を測定した。

その結果、無処理、FucGalChol投与群に比べて、リポソーム化FucGalChol投与群では、腫瘍の形成が強く抑制されていることが判明した(図8)。

請求の範囲

- [1] 抗腫瘍活性を有し、糖としてGlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc又はGal-を有するリポソーム化可能な疎水性化合物の配糖体、リン脂質及び正電荷供与物質を含有するリポソーム。
- [2] 下記の式(1)～(3)：

[化1]

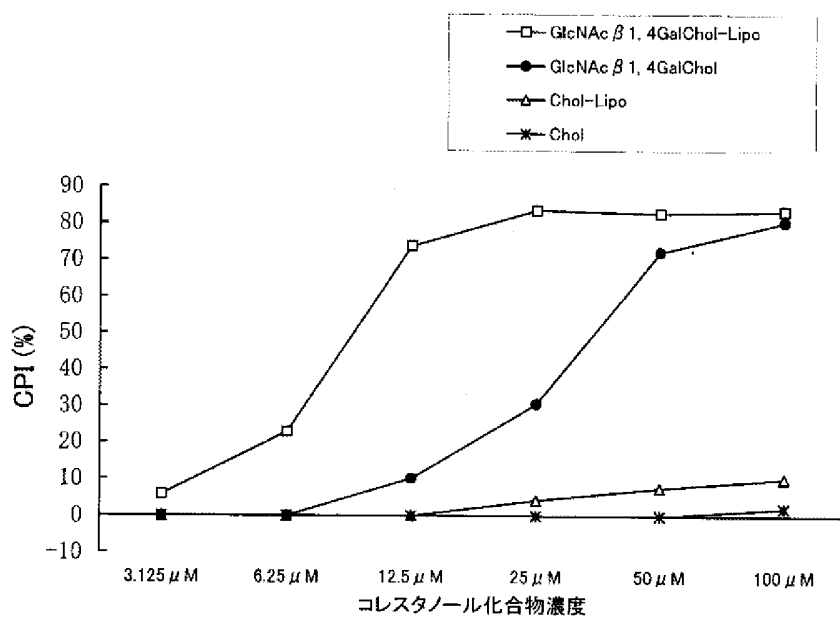


[式中、GはGlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc-又はGal-を示し、nは12～26の整数を示す。]

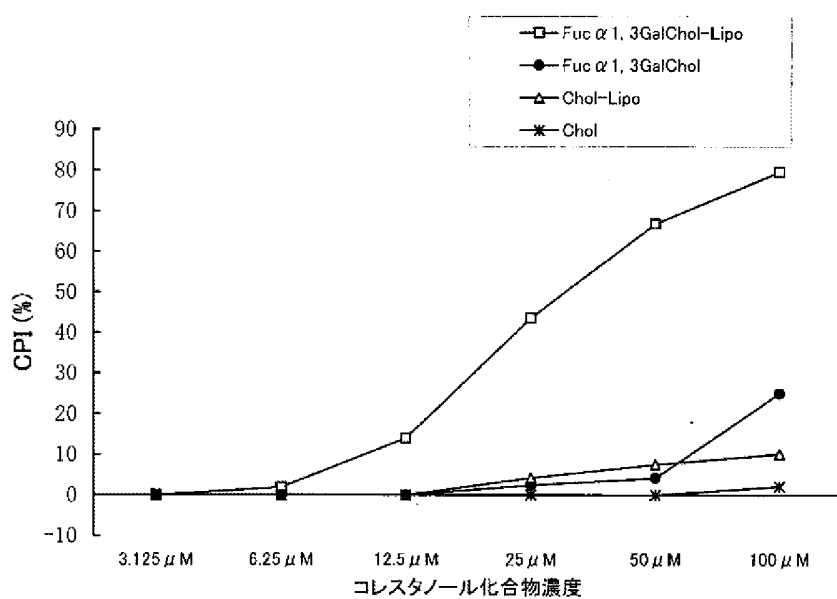
から選ばれる配糖体、リン脂質及び正電荷供与物質を含有するリポソーム。

- [3] 正電荷供与物質が、脂肪族アミンである請求項1又は2に記載のリポソーム。
- [4] 請求項1～3のいずれか1項記載のリポソームを含有する抗癌剤。

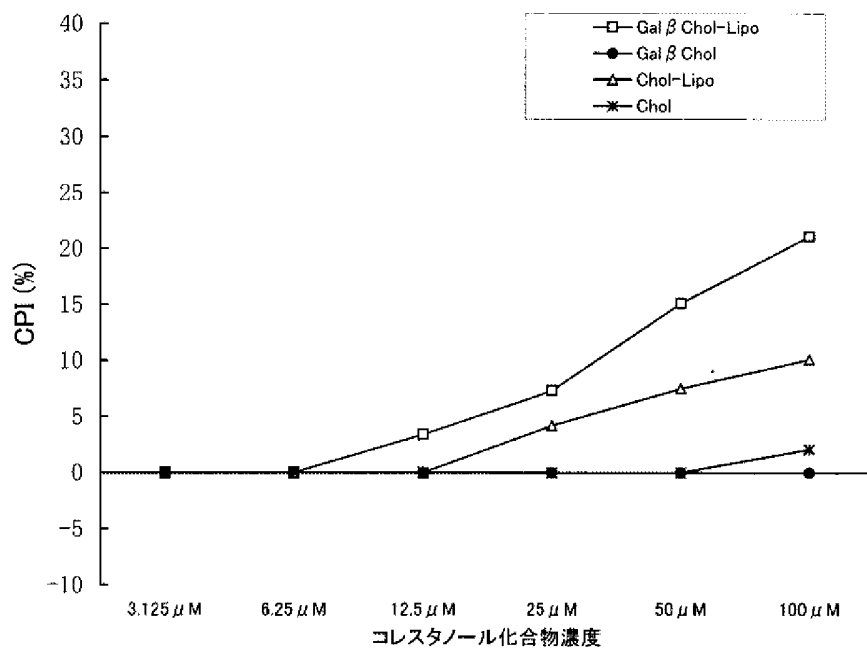
[図1]



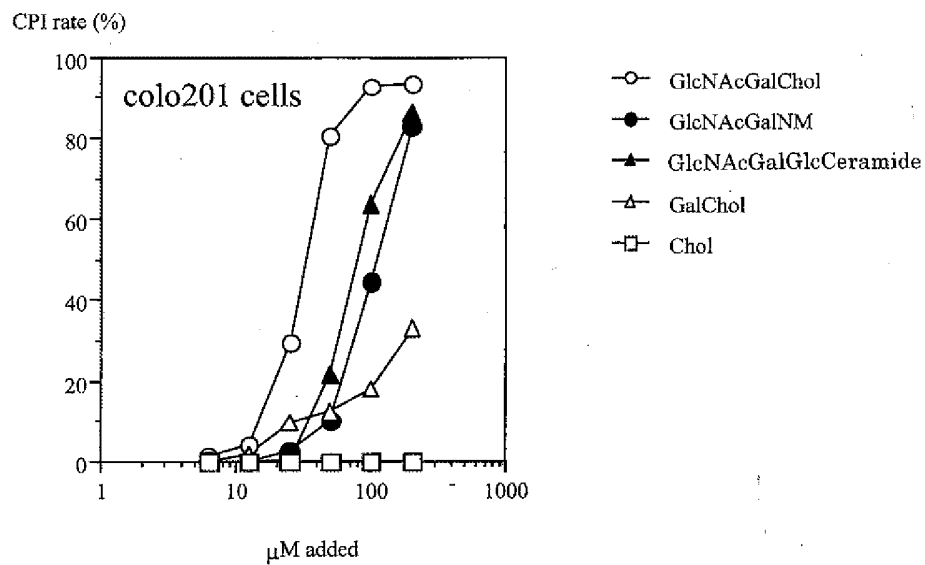
[図2]



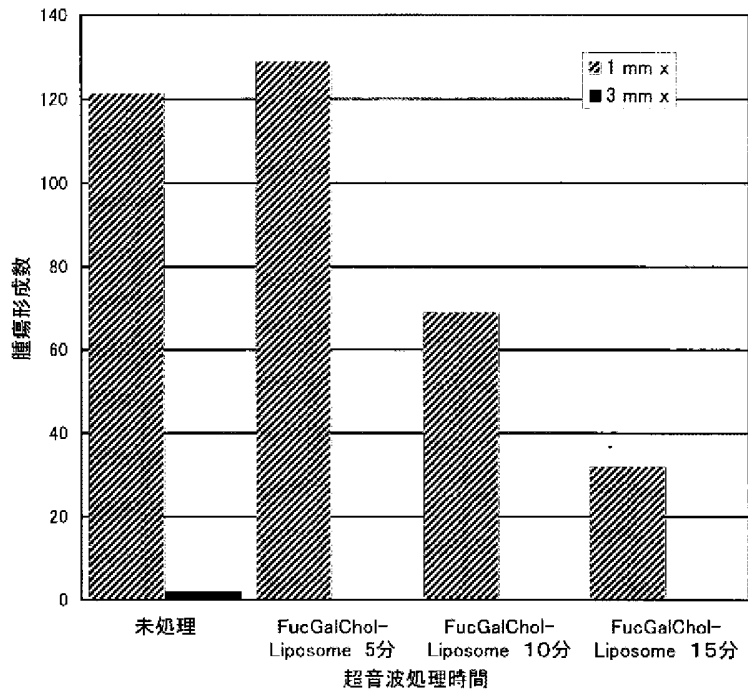
[図3]



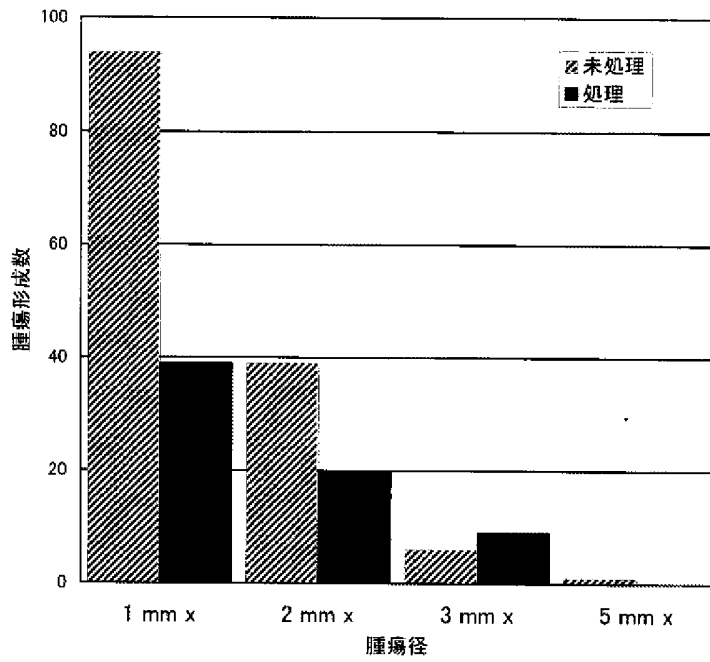
[図4]



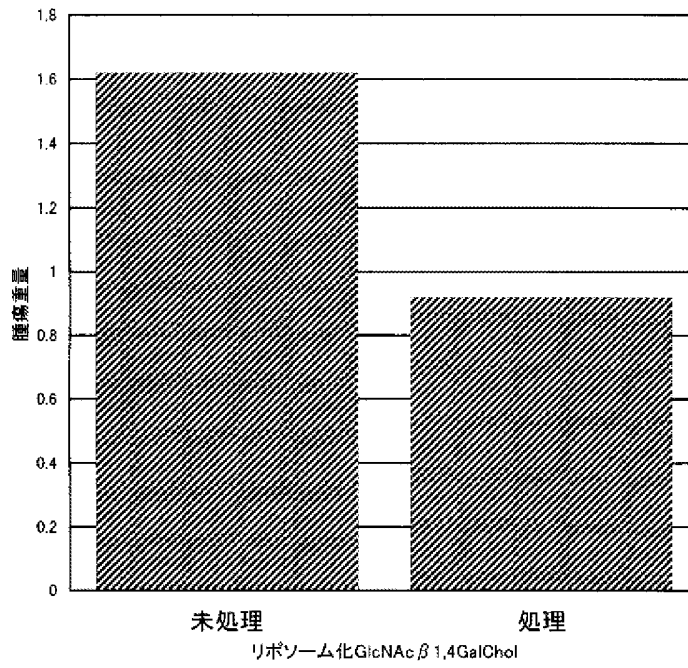
[圖5]



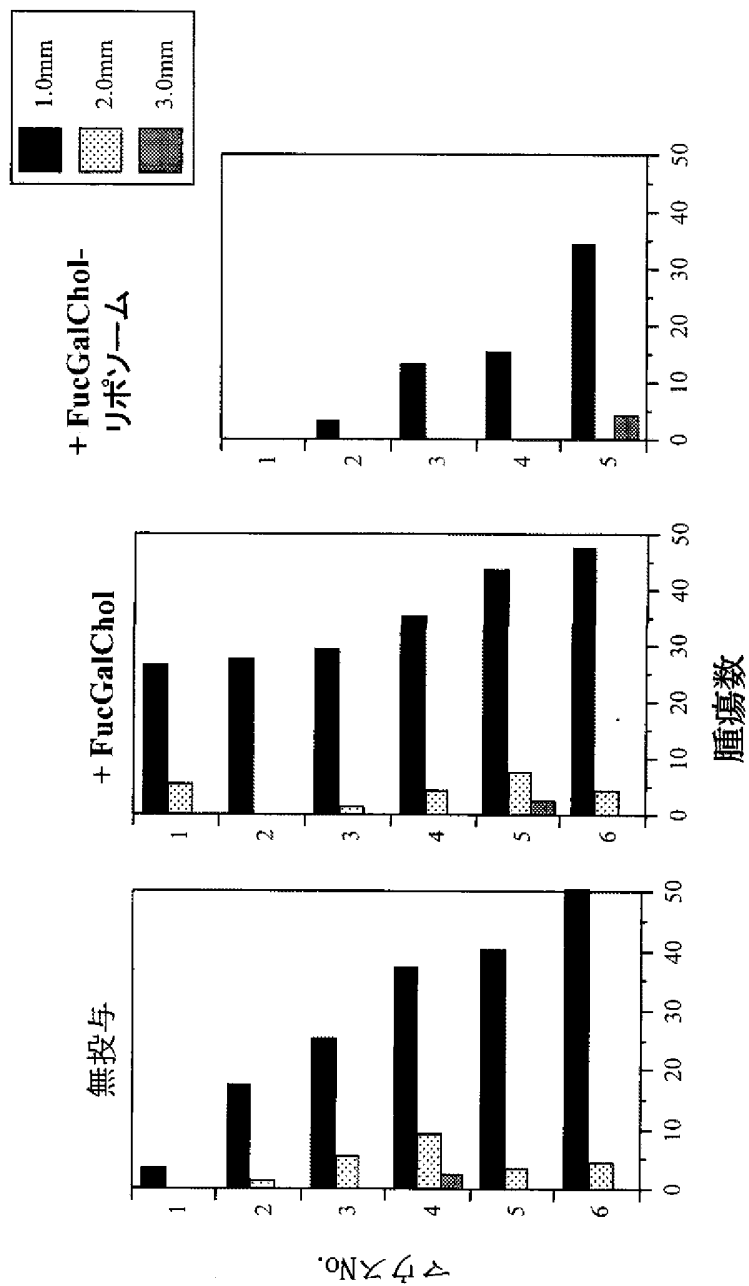
[圖6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/704, 31/7032, 9/127, 47/18, 47/24, A61P35/00,
C07J17/00, C07H15/18, 15/10

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.Cl⁷ A61K31/704, 31/7032, 9/127, 47/18, 47/24, A61P35/00,
C07J17/00, C07H15/18, 15/10

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)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-60592 A (Japan Immuno Research Laboratories Co., Ltd.), 02 March, 1999 (02.03.99), Claim 1 (Family: none)	1-4
Y	JP 2000-191685 A (Japan Immuno Research Laboratories Co., Ltd.), 11 July, 2000 (11.07.00), Claims 1 to 4 (Family: none)	1-4
Y	Arun K. Sarkar, Fucosylation of Disaccharide Precursors of Sialyl Lewis ^x Inhibit Selectin-mediated Cell Adhesion, The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol.272, No.41, pages 25608 to 25616	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 application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 August, 2004 (04.08.04)

Date of mailing of the international search report
24 August, 2004 (24.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010103

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 3-279394 A (Tosoh Corp.), 10 December, 1991 (10.12.91), Example 1 (Family: none)	1-4
Y	JP 1-93562 A (Shionogi & Co., Ltd.), 12 April, 1989 (12.04.89), Claim 1; examples 23, 27 (Family: none)	1-4
Y	JP 2002-503685 A (CILAG AG INTERNATIONAL), 05 February, 2002 (05.02.02), Par. Nos. [0007], [0019] & EP 937456 A1 & WO 99/42085 A1	1-4
Y	JP 2000-319200 A (Terumo Corp.), 21 November, 2000 (21.11.00), Claims 1 to 5; Par. Nos. [0003], [0033] (Family: none)	1-4
Y	JP 2001-354639 A (Terumo Corp.), 25 December, 2001 (25.12.01), Par. Nos. [0004], [0023] (Family: none)	1-4
A	Robert J. Stewart, A Carbohydrate-Carbohydrate Interaction between Galactosylceramide-Contain ing Liposomes and Cerebroside Sulfate-Containing Liposomes: Dependence on the Glycolipid Ceramide Composition, Biochemistry, 1993, Vol.32, pages 10666 to 10674	1-4

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl⁷ A61K31/704, 31/7032, 9/127, 47/18, 47/24, A61P35/00, C07J17/00, C07H15/18, 15/10</p>														
<p>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. Cl⁷ A61K31/704, 31/7032, 9/127, 47/18, 47/24, A61P35/00, C07J17/00, C07H15/18, 15/10</p>														
<p>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</p>														
<p>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) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 11-60592 A (株式会社日本抗体研究所) 1999. 03. 02, 請求項 1 (ファミリーなし)</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2000-191685 A (株式会社日本抗体研究所) 2000. 07. 11, 請求項 1-4 (ファミリーなし)</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Arun K. Sarkar, Fucosylation of Disaccharide Precursors of Sialyl Lewis^x Inhibit Selectin-mediated Cell Adhesion, The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No. 41, Pages 25608-25616</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			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	Y	JP 11-60592 A (株式会社日本抗体研究所) 1999. 03. 02, 請求項 1 (ファミリーなし)	1-4	Y	JP 2000-191685 A (株式会社日本抗体研究所) 2000. 07. 11, 請求項 1-4 (ファミリーなし)	1-4	Y	Arun K. Sarkar, Fucosylation of Disaccharide Precursors of Sialyl Lewis ^x Inhibit Selectin-mediated Cell Adhesion, The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No. 41, Pages 25608-25616	1-4
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												
Y	JP 11-60592 A (株式会社日本抗体研究所) 1999. 03. 02, 請求項 1 (ファミリーなし)	1-4												
Y	JP 2000-191685 A (株式会社日本抗体研究所) 2000. 07. 11, 請求項 1-4 (ファミリーなし)	1-4												
Y	Arun K. Sarkar, Fucosylation of Disaccharide Precursors of Sialyl Lewis ^x Inhibit Selectin-mediated Cell Adhesion, The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No. 41, Pages 25608-25616	1-4												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 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」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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</p>														
<p>国際調査を完了した日 04. 08. 2004</p>	<p>国際調査報告の発送日 24. 8. 2004</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 渡辺 仁</p>	<p>4C 3229</p>												
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>														

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 3-279394 A (東ソー株式会社) 1991. 12. 10, 実施例 1 (ファミリーなし)	1-4
Y	JP 1-93562 A (塩野義製薬株式会社) 1989. 04. 12, 請求項 1, 実施例 2 3, 実施例 2 7 (ファミリーなし)	1-4
Y	JP 2002-503685 A (シラグ・アクチエンゲゼルシャフト・インターナショナル) 2002. 02. 05, 【0007】, 【0019】 & EP 937456 A1 & WO 99/42085 A1	1-4
Y	JP 2000-319200 A (テルモ株式会社) 2000. 11. 21, 請求項 1-5, 【0003】, 【0033】 (ファミリーなし)	1-4
Y	JP 2001-354639 A (テルモ株式会社) 2001. 12. 25, 【0004】, 【0023】 (ファミリーなし)	1-4
A	Robert J. Stewart, A Carbohydrate-Carbohydrate Interaction between Galactosylceramide-Containing Liposomes and Cerebroside Sulfate-Containing Liposomes: Dependence on the Glycolipid Ceramide Composition, Biochemistry, 1993, Vol. 32, Pages 10666-10674	1-4