

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536857

(P2004-536857A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 K 31/498

A 6 1 K 47/44

A 6 1 P 35/00

// C 0 7 D 241/46

F I

A 6 1 K 31/498

A 6 1 K 47/44

A 6 1 P 35/00

C 0 7 D 241/46

テーマコード (参考)

4 C 0 7 6

4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁)

(21) 出願番号 特願2003-513564 (P2003-513564)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月16日 (2002.7.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年1月15日 (2004.1.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2002/000954
 (87) 国際公開番号 W02003/007957
 (87) 国際公開日 平成15年1月30日 (2003.1.30)
 (31) 優先権主張番号 PR 6443
 (32) 優先日 平成13年7月17日 (2001.7.17)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 504018297
 ユニサーチ リミテッド
 オーストラリア 2052 ニュー サウス
 ウェールズ シドニー ユニバーシテ
 ィ オブ ニュー サウス ウェールズ
 パーカー ストリート ルパート マイヤ
 ーズ ビルディング
 (74) 代理人 100065868
 弁理士 角田 嘉宏
 (74) 代理人 100106242
 弁理士 古川 安航
 (74) 代理人 100110951
 弁理士 西谷 俊男
 (74) 代理人 100114834
 弁理士 幅 慶司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療のための方法及び組成物

(57) 【要約】

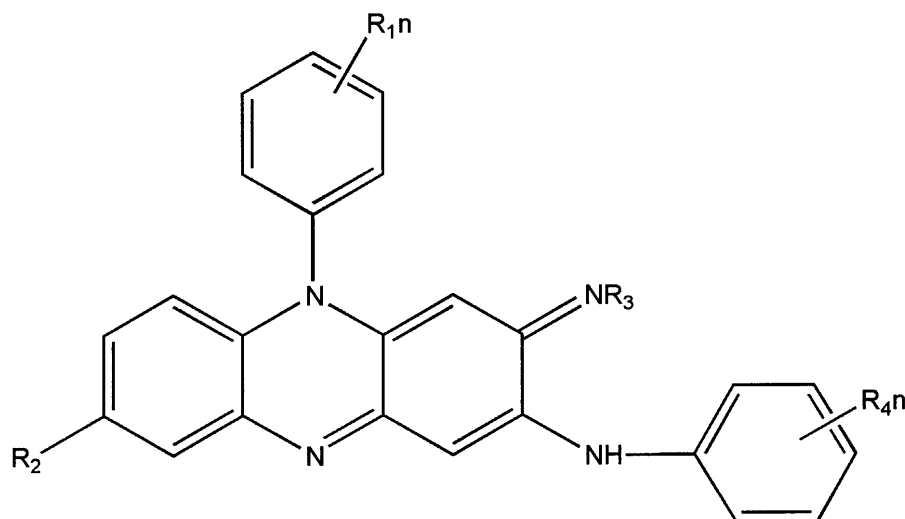
本発明は、腫瘍の治療の方法を提供する。方法は、治療上有効な量のリミノフェナジン化合物からなる組成物を腫瘍のサイトへの領域送達を含んでいる。本発明は、さらに脂質と組合せてリミノフェナジン化合物を含んでいる組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍のサイトへ治療上の有効量の下記構造式 I の化合物、それらの類似物、又は、それらの代謝物を含むしている組成物の領域送達からなる方法である、対象物の腫瘍の処置の方法：

【化 1】



構造式 I

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N, N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチル、ピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1 以上 3 以下の数である。

【請求項 2】

R_1 は、1 の位置で有し、好ましくは Cl である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

$n = 1$ であり、 R_1 は Cl であり、 R_2 は H であり、 R_3 は $CH(CH_3)_2$ であり、かつ、 R_4 は Cl である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

リミノフェナジン化合物は、クロファジミンである請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記腫瘍は、肝臓癌又は肝臓中の二次癌である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記領域送達は、肝臓の動脈経路である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記腫瘍は、他の器官中の結腸直腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌及び二次転移からなる群から選択される請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記組成物は、主動脈を通過してポンプ経路で溶液の連続的な輸液として投与される請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

。

【請求項 9】

前記組成物は、腹腔内に投与される請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記組成物は、さらに脂質を含有している請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記脂質は、腫瘍がどん欲であるための脂質である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記脂質は、油であり、

好ましくは油は、例えば、CT、MRI又はPETである外部手段によってイメージされる請求項 10 又は 11 に記載の方法。 10

【請求項 13】

前記油は、ヨード化油である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記油は、リピオドールである請求項 11 に記載の方法。

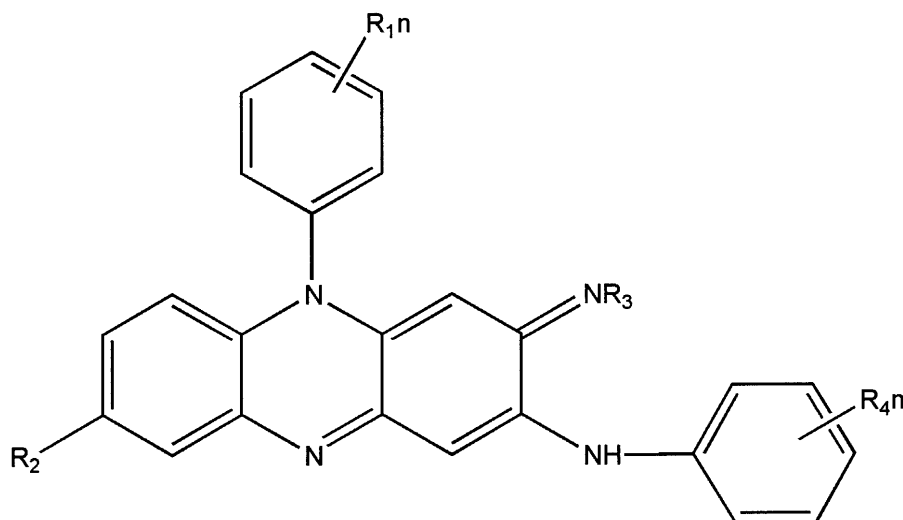
【請求項 15】

前記脂質は、大豆油、脂肪酸モノグリセリド、中鎖トリグリセライド、オリーブ油、落花生油、クルミ油、肝油、ニトロオキシル脂肪酸、エチルリノール酸塩、ポリヨード化トリグリセリド及びポリヨード化トリアシルグリセロールからなる群から選択される請求項 10 に記載の方法。 20

【請求項 16】

脂質キャリアー、及び、少なくとも $0.1 \mu\text{M}$ の濃度の下記構造式 I の化合物を含有している組成物である、対象物の腫瘍の処置において、使用するための製薬組成物：

【化 2】



構造式 I

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N,N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチルピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1 以上 3 以下の数である。

【請求項 17】

R₁は、1の位置で有し、好ましくはClである請求項16記載の組成物。

【請求項 18】

n = 1であり、R₁はClであり、R₂はHであり、R₃はCH(CH₃)₂であり、かつ、R₄はClである請求項16又は17記載の組成物。

【請求項 19】

リミノフェナジン化合物は、クロファジミンである請求項16～18のいずれかに記載の組成物。

【請求項 20】

前記脂質キャリアーは、腫瘍がどん欲であるための脂質である請求項16～19のいずれかに記載の組成物。 10

【請求項 21】

前記脂質は、油である請求項16～20のいずれかに記載の組成物。

【請求項 22】

前記油は、ヨード化油である請求項21記載の組成物。

【請求項 23】

前記油は、リピオドールである請求項21記載の組成物。

【請求項 24】

前記脂質は、大豆油、脂肪酸モノグリセリド、中鎖トリグリセライド、オリーブ油、落花生油、クルミ油、肝油、ニトロオキシル脂肪酸、エチルリノール酸塩、ポリヨード化トリグリセリド及びポリヨード化トリアシルグリセロールスからなる群から選択される請求項16～19のいずれかに記載の組成物。 20

【請求項 25】

リミノフェナジン化合物は、少なくとも約0.5 μMの濃度で組成物中に存在している請求項16～24のいずれかに記載の組成物。

【請求項 26】

前記リミノフェナジン化合物の濃度は、約0.1 μM以上10 μM以下の範囲である請求項16～25のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、癌の治療のための方法に関し、特に、肝臓癌の治療のための方法に関する。本発明は、さらにそのような治療で使用するための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

肝細胞性の癌（HCC）は、最も悪性の腫瘍の一つであり、7番めに一般的な癌として世界的にランクされる。アジアの国々において、最も一般的なものである癌と、その発生率で相当な変化がある。陰険な発病により、大多数のHCCは、診断で切除できない。HCCの治療で、体系的に使用される現在の化学療法剤は、あまり良好でなかった（例えば、非特許文献1～5参照）。近年、HCCで薬の領域送達のための利点は、記載されている。一方、有毒結果から身体に残りを使用しない処置のルートは、直接、腫瘍のサイトで薬をより高濃度にする。さらに、リピオドールのような油中の薬の送達（高度に取り上げられ、肝臓腫瘍のそばで長期間で保持される）は、さらに処置のルートの選択性を増加させる（例えば、非特許文献6～8参照）。このように、局所の肝臓の高いレベルの送達によって、クロファジミン又はその類似体に敏感な肝臓の腫瘍を処置する。 40

しかしながら、問題の薬は、適切に送達されるためにリポドールのような油に非常に可溶性であり、その後、腫瘍で脂質から薬の放出を保持しなければならない。

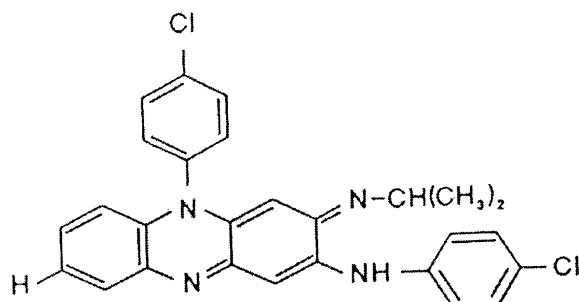
【0003】

クロファジミンは、リミノフェナジン化合物である（分子量473.14、その複雑な複素環構造による正常な条件下で深い赤からオレンジ色への特有の性質）（例えば、非特許 50

文献 9 参照)。それは、結核の治療法を見つけるプロジェクトの一部として、1944 年からのアイルランドの医学研究会議の研究所によって合成された化合物（リミノフェナジン）のクラスの最も活性な抗ミコバクテリウム剤としてイメージされた。クロファジミンの数百の誘導体が潜在的な治療の使用のために研究所で合成されテストされた。

【0004】

【化 3】



10

【0005】

クロファジミンの構造 $[C_{27}H_{22}Cl_2N_2; 3 - (4 - \text{クロロアニリノ}) - 10 - (4 - \text{クロロフェニル}) - 2,10 - \text{ジヒドロ} - 2 - (\text{イソプロピルイミノ}) - \text{フェナジン}]$

20

クロファジミンは、1962 年以来ミコバクテリウムの疾病の治療で使用された。それは、多くの疾病の取り扱いに臨床的に有効及び安全であり、また、多重バチルス（ハンセン病）の治療でダブソーン及びリファンプシンと結合して主として使用される。現在、クロファジミンの主な使用は、癰腫のハンセン病のために、世界健康機構で複合薬治療である。クロファジミンは、一般に安全な薬であると考えられる。しかしながら、その使用に関連したいくつかの欠点及び副作用がある。副作用は、通常穏やかであり、服用量に関連され、また、可逆的である。最も一般的な副作用は、皮膚の赤い褐色の変色（高い服用量の全ての患者で目に見える）である。ある文化（特に何人かのアジア民族）は、着色を非難していること及び承諾をしていない。また、これは治療制度に対する拒絶の主な原因である（例えば、非特許文献 9 ~ 12 参照）。

30

【0006】

クロファジミン又はその類似体の抗菌効果は、多数の科学的出版物及び特許の主題であった。

【0007】

最近、2つのグループの研究者は、HCCの治療で経口のクロファジミンを使用することを報告した。Ruff他は、クロファジミンを有する処置でそれらの患者（HCC）の10%（3/30）は、対象の反応を有し、一方、40%（13/30）は、20か月以内の間、疾病の安定化を有したと報告した（例えば、非特許文献 13 参照）。以下の研究で、Falkson他は、クロファジミンのみを有するHCCのための治療でそれらの患者のうちのいくつかで対象の反応がないことを報告した（例えば、非特許文献 14 参照）。

40

【0008】

VAN Rensburg他、FaDu、人間の扁平上皮細胞癌、生体外のPLC/PRF 5の人間のHCC細胞系列、ハツカネズミの化学的に引き起こされた肉腫及び生体内のネズミの乳房の腫瘍に対するクロファジミンの活性を報告した（例えば、非特許文献 15 及び 16 参照）。同様に、Sri-Pathmanthanは、クロファジミンが生体外及び生体内である（ヌードマウス異種移植片）両方の条件下で人間の肺癌細胞に対して活性であることを示した（例えば、非特許文献 17 参照）。より最近、米国特許 5763443 号（開示は参照してここに組込まれる）は、リミノフェナジンの複合薬物耐性（MDR）活性を示唆した。

【非特許文献 1】

Okada, S. 肝細胞性癌の化学療法、Hepatogastroenterology 45: 1259-63頁、1998年

50

【非特許文献 2】

Tang, Z. Y. 肝細胞性癌、J. Gastroenterol. Hepatol. 15: (Suppl.) G1-7, 2000年

【非特許文献 3】

Akriviadis, E.A., Llovet, J.M., Efremidis, S.C. 肝細胞性癌、Br. J. Surg. 85: 1319-31頁、1998年

【非特許文献 4】

Mathurin, P., Rixe, D., Carbonell, N他、Review article: Overview of medical treatments in unresectable hepatocellular carcinoma - an impossible meta analysis? Aliment. Pharmacol. Ther. 12: 111-26頁、1998年

【非特許文献 5】

Farmers, D. G., Rosove, M.H., Shaked, A.他、肝細胞性癌のための現在の治療形式、Ann. Surg. 219: 236-47頁、1994年

【非特許文献 6】

Bhattacharya, S., Dhillon A. P., Winslet M. C他、ヨード化油を組み込まれた人の肝臓癌細胞及び内皮細胞、Br. J. Cancer 73: 877-881頁、1996年

【非特許文献 7】

Nakakuma, K., Tashiro, S., Hiraoka, T他、肝臓癌に結合する物を与える肝臓の動脈に注入される油の抗癌剤を有する抗癌性治療に関する研究、Cancer 52: 2193-2200頁、1983年

【非特許文献 8】

Chou, F. I., Fang, K. C., Chung, C他、人の肝臓癌細胞によるリピオドール取り込み及び保持、Nucl. Med. Biol. 22: 379-386頁、1995年

【非特許文献 9】

O' Conner, R., O' Sullivan, J. F., O' Kennedy, R. クロファジミンの薬物学、新陳代謝及び化学、Drug Metab. Rev. 27: 591-614頁、1995年

【非特許文献 10】

Arbiser, J. J., Moschella, S. L. M. Clofazimine: A review of its medical uses and mechanisms of action. J. A. Acad. Dermatol. 32: 241-7頁、1995年

【非特許文献 11】

Dollery, C. (ed.) Clofazimine. In "Therapeutic drugs" .pp C282-C286, Churchill -Livingstone, 1995年

【非特許文献 12】

Reddy, V. M., Nadadhur, G., Daneluzzi, D他、クロファジミン、並びに、その新しい類似体 B 4 1 5 4 及び B 4 1 5 7 の抗結核活性、Antimicrob. Agents Chemother. 40: 633-636頁、1996年

【非特許文献 13】

uff, P., Chasen, M. R., Long, J. E. H他、切除できずかつ転移性の肝細胞性癌の経口のクロファジミンに関する過程 I I の研究、Ann. Oncol. 9: 217-219頁、1998年

【非特許文献 14】

Falkson, C. I., Falkson, G. 発達して切除できず主要な肝細胞性癌のアドリアマイシンとクロファジミンとの過程 I I の評価、Oncology 57: 232-235頁、1999年

【非特許文献 15】

Van Rensburg, C. E. J., Durandt, C., Garlinski, P. J他、腫瘍が生じているネズミ及びハツカネズミのリミノフェナジン剤のクロファジミン及び B 6 6 9 の抗腫瘍活性の評価、Int. J. Oncol. 3: 1011-1013頁、1993年

【非特許文献 16】

Van Rensburg, C., E., J., Van Staden, A., M., Anderson, R. リミノフェナジン剤のクロファジミン及び B 6 6 9 (酸化及び非酸化メカニズムによるホスホリパーゼ A 2 によって生体外の癌細胞系列の増殖を禁止する)、Cancer Res. 53: 318-323頁、1993年

【非特許文献 17】

10

20

30

40

50

Sri-Pathmanathan, R., M., Plumb, J., A., Fearon, K., C., H. クロファジミンはエネルギー代謝を変更し、生体外と生体内とである人の肺癌細胞系列の成長率を禁じる、Int. J. Cancer 56: 900-905頁、1994年

【非特許文献 18】

Labarca, C., Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Anal. Biochem. 102: 344-352頁、1980年

【非特許文献 19】

Hafeli, U. O., Casillas, S., Dietz, D. W他、放射性のレニウム (186RE / 188RE) ガラス微粒子を使用するネズミモデルの肝臓の腫瘍の放射性塞栓形成、Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 44: 189-199頁、1999年

10

【非特許文献 20】

Kurth, S., Bulian, D., Kreft, B他、ネズミの移植された実験の肝臓腫瘍用の単一剤の抗癌剤としてフルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、モトマイシン C、シスプラチン又はメトトレキサートを用いる動脈内の肝臓の化学療法、J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 421-426頁、1996年

【非特許文献 21】

Pourgholami, M. H., Akhter, J., Finlay, I. G他、リピオドールに溶解された 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D 3 は、人の肝芽腫の細胞系列HepG2で保持された抗増殖の結果を生じる、Anticancer Res. 20: 723-728頁、2000年

【非特許文献 22】

20

Finlay, I. G., Stewart, G. J., Pourgholami, M. H他、肝臓癌の 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D 3 - A 潜在的な新しい治療法の肝臓の主要な投薬のための送達剤としてのリピオドールと中鎖トリグリセリドとの使用、Anticancer Res. 20: 2705-2710頁、2000年

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、クロファジミンが一連の肝臓及び結腸直腸の癌細胞系列の増殖の有力な抑制剤であることを示した。

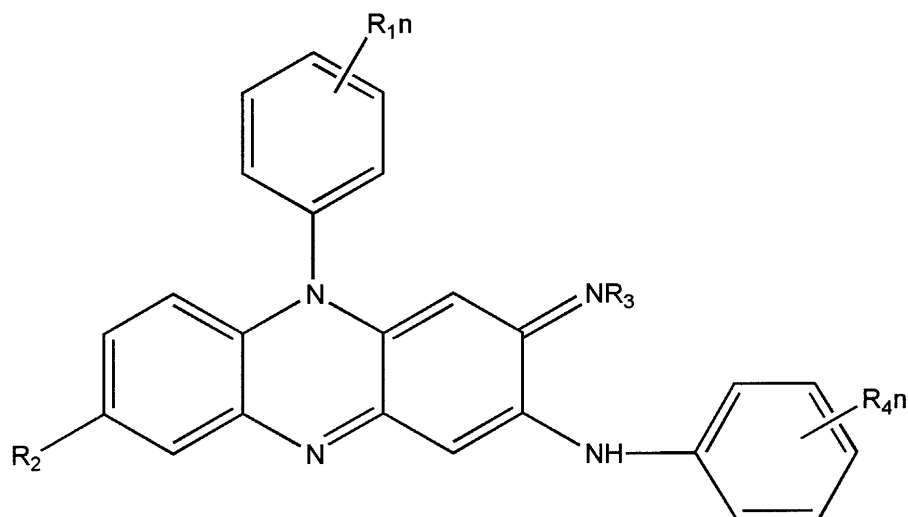
【0010】

すなわち、第1の形態で、本発明は、腫瘍のサイトへ治療上の有効量の下記構造式 I の化合物、それらの類似物、又は、それらの代謝物を含有している組成物の領域送達からなる方法である、対象物の腫瘍の処置の方法を提供する。

30

【0011】

【化4】



構造式 I

10

【 0 0 1 2 】

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N, N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチル、ピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1 以上 3 以下の数である。

20

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 3 】

肝臓へのリミノフェナジン化合物の領域処理を示す本発明は、肝臓腫瘍の処置で多くの利点を提供する。本発明は、さらに結腸直腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、中皮腫、腎臓癌及び脂肪肉腫のような他の癌の腫瘍へのリミノフェナジン化合物の領域送達を通じて利益が得られてもよいことがわかる。

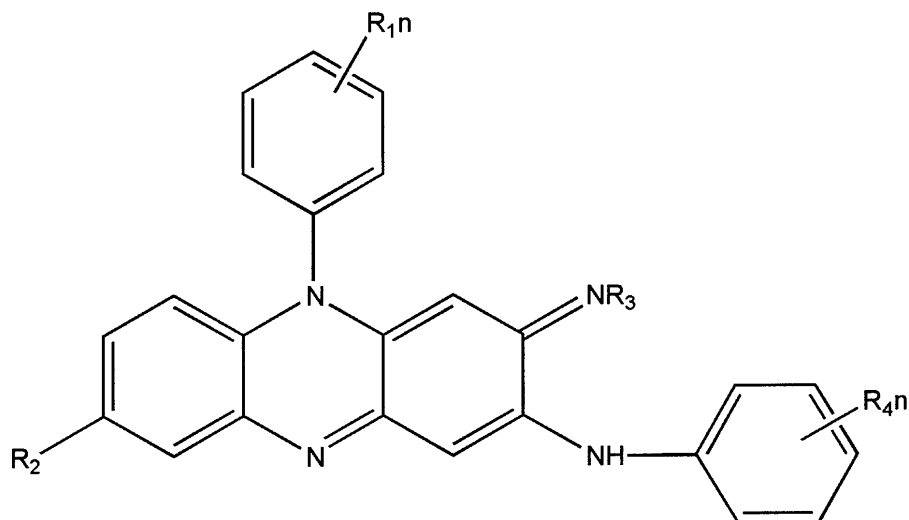
30

【 0 0 1 4 】

すなわち、第 1 の形態で、本発明は、腫瘍のサイトへ治療上の有効量の下記構造式 I の化合物、それらの類似物、又は、それらの代謝物を含有している組成物の領域送達からなる方法である、対象物の腫瘍の処置の方法からなる。

【 0 0 1 5 】

【 化 5 】



構造式 I

10

【 0 0 1 6 】

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N,N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチル、ピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1 以上 3 以下の数である。

20

【 0 0 1 7 】

好ましくは、 R_1 は、1 の位置で有し、好ましくは Cl である。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、 $n = 1$ であり、 R_1 は Cl であり、 R_2 は H であり、 R_3 は $CH(CH_3)_2$ であり、かつ、 R_4 は Cl である。

30

【 0 0 1 9 】

特に好ましくは、リミノフェナジン化合物は、クロファジミンである。

【 0 0 2 0 】

本発明の方法は、肝臓の腫瘍の治療のために特に適切である。腫瘍は、肝臓癌（一次肝臓癌）又は肝臓中の二次癌である。好ましくは、肝臓への領域送達は、肝臓の動脈経路である。

【 0 0 2 1 】

本発明の方法は、例えば、他の器官中の結腸直腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌及び二次転移のために、他の癌を治療するために使用されてもよい。

【 0 0 2 2 】

リミノフェナジン化合物の領域送達は、薬学的に許容可能な製剤で化合物を処理することにより達成されてもよい。組成物は、病気の器官の主動脈（例えば、肝臓癌のための肝臓の動脈）を通してポンプ経路で溶液の連続的な輸液として投与されてもよい。さらに、組成物は、卵巣、膵臓、胃又は他の癌から発生する腹膜の疾病を治療するために懸濁液として腹腔内に投与されてもよい。

40

【 0 0 2 3 】

製剤は、好ましくは脂質を含有している。より好ましくは、脂質は、腫瘍がどん欲であるための脂質であり、その結果、高い濃度の薬は、腫瘍に送達されてもよい。

【 0 0 2 4 】

好ましくは、脂質は、油であり、好ましくは油は、例えば、CT、MRI 又は PET である外部手

50

段によってイメージされる。好ましくは、油は、ヨード化油であり、特に油は、リピオドール、ケシの実油のヨード化されたエチルエステルである。別の好ましい実施形態で、油がヨード化されてもよいリノール酸のエチルエステルである。

【0025】

油が、リピオドールであることが本発明に好ましく、以下の基準を満たす任意の油は、化合物の領域送達に適していることが理解される、

- 1) 血液と相溶性を有し、
- 2) クロファジミン又は他の薦められるリミノフェナジンのための適切な溶剤。

【0026】

好ましくは、油が徐放性製剤の外部にモニタリングされる。そういうものとして、油が、任意の外部手段（例えば、CT、MRI、PET）によって検知を可能にする成分、化学基又は置換基を有してもよい。 10

【0027】

使用される油の例は、特に限定されず、大豆油（Tibell他、Transpl Int 1993年 6:69-72頁参照）、綿種子油、サフラワー油、脂肪酸モノグリセリド、中鎖トリグリセリド、及び、オリーブオイル、落花生油、クルミ油、肝油等のような食用油を含んでいる。クロマトグラフィーレンジで精製された油は、LarodanファインケミカルAB（www.larodan.se）から利用可能である。

【0028】

よく知られているように、そのような全ての油（リピオドールのような）は、血液の循環（Guerbetの特許参照、GB1081551）に注入されたとき、安全であるために、界面活性剤と使用されなければならない。 20

【0029】

使用される他の脂質の例は、特に限定されず、ニトロキシル脂肪酸、MRIに使用のためのNFA（Gallez他、Magn Reson Med 1993年 30:592-599頁参照）、CTのためのポリヨード化されたトリグリセリド（Weichert他、J Med Chem 1995年 38:636-646頁参照）、及び、CTのためのポリヨード化されたトリアシルグリセロール（Weichert他、J Med Chem 1986年 29:2457-65頁参照）を含んでいる。

【0030】

システムの処置と比較して、リピオドールのような脂質を使用する領域送達は、薬の望まれない影響に他の身体器官のさらす度合いを減少し、したがって、副作用の数及び厳しさを減少する間に、腫瘍サイトでより高い薬の濃度を達成させる。HCCにおいて、これが、薬送達のためにビヒクルとしてリピオドールを選ぶことにより、さらに選択的で有効になる。 30

【0031】

肝臓の動脈に注入されたとき、油は1年を超えるまでの数週間の間、HCCによって保持されるが、7日以内に正常な肝臓柔組織から取り除かれる。任意の方法で本発明を限定せずに、HCCでリピオドール保持について説明するための試みで、1つの仮説は、それらが網内皮系のクプファー（kupffer）細胞成分を欠くので、これらの細胞がリピオドールを取り除くことができないことを示唆する。本発明者は以前に生体外で示し、1,25-ジヒドロキシビタミンD3のようなビタミンD化合物は、よくリピオドール製品に溶解し、また、HepG2細胞に対する抑制効果を保持し、また、子を産んでいるネズミに腫瘍の肝臓の動脈を通して注入されたとき、薬は腫瘍内に保持される（国際公開公報PCT/AU98/00440及びPCT/AU99/00323の開示が参照してここに組込まれる）。 40

【0032】

本発明者が、クロファジミン、リピオドール及び肝臓癌細胞系列で実験することに基づいて、彼らは、リピオドールのような油に溶解され、また、肝臓の動脈を通して投与されるクロファジミンの処置が、腫瘍細胞の増殖の保持された抑制に結びつく腫瘍細胞内の油からの薬の保持された放出に結びつくと考えている。

【0033】

クロファジミンの性能及び脂質可溶性と結び付けられるリピドールの独特な特性は、HC Cで患者で肝臓内の主要な処置のために組合せて魅力的な薬剤にする。

【 0 0 3 4 】

治療上有効な量のリミノフェナジン化合物を決定することは、型通りの計算上の方法を使用して、動物データに基づいて行われる。典型的に、リミノフェナジン化合物の濃度は、少なくとも約 0 . 1 μ Mであり、一般に約 0 . 1 から 1 0 μ Mまでの範囲である。

【 0 0 3 5 】

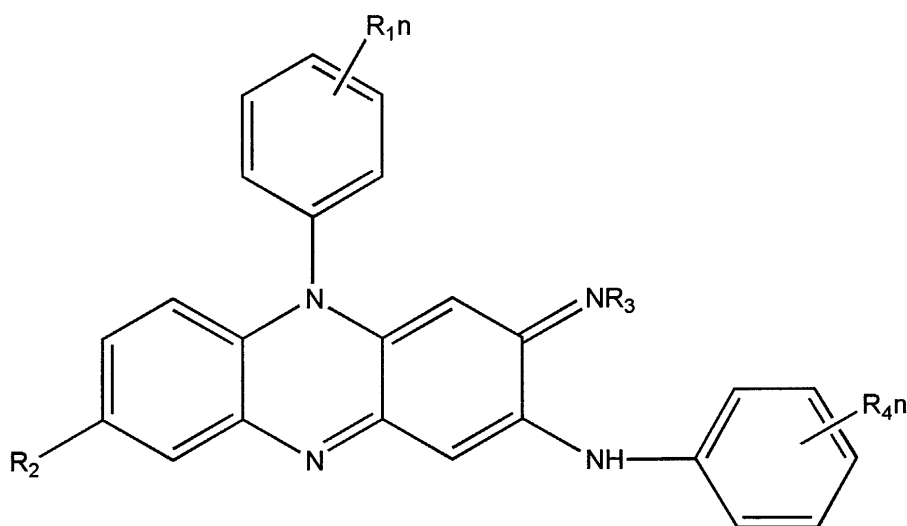
クロファジミンは 7 . 4 の $\log p$ 値 [(オクタノール / 水) ⁹] を有する、非常に脂質可溶性化合物である。

【 0 0 3 6 】

第 2 の形態で、本発明は、脂質キャリアー、及び、少なくとも 0 . 1 μ M の濃度の下記構造式 I の化合物を含有している組成物である、対象物の腫瘍の処置において、使用するための製薬組成物を提供する。

【 0 0 3 7 】

【 化 6 】



構造式 I

【 0 0 3 8 】

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N,N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチルピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1 以上 3 以下の数である。

【 0 0 3 9 】

好ましくは、 R_1 は、1 の位置で有し、好ましくは Cl である。

【 0 0 4 0 】

好ましくは、 $n = 1$ であり、 R_1 は Cl であり、 R_2 は H であり、 R_3 は $CH(CH_3)_2$ であり、かつ、 R_4 は Cl である。

【 0 0 4 1 】

脂質キャリアーが高濃度の薬が腫瘍に配達されるように、腫物がどん欲である脂質であることが好ましい。

【 0 0 4 2 】

好ましくは、脂質は、油であり、好ましくは油は、例えば、CT、MRI 又は PET である外部手

10

20

30

40

50

段によってイメージされる。好ましくは、油は、ヨード化油であり、特に油は、リピオドール、ケシの実油のヨード化されたエチルエステルである。

【0043】

油が、リピオドールであることが本発明に好ましく、以下の基準を満たす任意の油は、化合物の領域送達に適していることが理解される、

- 1) 血液と相溶性を有し、
- 2) クロファジミン又は他の薦められるリミノフェナジンのための適切な溶剤。

【0044】

好ましくは、油が徐放性製剤の外部にモニタリングされる。そういうものとして、油が、任意の外部手段（例えば、CT、MRI、PET）によって検知を可能にする成分、化学基又は置換基を有してもよい。 10

【0045】

使用される油の例は、特に限定されず、大豆油（Tibell他、Transpl Int 1993年 6:69-72頁参照）、脂肪酸モノグリセリド、中鎖トリグリセリド、及び、オリーブオイル、落花生油、クルミ油、肝油等のような食用油を含んでいる。

【0046】

よく知られているように、そのような全ての油（リピオドールのような）は、血液の循環（Guerbetの特許参照、GB1081551）に注入されたとき、安全であるために、界面活性剤と使用されなければならない。

【0047】

使用される他の脂質の例は、特に限定されず、ニトロキシル脂肪酸、MRIに使用のためのNFA（Gallez他、MagnReson Med 1993年 30:592-599頁参照）、CTのためのポリヨード化されたトリグリセリド（Weichert他、J Med Chem 1995年 38:636-646頁参照）、及び、CTのためのポリヨード化されたトリアシルグリセロール（Weichert他、J Med Chem 1986年 29:2457-65頁参照）を含んでいる。 20

【0048】

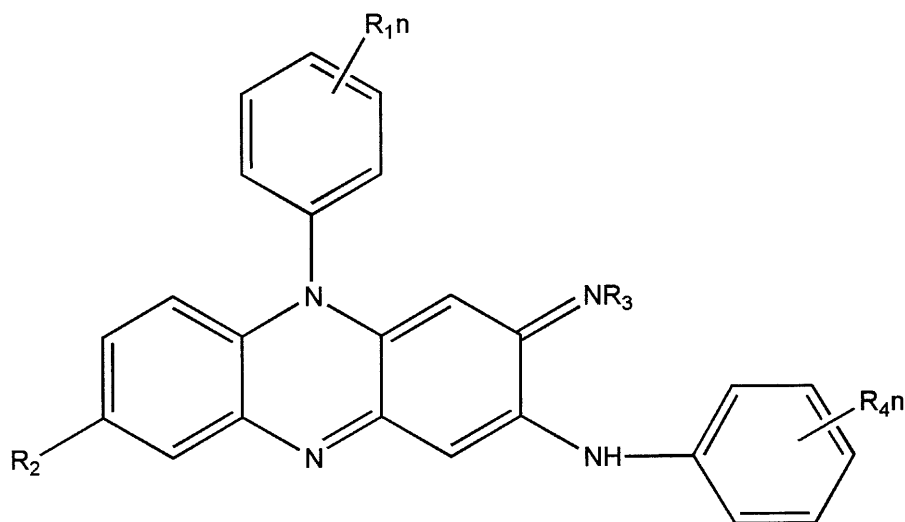
好ましくは、リミノフェナジン化合物は、少なくとも約0.5 μ Mの濃度で組成物中に存在している。リミノフェナジン化合物の濃度の上限は、化合物の溶解性によって決定される。好ましくは、しかしながら、リミノフェナジン化合物の濃度は、約0.1 μ M以上10 μ M以下の範囲である。 30

【0049】

さらに、別の形態で、本発明は、対象物の腫瘍の処置のために、腫瘍のサイトへ領域送達に適応されている薬剤の調整で、下記構造式Iの化合物、それらの類似物、又は、それらの代謝物の使用である。

【0050】

【化7】



構造式 I

10

【0051】

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N,N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチル、ピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1 以上 3 以下の数である。

20

【0052】

好ましくは、 R_1 は、1 の位置で有し、好ましくは Cl である。

【0053】

好ましくは、 $n = 1$ であり、 R_1 は Cl であり、 R_2 は H であり、 R_3 は $CH(CH_3)_2$ であり、かつ、 R_4 は Cl である。

30

【0054】

特に好ましくは、リミノフェナジン化合物は、クロファジミンである。

【0055】

薬剤は、肝臓の腫瘍の治療のために特に適切である。腫瘍は、肝臓癌（一次肝臓癌）又は肝臓中の二次癌である。好ましくは、肝臓への領域送達は、肝臓の動脈経由である。

【0056】

薬剤は、例えば、他の器官中の結腸直腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌及び二次転移のために、他の癌を治療するために使用されてもよい。

【0057】

薬剤は、好ましくは脂質を含有している。より好ましくは、脂質は、腫瘍がどん欲であるための脂質であり、その結果、高い濃度の薬は、腫瘍に送達されてもよい。

40

【0058】

好ましくは、脂質は、油であり、好ましくは油は、例えば、CT、MRI 又は PET である外部手段によってイメージされる。好ましくは、油は、ヨード化油であり、特に油は、リピオドール、ケシの実油のヨード化されたエチルエステルである。

【0059】

油が、リピオドールであることが本発明に好ましく、以下の基準を満たす任意の油は、化合物の領域送達に適し、また、徐放性製剤の外部にモニタリングされることが理解される、

50

1) 血液と相溶性を有し、

2) クロファジミン又は他の薦められるリミノフェナジンのための適切な溶剤、
3) 任意の外部手段（例えば、CT、MRI、PET）によって検知を可能にする成分、化学基又は置換基を有している。

【0060】

使用される油の例は、特に限定されず、大豆油（Tibell他、Transpl Int 1993年 6:69-72頁参照）、綿種子油、サフラワー油、脂肪酸モノグリセリド、中鎖トリグリセリド、及び、オリーブオイル、落花生油、クルミ油、肝油等のような食用油を含んでいる。クロマトグラフィーレンジで精製された油は、Larodanファインケミカル A B（www.larodan.se）から利用可能である。

【0061】

よく知られているように、そのような全ての油（リピオドールのような）は、血液の循環（Guerbetの特許参照、GB1081551）に注入されたとき、安全であるために、界面活性剤と使用されなければならない。

【0062】

使用される他の脂質の例は、特に限定されず、ニトロキシル脂肪酸、MRIに使用のためのNFA（Gallez他、MagnReson Med 1993年 30:592-599頁参照）、CTのためのポリヨード化されたトリグリセリド（Weichert他、J Med Chem 1995年 38:636-646頁参照）、及び、CTのためのポリヨード化されたトリアシルグリセロール（Weichert他、J Med Chem 1986年 29:2457-65頁参照）を含んでいる。

【0063】

システムの処置と比較して、リピオドールのような脂質を使用する領域送達は、薬の望まれない影響に他の身体器官のさらす度合いを減少し、したがって、副作用の数及び厳しさを減少する間に、腫瘍サイトでより高い薬の濃度を達成させる。HCCにおいて、これが、薬送達のためにビヒクルとしてリピオドールを選ぶことにより、さらに選択的で有効になる。

【0064】

本明細書で使用される用語「領域送達」とは、「領域的に送達すること」のように変更され、直接腫瘍に送達すること、肝臓癌のために肝臓の動脈のような影響を受けた器官を直接供給する血管へ送達すること、又は、膵臓癌のために腹腔内のような腫瘍に近接する体腔へ送達することを意味する。

【0065】

本明細書で使用される用語「個人」とは、その最も広い意味で使用され、人間及び人間でない動物をカバーするように意図される。

【0066】

本明細書で使用される単語「含んでいる」とは、「含む」又は「含んでいる」のように変更され、記載される要素、整数又はステップ、要素、整数又はステップのグループを包含し、他の要素、整数又はステップ、要素、整数又はステップのグループを排除しないことを意味するために理解される。

【0067】

明細書中で記載された全ての出版物は、参照してここに組込まれる。

【0068】

ドキュメント、行為、材料、装置、記事又は本明細書に含まれている同様なものの任意の開示は、もっぱら本発明に背景を供給する目的である。これらの内容のうちのいくつか又は全ては、先行技術ベースの一部を形成する、又は、この出願の各クレームの優先権期日前にオーストラリアで存在しているので、本発明に関する分野で共通の一般的な知識であったとは認められない。

【0069】

より完全に本発明の性質が理解されるために、本発明は以下に限定されない実施形態に関して記載される。

【実施例1】

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

肝臓癌細胞に対する生体外試験

方法：[3H]チミジン取り込み分析は、細胞増殖に対するクロファジミンの効果を検討するために使用された。ここで、付着性細胞（5 / 0 0 0 - 1 0 / 0 0 0）は、24 - ウェルコーニング組織培養皿へプレートされ、また、クロファジミン（リットル当たり 10^{-9} ~ 10^{-5} モル）のピピクル又は異なる濃度を含んでいる培地（MEM 5 % FBS）に露出された。引き離されたネズミ細胞系列であるノビコフ（Novikoff）について、2000個の細胞が、MEM（5 % FBS）の2 ml に懸濁され、付着された細胞に関しては同じ条件で維持された。培地は隔日に新鮮な培地と交換された。処置期間（5 - 10 日）の終わりに、細胞培養は、少なくとも4時間の培養の間、各ウェルに $0.5 \mu\text{Ci}$ の[3H]チミジンの添加によって取り込まれるチミジンのために分析された。取り込まれた放射能の量は、シンチレーション計数器を使用して決定された（例えば、非特許文献18参照）。結果は、培養培地で使用される薬の濃度に対する、実際の分当たりのカウントとして、又は、%抑制（コントロールと比較されるチミジン取り込みでの減少）として示される。クロファジミンと、異なる肝臓癌細胞系列、HUH-7、HepG2、SKHEP-1、Hep3-B（人間の細胞系列）及びNovikoff（ネズミ細胞系列）の処置は、これらの細胞によって、[3H]チミジン取り込みの服用量依存の抑制に結びついた（表1及び図1参照）。

【 0 0 7 1 】

【表1】

表1: 生体外の肝臓癌細胞系列の増殖のクロファジミンの効果 ([3H]チミジン取り込み)

細胞系列	[クロファジミン μM]				
	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0
HUH-7	0	38.3 ± 7.2	51.1 ± 3.4	88.9 ± 1.1	96.7 ± 0.9
HepG2	21.0 ± 1.9	38.2 ± 2.2	52.9 ± 4.7	75.6 ± 2.7	92.4 ± 1.9
SKHEP-1	30.3 ± 2.9	62.7 ± 7.1	69.0 ± 3.2	70.9 ± 2.1	97.1 ± 1.7
Hep3- β	28.4 ± 7.4	62.3 ± 3.1	91.6 ± 1.1	94.3 ± 0.07	95.4 ± 1.4
Novikoff	0	0	11.7 ± 3.3	18.9 ± 2.9	42.7 ± 4.1

【 0 0 7 2 】

値は、クロファジミンの異なる濃度で5日間処置されたとき、各細胞系列の[3H]チミジン取り込み（コントロールと比較された）の%抑制の平均値 \pm s . e . mを表す。

【 0 0 7 3 】

これらの結果は、人間の細胞系列は、クロファジミンの抗増殖の効果に全く影響されない一方、一般に化学療法及び放射線療法（例えば、非特許文献19参照）に非常に抵抗する細胞系列であるネズミ細胞系列Novikoffは、より高い薬の濃度で適度の影響を示す。テストされた人間の肝臓癌細胞系列で、Hep3- は、クロファジミンの抗増殖の効果に影響に最も高い程度を示した（図1参照）。

【実施例2】

【 0 0 7 4 】

HepG2細胞に対する生体外試験

6ウェルプレートに蒔かれたHepG2細胞は、1、3又は7日間、クロファジミン（0 - 5 μM ）で処置され、また、残っている生存できる細胞は、トリパンブルー染料方法を使用

してカウントされた。全てのカウントは、4部作製して得られた。結果は、値が平均値 ± 標準誤差を表わす図2で示される。

【実施例3】

【0075】

ネズミ肝臓癌細胞、novikofに対する生体外試験

ネズミ肝臓癌細胞、novikoffは、試験管で成長され、また、クロファジミン (0 - 10 μ M) の異なる濃度と、1、3又は7日間処置された。処置期間の終わりに、残っている生存できる細胞の数は、トリパンプルー方法を使用してカウントされた。全てのカウントは、3部作製して得られ、また、値は、平均値 ± 標準誤差を表す。その結果は、図3で示される。

10

【実施例4】

【0076】

リピオドールを使用する肝臓癌細胞に対する生体外試験

ある油及びリピオドールが特に処理られ、また、肝臓癌細胞によって保持されることが示された。この点で、私たちは以下のことを示した。

- ・細胞培養条件で、リピオドールが、肝臓癌細胞によって高度に処理される (例えば、非特許文献18参照)。

- ・肝臓腫瘍有するネズミで、リピオドールが処理され、また、腫瘍で保持される (例えば、非特許文献19参照)。

- ・肝臓腫瘍を持った患者で、リピオドールに溶解され、また、肝臓の動脈を通して注入される多量の服用量の1,25-ジヒドロキシビタミンD3の処置は、高カルシウム血症の発達に結びつかない。

20

- ・クロファジミンは、リピオドールで高度に相溶し、かつ、安定である。

【0077】

リピオドールに溶解されるクロファジミンが処置され、また、保持された抗増殖の効果を生むために細胞で徐々に放出されるか調査することにより、以下の実験が実行された。

【0078】

サブコンフルエントHepG2細胞は、ウェル当たり10 / 000細胞で24ウェル組織培養プレートに蒔かれ、また、湿った5% CO₂雰囲気中で37°でインキュベーターで24時間で培養された。その後、培地は、MEM又はMEMとリピオドール (0.5% v / v) で調整された、5 μ Mの濃度のクロファジミンを含んでいるものと交換された。これをするために、エタノールに溶解されたクロファジミンは、試験管に蒔かれ、エタノールは窒素ガストリームで蒸発され、薬はリピオドールの添加によって回収され、最後に、培地で再構成されて、適切な濃度の薬及びリピオドールを得る。コントロール細胞の2つのグループが、培地 (リピオドールはない) に構築されたクロファジミン又は培地 (薬はない) を含んでいるリピオドールで処理された。24時間後に、全ての細胞について、培地は、薬もリピオドールも含んでいない正常な培地と交換された。ここから進んで、培地は、隔日に次の9日間、交換された。処置期間の終わりに、細胞はチミジン取り込みのために分析された (上述されたように)。

30

【0079】

得られた結果 (図4) は、リピオドールに溶解され、細胞培養培地 (0.5% V / V) で希釈されたクロファジミンを有するHepG2細胞の簡潔な処置は、細胞培養培地から薬を除去したかなり後 (9日) に、細胞の増殖の保持された抑制に帰着することを明らかにする。これは、恐らく細胞の油の摂取によって、続けて細胞でそれから薬の保持された放出による。

40

【0080】

これらの生体外の結果から、細胞によって処理されるリピオドールは、培地からの薬の除去のかなり後に、クロファジミンへ細胞の連続的な露出に結びつく薬除法性製剤の役割をすると仮定されてもよい。したがって、増殖、及び、それ故 [3H] チミジン取り込みは、クロファジミン / リピオドール処置に露出される細胞で著しく減少される (p < 0.0

50

1)。

【実施例 5】

【0081】

ノビコフ (novikoff) 腫瘍を有しているネズミの生体内試験

リピオドールに溶解されたクロファジミンが生体内で活性であるか調査するために、ノビコフ (novikoff) ネズミ腫瘍モデルが、用いされた。ここに、下述する手術は、実行された。ネズミは、一般的な麻酔薬 (ハロセンガス) を与えられ、また、ラプラトミイ (lapratomy) で実行された。その後、 $100\mu\text{L}$ の培地に懸濁された 2×10^6 ノビコフ (novikoff) 細胞は、 $26\text{G} \times 3/8$ ツベルクリン針を使用して、肝臓カプセルの下に注入された。腹部の切り込みは、縫合で閉じられた。全ての手術は、全身麻酔及び無菌条件で実行された。 10

【0082】

7日後に、別のラプラトミイ (lapratomy) は実行され、また、腫瘍体積 (V_1) を測定した後に、肝臓の動脈にカテーテルは入れられるが、 $100\mu\text{L}$ の無菌標準食塩水、リピオドール又はクロファジミン ($100\mu\text{L}$ のリピオドールに溶解された 0.4mg) は、ゆっくり注入された。7日後に、動物は安楽死させられ、また、腫瘍体積 (V_2) は、測定された。その結果は、図 5 に示される。

【実施例 6】

【0083】

ビリルビン測定

クロファジミン ($100\mu\text{L}$ のリピオドール中 0.4mg) の一回の肝臓内の主要な服用量で処置された動物からのプラズマサンプルは、合計ビリルビンのために分析された。血液は、ちょうど動物の安楽死に先立った薬物療法を提供された 7 日、心臓の穿刺を通して収集された。その結果は図 6 に示される。 20

【実施例 7】

【0084】

クロファジミンの経口投与

ネズミ (男性の S.D.) は、 2×10^6 ネズミ肝臓癌細胞を有する肝臓に接種された。7日後に、別のラプラトミイ (lapratomy) は実行され、また、腫瘍体積 (V_1) は、測定された。24 時間後、動物は、7 日間毎日一度、ビヒクル [0.5% のカルボキシメチルセルロース (CMC)] 又はクロファジミン (0.5% CMC 懸濁液中 50mg/kg) で経口で処置された。その結果は、図 7 に示される。 30

【実施例 8】

【0085】

人間の結腸直腸の癌細胞に対する生体外試験

さらに、生体外、クロファジミンと、結腸直腸細胞系統 C-170、HT-29 及び L0V0 の処置は、[3H]チミジン取り込みによって測定されるようなこれらの細胞の増殖の深い抑制へ結びつくことを、私たちは初めて示した (図 8 参照)。他の結腸直腸の癌細胞 (HT-29 及び C-170) も、L0V0 と類似の方法で生体外で抑制され、5 日の処置期間以上、 $1\mu\text{M}$ の濃度のクロファジミンがこれらの 2 つの細胞系統で細胞増殖の $> 70\%$ の抑制を同様に実現した。 40

【0086】

これらの結果は、リピオドールに溶解されたクロファジンで処置されたネズミは、リピオドール又は食塩水で処置された動物より本質的に小さな腫瘍を有していることを示す。これは、上述された生体外の、クロファジミン - リピオドールは、恐らく最初に取り上げられ、また、癌細胞に保持され、そして、次に、放出され、腫瘍の成長の抑制に結びつく腫瘍近辺の薬理的に有効な濃度を実現するという結果に一致しているものである。さらに、ノビコフ (novikoff) 細胞の生体内の増殖を抑制する能力は、ノビコフ (novikoff) は、一般に抵抗する細胞系統であり、また、生体外の研究でクロファジミンに最も敏感でない細胞系統であった点で、全く興味深い (表 1 参照)。

【0087】

これらの結果に基づいて、それは、特別の肝臓癌で、腫瘍を持った患者で、リピオドールで溶解され、また、領域に処置されるクロファジミンは、薬の高い領域の濃度を引き起こし、また、効能に結びつく癌細胞によって取り上げられる、一方、同時に、薬の高濃度の不適当な接触に身体に残りを使わないと考えられる。

【0088】

広く記載されるような発明の思考又は範囲から外れずに、特定の実施形態で示されるような発明に多数の変更及び／又は修正がなされてもよいことは当業者によって認識される。したがって、本発明の実施形態は、図として全ての点で考慮され、かつ、限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】3[H]チミジン取り込みによって測定され、分当たりのカウント(CPM)として測定される人の肝臓癌細胞系列HepG2の細胞増殖である。細胞は、クロファジミン(CF、0-5 μM)の異なる濃度で、5日間、培養液で処置された。値は、分当たりのカウント(CPM)の平均値±s.e.m.を表わし、処置期間の最後に各々のウェル中に存在する細胞の数によく正比例する。

【図2】6ウェルプレートに蒔かれたHepG2細胞は、1、3又は7日間、クロファジミン(0-5 mM)で処置され、残っている生存できる細胞は、トリパンブルー染料方法を使用してカウントされた。全てのカウントは、4部作製して得られた。値は、平均値±標準誤差を表わす。

【図3】ネズミ肝臓癌細胞(ノビコフ(novikoff))は、試験管で成長され、クロファジミン(0-10 mM)の異なる濃度で1、3又は7日間処置された。処置期間の最後に、残っている生存できる細胞は、トリパンブルー方法を使用してカウントされた。全てのカウントは、3部作製して得られ、また、値は、平均値±標準誤差を表わす。

【図4】人の肝臓癌細胞系列HepG2でクロファジミンによる細胞増殖の抑制である。24ウェルプレート中に蒔かれた細胞は、クロファジン(CF、5 μM)、リピオドール(L、100 μl)又はクロファジン-リピオドール(CF/L)で1日間、培養液で処置され、徹底的に洗浄された。その後、細胞は、余分に9日間、培地のみ(薬又はリピオドールは添加せず)で培養された。細胞増殖は、3[H]チミジン取り込み分析によって測定され、また、結果(平均値±s.e.m.)は、分当たりのカウント(CPM)として表現される。

【図5】ネズミ(男性のS.D.)は、 2×10^6 ネズミ肝臓癌細胞を有する肝臓で接種された。7日後に、別のラプロトミイ(laprotomy)は実行され、また、腫瘍体積(V1)を測定した後、カテーテルは、肝臓の動脈に配置されたけれども、100 μlの無菌標準食塩水、リピオドール又はクロファジミン(100 μlのリピオドールに溶解された0.4 mg)は、ゆっくり注入された。7日後に、動物は安楽死させられ、また、腫瘍体積(V2)は測定された。

【図6】クロファジミン(100 μlのリピオドール中0.4 mg)の一回の肝臓内への主要な服用量で処置された動物からのプラズマサンプルは、合計ビリルビンのために分析された。血液は、心臓の穿刺を通して収集され、また、7日間、動物安楽死にちょうど先立った薬物療法を提供された。

【図7】ネズミ(男性のS.D.)は、 2×10^6 ネズミ肝臓癌細胞を有する肝臓で接種された。7日後に、別のラプロトミイ(laprotomy)は実行され、また、腫瘍体積(V1)は測定された。24時間後、動物は、7日間毎日一度、ビヒクル[0.5%のカルボキシメチルセルロース(CMC)]又はクロファジミン(0.5%CMC懸濁液中50 mg/kg)で経口で処置された。

【図8】[3H]チミジン取り込みは、クロファジミンの異なる濃度で5日間培養液で処置された、LOVO細胞(colorectalな癌細胞系列)の分当たりのカウントとして表現された。

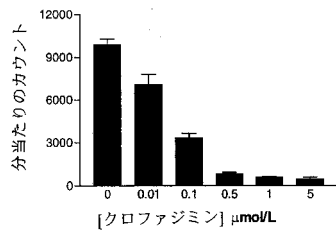
10

20

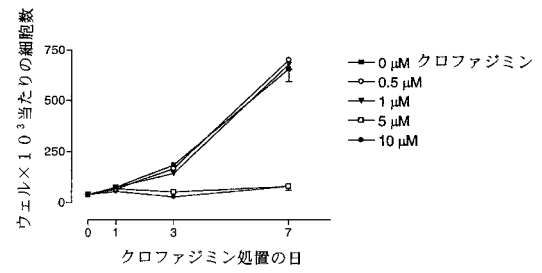
30

40

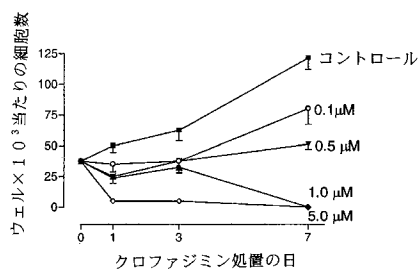
【図 1】



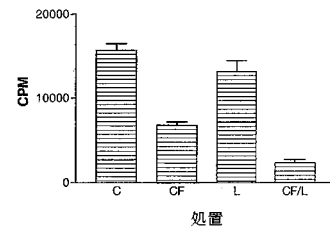
【図 3】



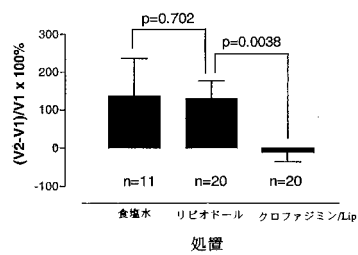
【図 2】



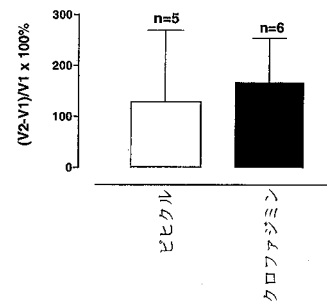
【図 4】



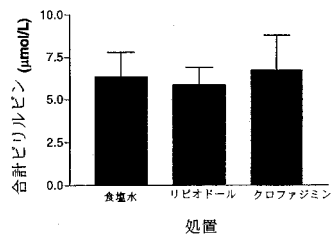
【図 5】



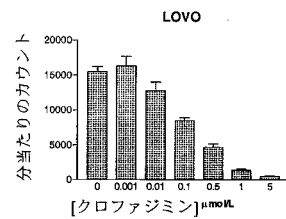
【図 7】



【図 6】



【図 8】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/007957 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 31/498, 47/44, A61P 35/04
- (21) International Application Number: PCT/AU02/00954
- (22) International Filing Date: 16 July 2002 (16.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: PR 6443 17 July 2001 (17.07.2001) AU
- (71) Applicant (for all designated States except US): **UNISEARCH LIMITED** [AU/AU]; Rupert Myers Building, Barker Street, University of New South Wales, Sydney, New South Wales 2052 (AU).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **MORRIS, David, Lawson** [AU/AU]; 950 Forest Road, Lagarno, New South Wales 2217 (AU); **POURGHOLAMI, Mohammad, Hossein** [AU/AU]; 16/276 Bunnacrong Road, Hillside, New South Wales 2136 (AU).
- (74) Agent: **BLAKE DAWSON WALDRON PATENT SERVICES**; 39th Floor, 101 Collins Street, Melbourne, Victoria 3000 (AU).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AE, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/007957 A1

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR TREATMENT OF CANCER

(57) Abstract: The present invention provides a method of treatment of tumours. The method comprises regional delivery to the site of the tumour a composition comprising a therapeutically effective amount of a riminophenazine compound. The present invention also provides composition comprising riminophenazine compounds in combination with lipids.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

METHOD AND COMPOSITION FOR TREATMENT OF CANCER

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to a method for the treatment of cancer and in particular, with a method for the treatment of liver cancer. The present invention further relates to compositions for use in such treatment.

BACKGROUND OF THE INVENTION

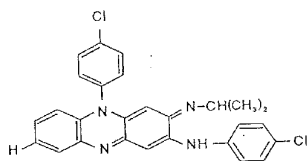
10 Hepatocellular cancer (HCC) is one of the most lethal malignancies and ranks world wide as the seventh most common cancer. There is considerable variation in its incidence with it being the most common in Asian countries. Due to an insidious onset, the majority of the HCCs are unresectable at diagnosis. Current
15 chemotherapeutic agents used systemically in the treatment of HCCs have not been very successful (1-5). In recent years advantages for regional delivery of drugs in HCC has been described. This route of administration, while, sparing the rest of the body from toxic effects, allows for the achievement of higher concentrations of the drug directly at the tumor site. Furthermore, delivery of the drug in an oil such as
20 lipiodol, which is highly taken up and retained for long periods of time by liver tumors, would further increase the selectivity of this route of administration (6-8). This way, by achieving high local hepatic levels, hepatic tumors sensitive to clofazimine or its analogues could be treated. However, the drug in question must be extremely soluble in oil such as lipiodol to allow for proper delivery, and later,
25 sustained release of the drug from the lipid with in the tumor.

 Clofazimine is a riminophenazine compound, with a molecular weight of 473.14 and a characteristic deep red to orange color nature under normal conditions due to its complex heterocyclic structure (9). It emerged as the most active antimycobacterial agent of a class of compound, the riminophenazine, synthesized by
30 the laboratories of the Medical Research council of Ireland from 1944, as part of a project to find a treatment for tuberculosis. Several hundred derivatives of clofazimine have been synthesized and tested in the laboratory for potential therapeutic uses.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

2



Structure of clofazimine: $[C_{27}H_{22}Cl_2N_2]$; 3-(4-chloroanilino)-10-(4-chlorophenyl)-2,10-dihydro-2-(isopropylimino)-phenazine]

5 Clofazimine has been used in the treatment of mycobacterial diseases since 1962. It is clinically effective and safe in the management of a number of diseases and is mainly employed in combination with dapsone and rifampin in the treatment of multibacillary leprosy. Currently the major use of clofazimine is in the World Health Organization multiple drug therapy for lepromatous leprosy. Clofazimine is generally
10 considered to be a safe drug. Nevertheless, there are some drawbacks and side effects associated with its use. The side effects are normally mild, dose related and reversible. The most common side effect seen is a red brown discoloration of the skin, which is visible in all patients on high doses. Certain cultures, particularly some Asian races, find the associated coloration stigmatizing and unacceptable, and this is the major
15 cause of noncompliance in treatment regimes (9-12).

The antimicrobial effects of clofazimine or its analogues have been the subject of numerous scientific publications and patents.

Recently two groups of investigators have reported using oral clofazimine in the treatment of HCC. Ruff et al. (13) reported that, 10% (3/30) of their patients (HCC)
20 under treatment with clofazimine, had objective response, while, 43% (13/30) had stabilization of the disease for up to 20 months. In a following study, Falkson et al. (14) reported no objective response in any of their patients under treatment for HCC with clofazimine alone.

Van Rensburg et al. has reported the activity of clofazimine against FaDu, a
25 human squamous cell carcinoma, PLC/PRF 5 a human HCC cell line in vitro and chemically induced sarcomas of mice and the mammary tumors of rats in vivo (15, 16).

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

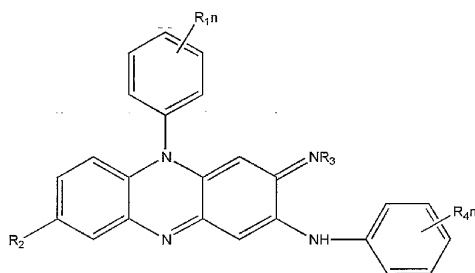
3

Similarly, Sri-Pathmanathan, has shown dofazimine to be active against human lung cancer cells under both *in vitro* and *in vivo* (nude mice xenografts) conditions (17). More recently US Patent No. 5,763,443 (the disclosure of which is incorporated herein by reference) has suggested multi drug resistance (MDR) activity for riminophenazines.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors have shown dofazimine is a potent inhibitor of the proliferation of a range of liver and colorectal cancer cell lines.

Accordingly, in a first aspect, the present invention provides a method for the treatment of a tumour in a subject, the method comprising regional delivery to the site of the tumour a composition comprising a therapeutically effective amount of a compound of Formula I:



in which R_1 and R_4 are selected from the group consisting of hydrogen atoms, halogen atoms, $C_1 - C_3$ alkyl radicals, $C_1 - C_3$ alkoxy radicals, fluoromethoxy and trifluoromethyl radicals, R_2 is selected from the group consisting of hydrogen and halogen atoms, R_3 is selected from the group consisting of hydrogen atoms, $C_1 - C_4$ alkyl, N,N -dialkylaminoalkyl, $C_3 - C_{12}$ cycloalkyl, methylcyclohexyl, hydroxycyclohexyl, cycloalkylmethyl, piperidyl, alkyl substituted piperidyl and N -benzyl substituted piperidyl, and n is a number from 1 to 3 inclusive; or an analogue or metabolite thereof.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

4

DESCRIPTION OF FIGURES

- Figure 1:** Cell proliferation in human hepatoma cell line HepG2 as measured by ^3H thymidine incorporation and expressed as counts per minute (CPM). Cells were treated in culture for 5 days with different concentrations of clofazimine (CF, 0-5 μM). Values represent mean \pm s.e.m. of counts per minute (CPM) which is directly proportional to the number of viable cells present in each well at the end of the treatment period.
- Figure 2:** HepG2 cells plated in 6 well plates were treated with clofazimine (0-5 mM) for 1, 3, or 7 days and viable cells remaining were counted using Trypan blue dye method. All counts were obtained in quadruplicate. Values represent mean \pm standard error.
- Figure 3:** Rat hepatoma cells, novikoff, were grown in test tubes and treated for 1, 3 or 7 days with different concentrations of clofazimine (0-10 mM). At the end of treatment period, the number of viable cells remaining was counted using the Trypan Blue method. All counts were obtained in triplicate and the values represent mean \pm standard error.
- Figure 4:** Inhibition of cell proliferation by clofazimine in human hepatoma cell line HepG2. Cells plated in 24 well plates, were treated in culture for 1 day with clofazimine (CF, 5 μM), lipiodol (L, 100 μl), or clofazimine-lipiodol (CF/L) and thoroughly washed. Cells were then incubated with medium alone (no drug or lipiodol added) for an extra 9 days. Cell proliferation was measured by ^3H thymidine incorporation assay and results (mean \pm s.e.m.) are expressed as counts per minute (CPM).
- Figure 5:** Rats (male S.D.) were inoculated in the liver with 2×10^6 rat liver tumor cells. 7 days later, another laprotomy was performed and after measuring tumor volume (V1), through a catheter placed into the hepatic artery 100 μl of sterile normal saline, lipiodol or clofazimine (0.4 mg dissolved in 100 μl of lipiodol) was slowly infused. 7 days later, animals were euthansed, and tumor volume (V2) measured.
- Figure 6:** Plasma samples from animals treated with a single intrahepatic arterial dose of clofazimine (0.4 mg in 100 μl of lipiodol) were analyzed for total bilirubin.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

5

Blood was collected through cardiac puncture, 7 days post drug treatment just prior to animal euthanasia.

Figure 7: Rats (male S.D.) were inoculated in the liver with 2×10^6 rat liver tumor cells. 7 days later, another laprotomy was performed and the tumor volume (V1), measured. 24 hours later, animals were treated orally with either the vehicle [0.5% carboxymethyl cellulose (CMC)] or clofazimine (50 mg/kg in 0.5 %CMC suspension) once daily for 7 days. At the end of this period and 24 hours after the last dose, animals were euthanased, and tumor volume (V2) measured.

10

Figure 8: [^3H]thymidine incorporation expressed as counts per minute in LOVO cells (colorectal cancer cell line) treated in culture for 5 days with different concentrations of clofazimine.

WO 03/007957

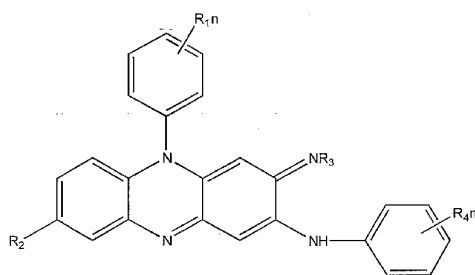
PCT/AU02/00954

6

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present inventors have shown that regional administration of the riminophenazine compound to the liver provides a number of advantages in the treatment of liver tumours. The present inventors also believe that this benefit may also be obtained through regional delivery of the riminophenazine compound to tumours of other cancers such as colorectal cancer, lung cancer, breast cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, gastric cancer, ovarian cancer, mesothelioma, renal cancer and liposarcoma.

Accordingly, in a first aspect the present invention consists in a method of treatment of a tumour in a subject, the method comprising regional delivery to the site of the tumour a composition comprising a therapeutically effective amount of a compound of Formula I:



in which R_1 and R_4 are selected from the group consisting of hydrogen atoms, halogen atoms, $C_1 - C_3$ alkyl radicals, $C_1 - C_3$ alkoxy radicals, fluoromethoxy and trifluoromethyl radicals, R_2 is selected from the group consisting of hydrogen and halogen atoms, R_3 is selected from the group consisting of hydrogen atoms, $C_1 - C_4$ alkyl, N,N -dialkylaminoalkyl, $C_3 - C_{12}$ cycloalkyl, methylcyclohexyl, hydroxycyclohexyl, cycloalkylmethyl, piperidyl, alkyl substituted piperidyl and N -benzyl substituted piperidyl, and n is a number from 1 to 3 inclusive; or an analogue or metabolite thereof.

Preferably R_1 substitution occurs in the 1 position and is preferably Cl.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

7

It is preferred that $n=1$, R_1 is Cl, R_2 is H, R_3 is $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ and R_4 is Cl.

It is particularly preferred that riminophenazine compound is clofazimine.

The method of the present is particularly suitable for the treatment of tumor of the liver. The tumor may be a hepatoma (primary liver cancer) or a secondary cancer
5 in the liver. Preferably regional delivery to the liver is via the hepatic artery.

The method of the present invention may also be used to treat other cancers, for example, colorectal cancer, lung cancer, breast cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, renal cancer or secondary metastases in other organs.

Regional delivery of the riminophenazine compound may be achieved by administering the compound in a pharmaceutically acceptable formulation. The
10 composition may be administered as continuous infusion of a solution via a pump through the major artery of the diseased organ for example hepatic artery for hepatomas. Furthermore, the composition may be administered intraperitoneally as a suspension to treat peritoneal disease arising from ovarian, pancreatic, gastric, or any
15 other cancer.

The formulation preferably comprises a lipid. Particularly preferred are lipids for which the tumor is avid so that high concentrations of the drug may be delivered to the tumor.

It is preferred that the lipid is an oil, preferably an oil which can be imaged by
20 an external means e.g. CT or MRI or PET. It is preferred that the oil is an iodised oil, in particular lipiodol, an iodinated ethyl ester of the poppy seed oil. In another preferred embodiment the oil is an ethyl ester of linoleic acid which may be iodinated.

While it is presently preferred that the oil is lipiodol it will be understood any oil meeting the following criteria would be suitable for regional delivery of the
25 compound:

- 1) compatible with blood, and
- 2) suitable solvent for clofazimine or other nominated riminophenazines

It is also preferred that oil allows external monitoring of the depot. As such the oil may bear a component, chemical group or substituent which enables detection by
30 any external means e.g. CT, MRI, PET.

Non-limiting examples of oils which may be used include soybean oil (see Tibell et al, Transpl Int 1993 6:69-72), cotton seed oil, safflower oil, fatty acid monoglyceride, medium chain triglyceride and edible oils such as olive oil, peanut oil, walnut oil, cod liver oil etc. A range chromatographically purified oils are available from Larodan
35 Fine Chemicals AB (www.larodan.se).

As is well known all such oils (like Lipiodol) have to be used with a surfactant to be safe when injected into the circulation (see the patent of Guerbet, GB1081551).

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

8

Non-limiting examples of other lipids which may be used include nitroxyl fatty acid, NFA for use in MRI (see Gallez et al, Magn Reson Med 1993 30:592-599), polyiodinated triglycerides for CT (see Weichert et al, J Med Chem 1995 38:636-646) and polyiodinated triacylglycerols for CT (see Weichert et al, J Med Chem 1986 29:2457-65).

5 Compared to systemic administration, regional delivery using a lipid such as lipiodol allows achievement of higher drug concentrations in the tumour site while reducing the degree of exposure of other body organs to the unwanted effects of the drug and consequently reducing the number and the severity of side effects. In HCC
10 this can be made even more selective and effective by choosing lipiodol as the vehicle for the drug delivery.

When injected into the hepatic artery, the oil is retained by HCCs for several weeks to over a year but is cleared from the normal liver parenchyma within 7 days. Without wishing to restrict the present invention in any way, one of the hypotheses in
15 attempting to explain lipiodol retention in HCCs suggests that these cells are unable to clear lipiodol because they lack a reticuloendothelial kupffer cell component. The present inventors have previously shown that *in vitro*, vitamin D compounds such as 1, 25-dihydroxyvitamin D3 dissolved in lipiodol produce a profound and sustained inhibitory effect on HepG2 cells and when injected through the hepatic artery of
20 tumour bearing rats, the drug is retained within the tumour (See International Patent Application Nos. PCT/AU98/00440 and PCT/AU99/00323 the disclosure of which is incorporated herein by reference).

On the basis of the present inventors experience with clofazimine, lipiodol, and hepatoma cell lines, they believe that administration of clofazimine, dissolved in an oil
25 such as lipiodol and administered through the hepatic artery, will lead to the sustained release of the drug from the oil within the tumour cells leading to sustained inhibition of proliferation of the tumour cells.

These unique characteristics of lipiodol coupled with the potency and lipid solubility of clofazimine, makes the combination an attractive formulation for
30 intrahepatic arterial administration in patients with HCC.

Determining the therapeutically effective amount of the riminophenazine compound can be done based on animal data using routine computational methods. Typically, the concentration of the riminophenazine compound will be at least about 0.1µM and generally in the range of about 0.1 to about 10µM

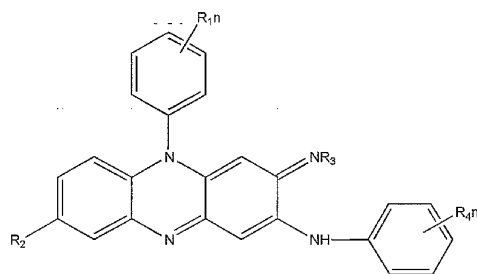
35 Clofazimine is a very lipid soluble compound with a log p value of 7.4 [(octanol/water) 9].

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

9

In a second aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition for use in the treatment of a tumour in a subject, the composition comprising a lipid carrier and a compound of Formula I at a concentration of at least 0.1 μ M:



10 in which R_1 and R_4 are selected from the group consisting of hydrogen atoms, halogen atoms, $C_1 - C_3$ alkyl radicals, $C_1 - C_3$ alkoxy radicals, fluoromethoxy and trifluoromethyl radicals, R_2 is selected from the group consisting of hydrogen and halogen atoms, R_3 is selected from the group consisting of hydrogen atoms, $C_1 - C_4$ alkyl, N,N -dialkylaminoalkyl, $C_3 - C_{12}$ cycloalkyl, methylcyclohexyl, hydroxycyclohexyl, cycloalkylmethyl, piperidyl, alkyl substituted piperidyl and N -benzyl substituted piperidyl, and n is a number from 1 to 3 inclusive;

15 or an analogue or metabolite thereof.

Preferably R_1 substitution occurs in the 1 position and is preferably Cl.

It is preferred that $n=1$, R_1 is Cl, R_2 is H, R_3 is $CH(CH_3)_2$ and R_4 is Cl.

It is particularly preferred that riminophenazine compound is clofazimine.

20 It is preferred the lipid carrier is a lipid for which the tumor is avid so that high concentrations of the drug may be delivered to the tumor.

It is preferred that the lipid is an oil, preferably an oil which can be imaged by an external means e.g. CT or MRI or PET. It is preferred that the oil is an iodised oil, in particular lipiodol, an iodinated ethyl ester of the poppy seed oil.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

10

While it is presently preferred that the oil is lipiodol it will be understood any oil meeting the following criteria would be suitable for regional delivery of the compound:

1) compatible with blood, and

5 2) suitable solvent for clofazimine or other nominated riminophenazines

It is also preferred that oil allows external monitoring of the depot. As such the oil may bear a component, chemical group or substituent which enables detection by any external means e.g. CT, MRI, PET.

Non-limiting examples of oils which may used include soybean oil (see Tibell et al, Transpl Int 1993 6:69-72), fatty acid monoglyceride, medium chain tryglyceride and edible oils such as olive oil, peanut oil, walnut oil, cod liver oil etc

As is well known all such oils (like Lipiodol) have to be used with a surfactant to be safe when injected into the circulation (see the patent of Guerbet, GB1081551).

Non-limiting examples of other lipids which may be used include nitroxyl fatty acid, NFA for use in MRI (see Gallez et al, Magn Reson Med 1993 30:592-599), polyiodinated triglycerides for CT (see Weichert et al, J Med Chem 1995 38:636-646) and polyiodinated triacylglycerols for CT (see Weichert et al, J Med Chem 1986 29:2457-65).

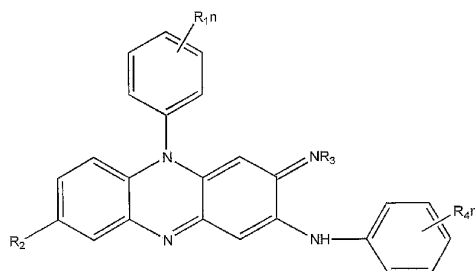
Preferably the riminophenazine compound is present in the composition in a concentration of at least about 0.5 μM . The upper limit on the concentration of riminophenazine compound is determined by the solubility of the compound. It is preferred, however, that the concentration of the riminophenazine compound is in the range of about 0.1 to about 10 μM .

In a further aspect the present invention consists in the use of a compound of Formula I:

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

11



Formula I

in which R_1 and R_4 are selected from the group consisting of hydrogen atoms, halogen
 5 atoms, $C_1 - C_3$ alkyl radicals, $C_1 - C_3$ alkoxy radicals, fluoromethoxy and
 trifluoromethyl radicals, R_2 is selected from the group consisting of hydrogen and
 halogen atoms, R_3 is selected from the group consisting of hydrogen atoms, $C_1 - C_4$
 alkyl, N,N -dialkylaminoalkyl, $C_3 - C_{12}$ cycloalkyl, methylcyclohexyl,
 hydroxycyclohexyl, cycloalkylmethyl, piperidyl, alkyl substituted piperidyl and N -
 10 benzyl substituted piperidyl, and n is a number from 1 to 3 inclusive; or an analogue
 or metabolite thereof; in the preparation of a medicament for the treatment of tumours
 in a subject, the medicament being adapted adapted for regional delivery to the site of
 the tumour.

Preferably R_1 substitution occurs in the 1 position and is preferably Cl.

15 It is preferred that $n=1$, R_1 is Cl, R_2 is H, R_3 is $CH(CH_3)_2$ and R_4 is Cl.

It is particularly preferred that ruminophenazine compound is dofazimine.

The medicament is particularly suitable for the treatment of tumor of the liver.

The tumor may be a hepatoma (primary liver cancer) or a secondary cancer in the
 liver. Preferably regional delivery to the liver is via the hepatic artery.

20 The medicament may also be used to treat other cancers, for example, colorectal
 cancer, lung cancer, breast cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, renal cancer or
 secondary metastases in other organs.

The medicament preferably further comprises a lipid. Particularly preferred
 are lipids for which the tumor is avid so that high concentrations of the drug may be
 25 delivered to the tumor.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

12

It is preferred that the lipid is an oil, preferably an oil which can be imaged by an external means e.g. CT or MRI or PET. It is preferred that the oil is an iodised oil, in particular lipiodol, an iodinated ethyl ester of the poppy seed oil.

- While it is presently preferred that the oil is lipiodol it will be understood any oil meeting the following criteria would be suitable for regional delivery of the compound and external monitoring of the depot:
- 1) compatible with blood
 - 2) suitable solvent for clofazimine or other nominated riminophenazines
 - 3) bearing a component, chemical group or substituent which enables detection by any external means e.g. CT, MRI, PET.

- Non-limiting examples of oils which may be used include soybean oil (see Tibell et al, Transpl Int 1993 6:69-72), cotton seed oil, safflower oil, fatty acid monoglyceride, medium chain triglyceride and edible oils such as olive oil, peanut oil, walnut oil, cod liver oil etc. A range chromatographically purified oils are available from Larodan Fine Chemicals AB (www.larodan.se).

As is well known all such oils (like Lipiodol) have to be used with a surfactant to be safe when injected into the circulation (see the patent of Guerbet, GB1081551).

- Non-limiting examples of other lipids which may be used include nitroxyl fatty acid, NFA for use in MRI (see Gallez et al, Magn Reson Med 1993 30:592-599), polyiodinated triglycerides for CT (see Weichert et al, J Med Chem 1995 38:636-646) and polyiodinated triacylglycerols for CT (see Weichert et al, J Med Chem 1986 29:2457-65).

- Compared to systemic administration, regional delivery using a lipid such as lipiodol allows achievement of higher drug concentrations in the tumour site while reducing the degree of exposure of other body organs to the unwanted effects of the drug and consequently reducing the number and the severity of side effects. In HCC this can be made even more selective and effective by choosing lipiodol as the vehicle for the drug delivery.

- As used herein the term "regional delivery", and variations such as "regionally delivering", means delivery either directly to the tumour, delivery to a vessel directly supplying the affected organ, such as the hepatic artery for liver cancer, or delivery to a body cavity proximal the tumour, such as intraperitoneally for pancreatic cancer.

- As used herein the term "individual" is used in its broadest sense and is intended to cover human and non-human animals

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

13

Throughout this specification the word "comprise", or variations such as "comprises" or "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated element, integer or step, or group of elements, integers or steps, but not the exclusion of any other element, integer or step, or group of elements, integers or steps.

5 All publications mentioned in the specification are herein incorporated by reference.

Any discussion of documents, acts, materials, devices, articles or the like which has been included in the present specification is solely for the purpose of providing a context for the present invention. It is not to be taken as an admission that any or all
10 of these matters form part of the prior art base or were common general knowledge in the field relevant to the present invention as it existed in Australia before the priority date of each claim of this application.

In order that the nature of the present invention may be more fully understood
15 the invention will now be described with reference to the following non-limiting embodiments.

EXAMPLE 1

20 *In vitro* tests against liver cancer cells

Method: [³H]Thymidine incorporation assay was employed to study the effect of clofazimine on cell proliferation. Here, adherent cells (5/000-10/000) were plated into 24-well Corning tissue culture dishes and exposed to culture medium (MEM 5% FBS) containing the vehicle or different concentrations of clofazimine (10⁻⁹ to 10⁻⁵ moles per
25 liter). For Novikoff which is a detached rat cell line, 2000 cells were suspended in 2 ml of DMEM (5%FBS) and kept under the same condition as for attached cells. Media were replaced with fresh media on alternate days. At the end of the treatment period (5-10 days), cell cultures were assayed for thymidine incorporation by the addition of 0.5μ Ci of [³H]thymidine to each well for the last 4 h of culture. The amount of
30 radioactivity incorporated was determined using a β-scintillation counter (18). Results are presented as the actual counts per minute against the concentration of the drug used in the culture media or as % inhibition (reduction in thymidine incorporation compared to controls). Treatment of different liver cancer cell lines, HUH-7, HepG2, SKHEP-1, Hep3-B (human cell lines) and Novikoff (rat cell line) with clofazimine led
35 to dose-dependent inhibition of [³H]thymidine incorporation by these cells (Table 1 and Fig. 1).

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

14

Table 1: Effect of clofazimine on the proliferation ([3H]thymidine incorporation) of liver cancer cell lines *in vitro*.

Cell line	[Clofazimine μM]				
	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0
HUH-7	0	38.3 \pm 7.2	51.1 \pm 3.4	88.9 \pm 1.1	96.7 \pm 0.9
HepG2	21.0 \pm 1.9	38.2 \pm 2.2	52.9 \pm 4.7	75.6 \pm 2.7	92.4 \pm 1.9
SKHEP-1	30.3 \pm 2.9	62.7 \pm 7.1	69.0 \pm 3.2	70.9 \pm 2.1	97.1 \pm 1.7
Hep3- β	28.4 \pm 7.4	62.3 \pm 3.1	91.6 \pm 1.1	94.3 \pm 0.07	95.4 \pm 1.4
Novikoff	0	0	11.7 \pm 3.3	18.9 \pm 2.9	42.7 \pm 4.1

5

Values represent mean \pm s.e.m of % inhibition of [3H] thymidine incorporation (compared to control) for each cell line when treated for 5 days with different concentrations of clofazimine.

These results show that, the human cell lines are quite susceptible to the antiproliferative effects of clofazimine while, the rat cell line Novikoff which generally is a very resistant cell line to chemotherapy and radiotherapy (19) shows modest susceptibility at higher drug concentrations. Amongst the human liver cancer cell lines tested, Hep3- β exhibited the highest degree of susceptibility to the antiproliferative effects of clofazimine (Figure 1).

15

EXAMPLE 2

In vitro test against HepG2 cells

HepG2 cells plated in 6 well plates were treated with clofazimine (0-5 μM) for 1, 3, or 7 days and viable cells remaining were counted using Trypan blue dye method. All counts were obtained in quadruplicate. The results are shown in Figure 2 where the values represent mean \pm standard error.

EXAMPLE 3

25

In vitro test against rat hepatoma cells, novikoff

Rat hepatoma cells, novikoff, were grown in test tubes and treated for 1, 3 or 7 days with different concentrations of clofazimine (0-10 μM). At the end of treatment

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

15

period, the number of viable cells remaining was counted using the Trypan Blue method. All counts were obtained in triplicate and the values represent mean \pm standard error. The results are shown in Figure 3.

5 EXAMPLE 4

In vitro test against liver cancer cells using lipiodol

It has been shown that, certain oils and lipiodol in particular are taken up and retained by liver cancer cells. In this respect we have shown that:

- 10 • under cell culture conditions, lipiodol is highly taken up by liver cancer cells (18)
- in rats bearing liver tumors, lipiodol is taken up and retained with in the tumor (19)
- in patients with liver tumors, administration of large doses of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dissolved in lipiodol and infused through the hepatic
- 15 artery, does not lead to the development of hypercalcemia
- clofazimine is highly soluble and stable in lipiodol

To investigate if clofazimine dissolved in lipiodol is taken up and released gradually with in the cell to produce a sustained antiproliferative effect, the following experiment was carried out.

Subconfluent HepG2 cells were plated in 24 well tissue culture plates at 10/000 cells per well and incubated for 24 h in an incubator at 37 °C with humidified 5% CO₂ atmosphere. The medium was then replaced with one containing a 5 μ M concentration of clofazimine prepared in either MEM or MEM plus lipiodol (0.5% v/v). To do this, clofazimine dissolved in ethanol, was placed in the test tube, the ethanol evaporated under a stream of nitrogen gas, and the drug recovered by the addition of lipiodol and finally reconstituted in medium to give the desired concentrations of the drug and lipiodol. Two groups of control cells were treated either with clofazimine made up in the medium (no lipiodol) or with lipiodol

25 containing medium (no drug). 24 hours later, for all cells, the medium was replaced with normal medium containing neither drug nor lipiodol. From here onwards, media was replaced on alternate days, for the following 9 days. At the end of the treatment period, cells were assayed for thymidine incorporation (as described above).

Results obtained (Figure 4) reveal that, brief treatment of HepG2 cells with

35 clofazimine dissolved in lipiodol and diluted in cell culture media (0.5% V/V), results in sustained inhibition of proliferation of the cells, long after (9 days) the removal of

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

16

the drug from the cell culture media. This is probably due to the uptake of the oil by the cells followed by the sustained release of the drug from it with in the cell.

From these *in-vitro* results it may be assumed that, lipiodol taken up by the cells act as drug depots leading to the continuous exposure of the cells to clofazimine, long after the removal of the drug from the medium. Consequently, proliferation and hence [3H]thymidine incorporation is significantly ($p<0.01$) reduced in cells exposed to the clofazimine/lipiodol treatment.

EXAMPLE 5

10

In vivo tests in novikoff tumor bearing rats

To investigate whether clofazimine dissolved in lipiodol is active *in vivo*, the novikoff rat tumor model was employed. Here, the following procedure was carried out. Rats were given a general anesthetic (halothane gas) and a lapratomy performed. Then 2×10^6 novikoff cells suspended in 100 μ L of medium were instilled beneath the liver capsule using a 26G 3/8 tuberculin needle. The abdominal incision was closed with sutures. All procedures were carried out under general anesthesia and sterile conditions.

Seven days later, another lapratomy was performed and after measuring tumor volume (V1), through a catheter placed into the hepatic artery 100 μ L of sterile normal saline, lipiodol or clofazimine (0.4 mg dissolved in 100 μ L of lipiodol) was slowly infused. 7 days later, animals were euthansed, and tumor volume (V2) measured. The results are shown in Figure 5.

EXAMPLE 6

Bilirubin measurement

Plasma samples from animals treated with a single intrahepatic arterial dose of clofazimine (0.4 mg in 100 μ L of lipiodol) were analyzed for total bilirubin. Blood was collected through cardiac puncture, 7 days post drug treatment just prior to animal euthanasia. The results are shown in Figure 6.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

17

EXAMPLE 7

Oral administration of clofazimine

Rats (male S.D.) were inoculated in the liver with 2×10^6 rat liver tumor cells. 7 days later, another lapotomy was performed and the tumor volume (V1), measured. 24 hours later, animals were treated orally with either the vehicle [0.5% carboxymethyl cellulose (CMC)] or clofazimine (50 mg/kg in 0.5% CMC suspension) once daily for 7 days. At the end of this period and 24 hours after the last dose, animals were euthanased, and tumor volume (V2) measured. The results are shown in Figure 7.

10

EXAMPLE 8

In vitro tests against human colorectal cancer cells

We have also shown for the first time, that, *in vitro*, treatment of colorectal cell lines C-170, HT-29 and LOVO with clofazimine, leads to profound inhibition of proliferation of these cells as measured by [3H]thymidine incorporation (Fig. 8). Other colorectal cancer cells (HT-29 and C-170) were also suppressed *in vitro* in a similar manner to LOVO where, over a 5 day treatment period, 1 μ M concentrations of clofazimine produced > 70% inhibition of cell proliferation in these 2 cell lines as well.

20

These results show that, rats treated with clofazimine dissolved in lipiodol have substantially smaller tumors than lipiodol or saline treated animals. This is in agreement with the above described *in vitro* results showing that, clofazimine-lipiodol is probably originally taken up and stored in the tumor cells and then released to produce a pharmacologically effective concentration in the tumor vicinity leading to inhibition of tumor growth. Furthermore, the ability to inhibit *in vivo* proliferation of novikoff cells is quite interesting in that, novikoff is generally a resistant cell line and was the least sensitive cell line to clofazimine in the *in-vitro* studies (Table I).

30

Based on these results it is believed that, in patients with tumours, in particular liver cancer, clofazimine dissolved in lipiodol and administered regionally, will be taken up by tumor cells causing high local concentrations of the drug and leading to efficacy, while, at the same time, sparing rest of the body from undesirable exposure to high concentrations of the drug.

35

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

18

It will be appreciated by persons skilled in the art that numerous variations and/or modifications may be made to the invention as shown in the specific embodiments without departing from the spirit or scope of the invention as broadly described. The present embodiments are, therefore, to be considered in all respects as
5 illustrative and not restrictive.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

19

REFERENCES:

- 1 Okada, S. Chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 45: 1259-63, 1998.
- 2 Tang, Z. Y. Hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: (Suppl.) G1-7, 2000.
- 3 Akriviadis, E.A., Llovet, J.M., Efremidis, S.C. Hepatocellular carcinoma. *Br. J. Surg.* 85: 1319-31, 1998.
- 4 Mathurin, P., Rixe, D., Carbonell, N. et al. Review article: Overview of medical treatments in unresectable hepatocellular carcinoma – an impossible meta analysis? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12: 111-26, 1998.
- 5 Farmers, D. G., Rosove, M.H., Shaked, A. et al. Current treatment modalities for hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* 219: 236-47, 1994.
- 6 Bhattacharya, S., Dhillon A. P., Winslet M. C., et al. Human liver cancer cells and endothelial cells incorporate iodized oil. *Br. J. Cancer* 73: 877-881, 1996.
- 7 Nakakuma, K., Tashiro, S., Hiraoka, T., et al. Studies on anticancer treatment with an oily anticancer drug injected into the ligated feeding hepatic artery for liver cancer. *Cancer* 52: 2193-2200, 1983.
- 8 Chou, F. I., Fang, K.C., Chung, C., et al. Lipiodol uptake and retention by human hepatoma cells. *Nucl. Med. Biol.* 22: 379-386, 1995.
- 9 O'Conner, R., O'Sullivan, J. F., O'Kennedy, R. The pharmacology, metabolism and chemistry of clofazimine. *Drug Metab. Rev.* 27: 591-614, 1995.
- 10 Arbiser, J. J., Moschella, S. L. M. Clofazimine: A review of its medical uses and mechanisms of action. *J. A. Acad. Dermatol.* 32: 241-7, 1995.
- 11 Dallery, C. (ed.) Clofazimine. In "Therapeutic drugs" .pp C282-C286, Churchill-Livingstone, 1995.
- 12 Reddy, V. M., Nadadur, G., Daneluzzi, D., et al. Antituberculosis activities of clofazimine and its new analogs B4154 and B4157. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 633-636, 1996.
- 13 uff, P., Chasen, M. R., Long, J. E. H. et al. A phase II study of oral clofazimine in unresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *Ann. Oncol.* 9: 217-219, 1998.
- 14 Falkson, C. I., Falkson, G. A phase II evaluation of clofazimine plus doxorubicin in advanced, unresectable primary hepatocellular carcinoma. *Oncology* 57: 232-235, 1999.
- 15 Van Rensburg, C. E. J., Durandt, C., Garlinski, P. J. et al. Evaluation of the antineoplastic activities of the riminophenazine agents clofazimine and B669 in tumor-bearing rats and mice. *Int. J. Oncol.* 3: 1011-1013, 1993.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

20

- 16 Van Rensburg, C., E., J., Van Staden, A., M., Anderson, R. The riminophenazine agents clofazimine and B669, inhibit the proliferation of cancer cell lines in vitro by phospholipase A₂-mediated oxidative and non-oxidative mechanisms. *Cancer Res.* 53: 318-323, 1993.
- 5 17 Sri-Pathmanathan, R., M., Plumb, J., A., Fearon, K., C., H. Clofazimine alters the energy metabolism and inhibits the growth rate of human lung-cancer cell line in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 56: 900-905, 1994.
- 18 Labarca, C., Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102: 344-352, 1980.
- 10 19 Hafeli, U. O., Casillas, S., Dietz, D. W. et al. Hepatic tumor radioembolization in a rat model using radioactive rhenium (¹⁸⁶Re/¹⁸⁸Re) glass microspheres. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 44: 189-199, 1999.
- 20 Kurth, S., Bulian, D., Kreft, B. et al. Intraarterial hepatic chemotherapy with fluorouracil, fluorodeoxyuridine, motomycin C, cisplatin or methotrexate as single-agent anticancer drugs for transplanted experimental liver tumor in rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122: 421-426, 1996.
- 15 21 Pourgholami, M. H., Akhter, J., Finaly, I. G. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 dissolved in lipiodol produces a sustained antiproliferative effect in the human hepatoblastoma cell line HepG2. *Anticancer Res.* 20: 723-728, 2000.
- 20 22 Finlay, I. G., Stewart, G. J., Pourgholami, M. H. et al. The use of lipiodol and medium chain triglycerides as delivery agents for hepatic arterial administration of 1,25 dihydroxyvitamin D3-A potential new treatment for hepatoma. *Anticancer Res.* 20: 2705-2710, 2000.

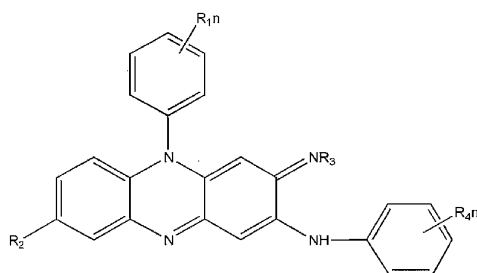
WO 03/007957

PCT/AU02/00954

21

CLAIMS

1. A method of treatment of a tumour in a subject, the method comprising regional delivery to the site of the tumour a composition comprising a therapeutically effective amount of a compound of Formula I:



Formula I

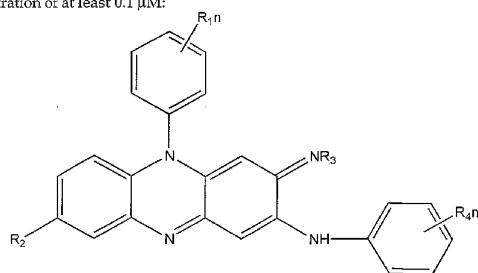
- 10 in which R_1 and R_4 are selected from the group consisting of hydrogen atoms, halogen atoms, $C_1 - C_3$ alkyl radicals, $C_1 - C_3$ alkoxy radicals, fluoromethoxy and trifluoromethyl radicals, R_2 is selected from the group consisting of hydrogen and halogen atoms, R_3 is selected from the group consisting of hydrogen atoms, $C_1 - C_4$ alkyl, N,N -dialkylaminoalkyl, $C_3 - C_{12}$ cycloalkyl, methylcyclohexyl,
- 15 hydroxycyclohexyl, cycloalkylmethyl, piperidyl, alkyl substituted piperidyl and N -benzyl substituted piperidyl, and n is a number from 1 to 3 inclusive; or an analogue or metabolite thereof.
2. A method according to claim 1 wherein the R_1 substitution occurs in the 1 position and is preferably Cl.
- 20 3. A method according to claim 1 or claim 2 wherein $n=1$, R_1 is Cl, R_2 is H, R_3 is $CH(CH_3)_2$ and R_4 is Cl.
4. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the rimonophenazine compound is clobazamine.
5. A method according to any one of claims 1 to 4 wherein the tumour is
- 25 hepatoma or a secondary cancer in the liver.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

22

6. A method according to any one of claims 1 to 5 wherein the regional delivery is via the hepatic artery.
7. A method according to any one of claims 1 to 4 wherein the tumour is selected from the group consisting of colorectal cancer, lung cancer, breast cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, renal cancer and secondary metastases in other organs.
8. A method according to any one of claims 1 to 7 wherein the composition is administered as continuous infusion of a solution via a pump through a major artery.
9. A method according to any one of claims 1 to 7 wherein the composition is administered intraperitoneally.
10. A method according to any one of claims 1 to 9 wherein the composition further comprises a lipid.
11. A method according to claim 10 wherein the lipid is a lipid for which the tumor is avid.
12. A method according to claim 10 or 11 the lipid is an oil, preferably an oil which can be imaged by an external means e.g. CT or MRI or PET.
13. A method as claimed in claim 11 wherein the oil is an iodised oil.
14. A method as claimed in claim 11 wherein the oil is lipiodol.
15. A method according to claim 10 wherein the lipid is selected from the group consisting of soybean oil, fatty acid monoglyceride, medium chain tryglyceride, olive oil, peanut oil, walnut oil, cod liver oil, nitroxyl fatty acid, ethyl linoleate, polyiodinated triglycerides and polyiodinated triacylglycerols.
16. A pharmaceutical composition for use in the treatment of a tumour in a subject, the composition comprising a lipid carrier and a compound of Formula I at a concentration of at least 0.1 μM :



Formula I

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

23

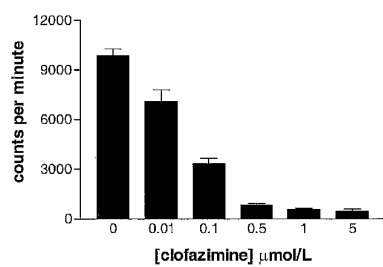
- in which R_1 and R_4 are selected from the group consisting of hydrogen atoms, halogen atoms, $C_1 - C_3$ alkyl radicals, $C_1 - C_3$ alkoxy radicals, fluoromethoxy and trifluoromethyl radicals, R_2 is selected from the group consisting of hydrogen and halogen atoms, R_3 is selected from the group consisting of hydrogen atoms, $C_1 - C_4$ alkyl, N,N-dialkylaminoalkyl, $C_3 - C_{12}$ cycloalkyl, methylcyclohexyl, hydroxycyclohexyl, cycloalkylmethyl, piperidyl, alkyl substituted piperidyl and N-benzyl substituted piperidyl, and n is a number from 1 to 3 inclusive; or an analogue or metabolite thereof.
17. A composition according to claim 16 wherein the R_1 substitution occurs in the 1 position and is preferably Cl.
 18. A composition according to claim 16 or 17 wherein $n=1$, R_1 is Cl, R_2 is H, R_3 is $CH(CH_3)_2$ and R_4 is Cl.
 19. A composition according to any one of claims 16 to 18 wherein the riminophenazine compound is clofazimine.
 20. A composition according to any one of claims 16 to 19 wherein the lipid carrier is a lipid for which the tumor is avid.
 21. A composition according to any one of claims 16 to 20 wherein the lipid is an oil.
 22. A composition according to claim 21 wherein the oil is an iodised oil.
 23. A composition according to claim 21 wherein the oil is lipiodol.
 24. A composition according to any one of claims 16 to 19 wherein the lipid is selected from the group consisting of soybean oil, fatty acid monoglyceride, medium chain triglyceride, olive oil, peanut oil, walnut oil, cod liver oil, nitroxyl fatty acid, ethyl linoleate, polyiodinated triglycerides and polyiodinated triacylglycerols.
 25. A composition according to any one of claims 16 to 24 wherein the riminophenazine compound is present in the composition in a concentration of at least about $0.5\mu M$.
 26. A composition according to any one of claims 16 to 25 wherein the concentration of the riminophenazine compound is in the range of about 0.1 to about $10\mu M$.

WO 03/007957

PCT/AU02/00954

1/8

Figure 1

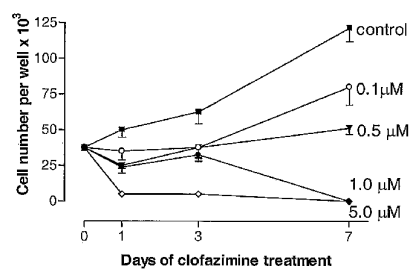


WO 03/007957

PCT/AU02/00954

2/8

Figure 2

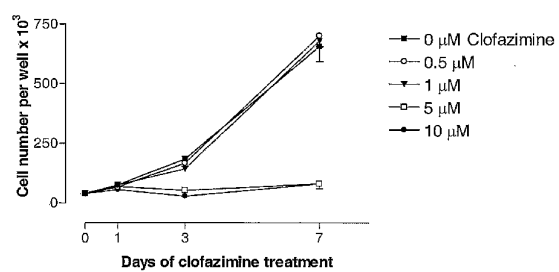


WO 03/007957

PCT/AU02/00954

3/8

Figure 3

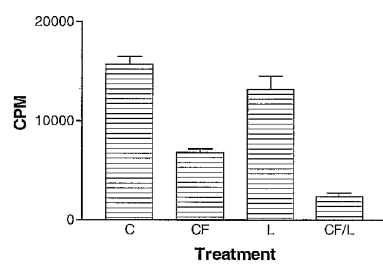


WO 03/007957

PCT/AU02/00954

4/8

Figure 4

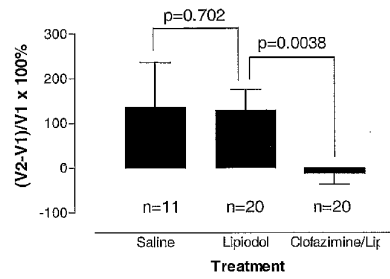


WO 03/007957

PCT/AU02/00954

5/8

Figure 5

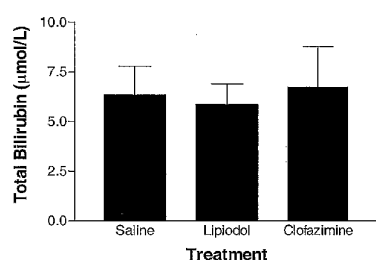


WO 03/007957

PCT/AU02/00954

6/8

Figure 6

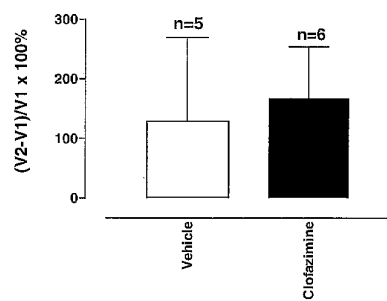


WO 03/007957

PCT/AU02/00954

7/8

Figure 7

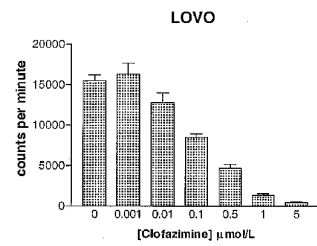


WO 03/007957

PCT/AU02/00954

8/8

Figure 8



【手続補正書】

【提出日】平成15年3月27日(2003.3.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

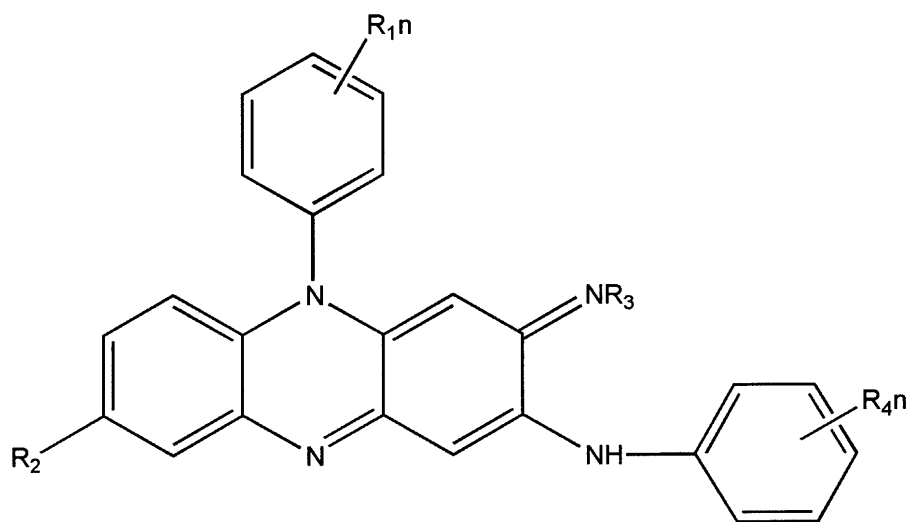
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍のサイトへ治療上の有効量の下記構造式Iの化合物、それらの類似物、又は、それらの代謝物を含有している組成物の領域送達からなる方法である、対象物の腫瘍の処置の方法：

【化1】



構造式I

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N, N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチル、ピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1以上3以下の数である。

【請求項2】

R_1 は、1の位置で有し、好ましくはClである請求項1記載の方法。

【請求項3】

$n = 1$ であり、 R_1 はClであり、 R_2 はHであり、 R_3 は $CH(CH_3)_2$ であり、かつ、 R_4 はClである請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

リミノフェナジン化合物は、クロファジミンである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

前記腫瘍は、肝臓癌又は肝臓中の二次癌である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記領域送達は、肝臓の動脈経由である請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記腫瘍は、他の器官中の結腸直腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌及び二次転移からなる群から選択される請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記組成物は、主動脈を通過してポンプ経由で溶液の連続的な輸液として投与される請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

。

【請求項 9】

前記組成物は、腹腔内に投与される請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記組成物は、さらに脂質を含有している請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記脂質は、腫瘍がどん欲であるための脂質である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記脂質は、油であり、

好ましくは油は、例えば、CT、MRI又はPETである外部手段によってイメージされる請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記油は、ヨード化油である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記油は、リピオドールである請求項 11 に記載の方法。

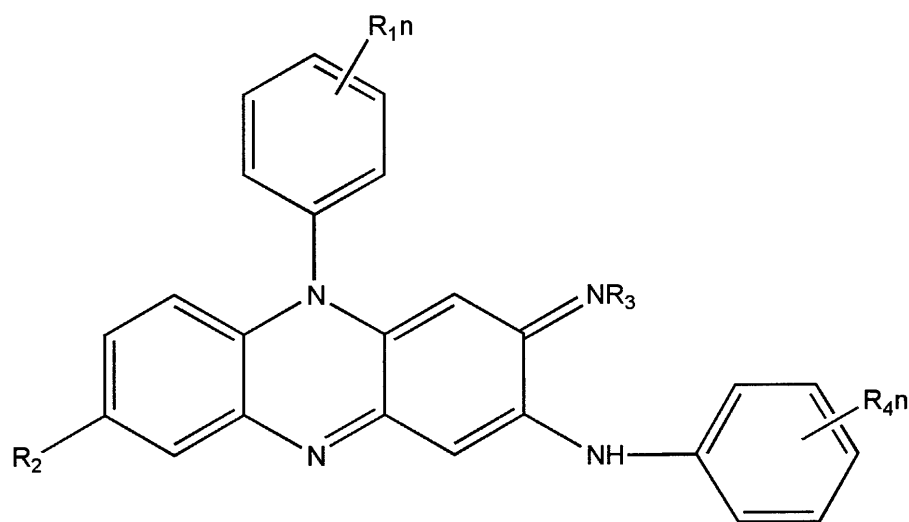
【請求項 15】

前記脂質は、大豆油、脂肪酸モノグリセリド、中鎖トリグリセライド、オリーブ油、落花生油、クルミ油、肝油、ニトロオキシル脂肪酸、エチルリノール酸塩、ポリヨード化トリグリセリド及びポリヨード化トリアシルグリセロールからなる群から選択される請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

脂質キャリアー、及び、少なくとも $0.1 \mu\text{M}$ の濃度の下記構造式 I の化合物を含有している組成物である、対象物の腫瘍の処置において、使用するための製薬組成物：

【化 2】



構造式 I

ここで、 R_1 及び R_4 は、水素原子、ハロゲン原子、 $C_1 - C_3$ のアルキル基、 $C_1 - C_3$ のアルコキシ基、フルオロメトキシ及びトリフルオロメチル基からなる群から選択され、 R_2 は、水素

及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素及びハロゲン原子からなる群から選択され、 R_3 は、水素原子、 $C_1 - C_4$ のアルキル、 N,N -ジアルキルアミノアルキル、 $C_3 - C_{12}$ のシクロアルキル、メチルシクロヘキシル、ヒドロキシシクロヘキシル、シクロアルキルメチルピペリジル、アルキル置換ピペリジル及び N -ベンジル置換ピペリジルからなる群から選択され、また、 n は、1以上3以下の数であり、
前記脂質キャリアーは、ヨード化油、大豆油、脂肪酸モノグリセリド、中鎖トリグリセライド、オリーブ油、落花生油、クルミ油、肝油、ニトロオキシル脂肪酸、エチルリノール酸塩、ポリヨード化トリグリセリド及びポリヨード化トリアシルグリセロールからなる群から選択される。

【請求項17】

R_1 は、1の位置で有し、好ましくはClである請求項16記載の組成物。

【請求項18】

$n = 1$ であり、 R_1 はClであり、 R_2 はHであり、 R_3 は $CH(CH_3)_2$ であり、かつ、 R_4 はClである請求項16又は17記載の組成物。

【請求項19】

リミノフェナジン化合物は、クロファジミンである請求項16～18のいずれかに記載の組成物。

【請求項20】

前記ヨード化油は、リピオドールである請求項16～19のいずれかに記載の組成物。

【請求項21】

リミノフェナジン化合物は、少なくとも約0.5 μM の濃度で組成物中に存在している請求項16～20のいずれかに記載の組成物。

【請求項22】

前記リミノフェナジン化合物の濃度は、約0.1 μM 以上10 μM 以下の範囲である請求項16～21のいずれかに記載の組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00954
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ² : A61K 31/498, 47/44; A61P 35/04		
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)		
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) DWPI and MEDLINE. Keywords: clofazimine, riminophenazine, tumour, liver, hepatoma, lipid, oil and related terms.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	RUFF, P. et al. A phase II study of oral clofazimine in unresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. Annals of Oncology, 1998, Vol. 9, pages 217-219 Whole document	1-9 10-15
X Y	VAN RENSBURG, C.E.J., et al. The Riminophenazine agents Clofazimine and B669 inhibit the proliferation of cancer cell lines in vitro by Phospholipase A2-mediated oxidative and non-oxidative mechanisms. Cancer Research, January 1993, Vol. 53, pages 318-323 Whole document	1-9 10-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 relating 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 24 September 2002		Date of mailing of the international search report: 4 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: ipo@paustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6245 3929		Authorized officer S. Chew Telephone No : (02) 6283 2248

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00954
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	VAN NIEKERK, E. et al. Tetramethylpiperidine-substituted phenazines inhibit the proliferation of intrinsically multidrug resistant carcinoma cell lines. Investigational New Drugs, 2001, Vol. 19, pages 211-217 Whole document	1-9 10-15
X Y	SRITHARAN, M. Studies on the tissues distribution of liposome-associated clofazimine, an antileprosy drug. Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., March 1993, Vol. 15(2) pages 107-111 Summary	16-26 10-15
X Y	PATEL V.B. et al. A topical dosage form of liposomal clofazimine: research and clinical implications. Pharmazie, June 1999, Vol. 54(6), pages 448-451 Abstract	16-26 10-15
X Y	HOLDINESS M.R. Clinical Pharmacokinetics of Clofazimine. A review. Clinical Pharmacokinetics, 1989, Vol. 16, pages 74-85 Summary	16-26 10-15
X	Derwent Abstract Accession No. 94-235028/28, Class B02, ZA 9208419 A (UNIV PRETORIA) 25 May 1994 Abstract	1-4, 7-9

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100122264

弁理士 内山 泉

(74)代理人 100125645

弁理士 是枝 洋介

(72)発明者 モリス , デビッド ローソン

オーストラリア 2 2 1 7 ニュー サウス ウェールズ ルガーノ フォレスト ロード 9 5
0

(72)発明者 パーゴラミ , ムハンマド ホセイン

オーストラリア 2 1 3 6 ニュー サウス ウェールズ ヒルズデール パナーロング ロード
1 6 / 2 7 6

Fターム(参考) 4C076 AA16 BB12 BB14 BB21 CC27 DD41 DD46 DD47 EE52 EE53

EE54 FF16

4C086 AA01 AA02 BC51 MA01 MA02 MA04 MA05 MA22 MA56 MA65

MA66 NA10 NA14 ZB26