

(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2004-530658

(P2004-530658A)

(43) 公表日 平成16年10月7日(2004.10.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07C 235/60	C O 7 C 235/60	4 C O 7 6
A61K 9/08	A 6 1 K 9/08	4 C O 8 4
A61K 9/20	A 6 1 K 9/20	4 H O O 6
A61K 9/48	A 6 1 K 9/48	
A61K 45/08	A 6 1 K 45/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-569115 (P2002-569115)	(71) 出願人	500139958 エミスフェア・テクノロジーズ・インク アメリカ合衆国・ニューヨーク・1059 1・タリータウン・オールド・ソー・ミル ・リバー・ロード・765
(86) (22) 出願日	平成14年3月1日 (2002.3.1)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月29日 (2003.8.29)	(74) 代理人	100108578 弁理士 高橋 詔男
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/006610	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W02002/069937	(74) 代理人	100101465 弁理士 青山 正和
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002.9.12)	(74) 代理人	100094400 弁理士 鈴木 三義
(31) 優先権主張番号	60/272, 726		
(32) 優先日	平成13年3月1日 (2001.3.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/314, 783		
(32) 優先日	平成13年8月24日 (2001.8.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/323, 139		
(32) 優先日	平成13年9月17日 (2001.9.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性剤を送達するための化合物および組成物

(57) 【要約】

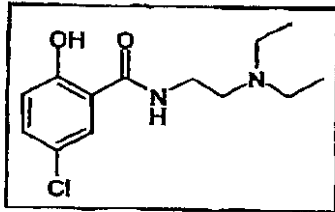
活性剤を送達するための化合物および組成物が提供される。ならびに投与方法および調製方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

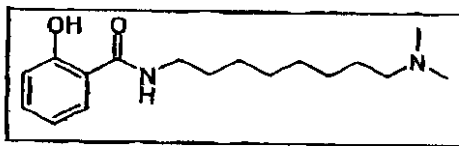
[化1 a]

以下の化合物1-18:



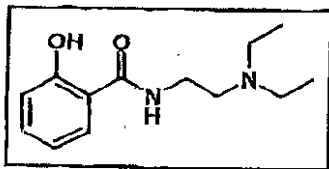
化合物1

10



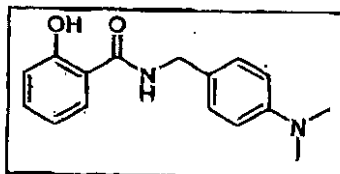
化合物2

20

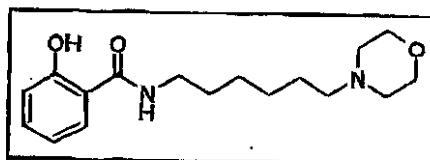


化合物3

30



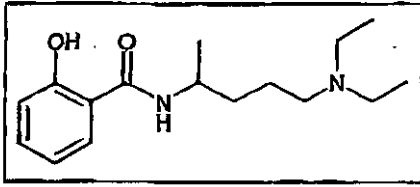
化合物4



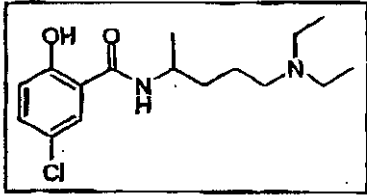
化合物5

40

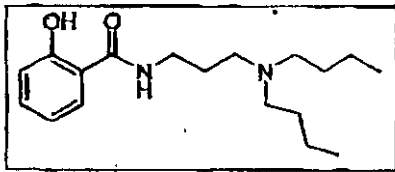
[化1 b]



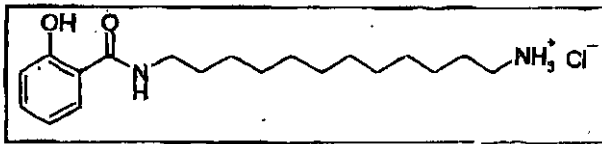
化合物6



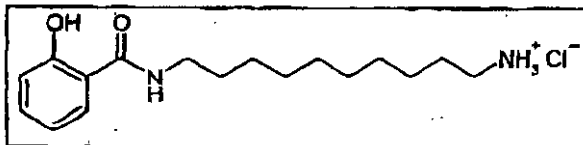
化合物7



化合物8



化合物9



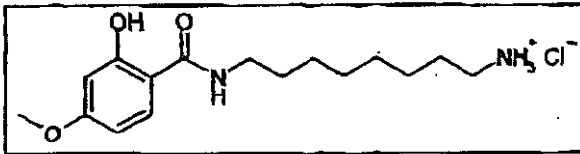
化合物10

10

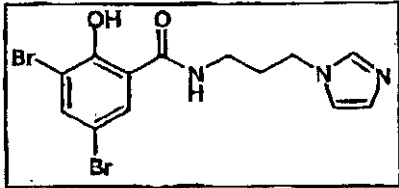
20

30

[化1c]

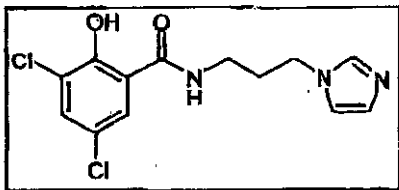


化合物11



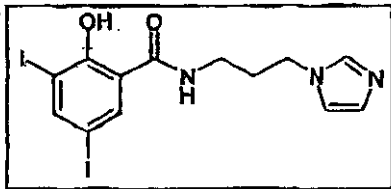
化合物12

10



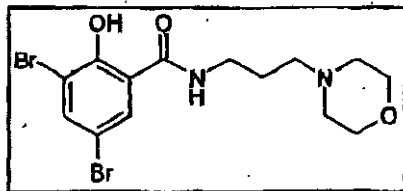
化合物13

20



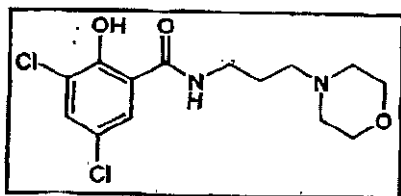
化合物14

30

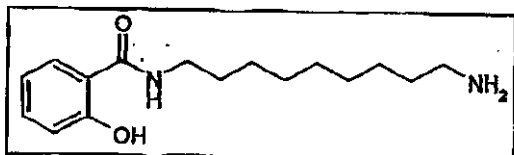


化合物15

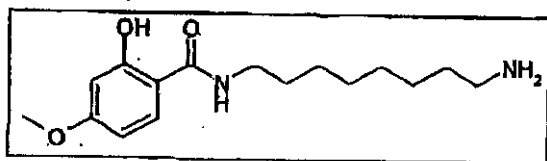
[化 1 d]



化合物16



化合物17



化合物18

およびその塩からなる群から選択される化合物。

【請求項2】

(A) 活性剤、および

(B) 少なくとも1種の請求項1に記載の化合物

を含む組成物。

【請求項3】

活性剤が、生物学的活性剤、化学的活性剤、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

生物学的活性剤が、少なくとも1種のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ホルモン、多糖類、ムコ多糖類、炭水化物、または脂質を含む請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

生物学的活性剤が、BIBN-4096BS、成長ホルモン、ヒト成長ホルモン、組換えヒト成長ホルモン(rhGH)、ウシ成長ホルモン、ブタ成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出因子、インターフェロン、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インスリン、ブタインスリン、ウシインスリン、ヒトインスリン、ヒト組換えインスリン、インスリン様成長因子(IGF)、IGF-1、ヘパリン、未分画ヘパリン、ヘパリノイド、デルマトン、コンドロイチン、低分子量ヘパリン、極低分子量ヘパリン、超低分子量ヘパリン、カルシトニン、サケカルシトニン、ウナギカルシトニン、ヒトカルシトニン、エリスロポイエチン(EPO)、心房性ナトリウム利尿因子、抗原、モノクローナル抗体、ソマトスタチン、プロテアーゼ阻害剤、アドレノコルチコトロピン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、オキシトシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、卵胞刺激ホルモン、グルコセレブロシダーゼ、トロンボポイエチン、フィルグラスチム、プロスタグランジン、シクロスポリン、バソプレシン、クロ

10

20

30

40

50

モリナトリウム、クロモグリク酸ナトリウム、クロモグリク酸2ナトリウム、バンコマイシン、デスフェリオキサミン(DF0)、副甲状腺ホルモン(PTH)、PTHのフラグメント、抗菌剤、抗真菌剤、ビタミン;それらの化合物のアナログ、フラグメント、模倣剤、およびポリエチレングリコール(PEG)修飾誘導体;ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される請求項3に記載の組成物。

【請求項6】

生物学的活性剤が、インスリン、BIBN-4096BS、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、エリスロポイエチン、成長ホルモン、またはそれらの組み合わせを含む請求項3に記載の組成物。

【請求項7】

生物学的活性剤がBIBN-4096BSを含む請求項3に記載の組成物。

10

【請求項8】

生物学的活性剤がインスリンを含む請求項3に記載の組成物。

【請求項9】

(A)請求項2に記載の組成物、および

(B)(a)賦形剤、

(b)希釈剤、

(c)崩壊剤、

(d)潤滑剤、

(e)可塑剤、

20

(f)着色剤、

(g)投与ビヒクル、または

(h)それらの任意の組み合わせ

を含む用量単位。

【請求項10】

活性剤が、生物学的活性剤、化学的活性剤、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項9に記載の用量単位。

【請求項11】

生物学的活性剤が、少なくとも1種のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ホルモン、多糖類、ムコ多糖類、炭水化物、または脂質を含む請求項10に記載の用量単位。

30

【請求項12】

生物学的活性剤が、BIBN-4096BS、成長ホルモン、ヒト成長ホルモン(hGH)、組換えヒト成長ホルモン(rhGH)、ウシ成長ホルモン、ブタ成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出因子、インターフェロン、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インスリン、ブタインスリン、ウシインスリン、ヒトインスリン、ヒト組換えインスリン、インスリン様成長因子、インスリン様成長因子-1、ヘパリン、未分画ヘパリン、ヘパリノイド、デルマトン、コンドロイチン、低分子量ヘパリン、極低分子量ヘパリン、超低分子量ヘパリン、カルシトニン、サケカルシトニン、ウナギカルシトニン、ヒトカルシトニン、エリスロポイエチン、心房性ナトリウム利尿因子、抗原、モノクローナル抗体、ソマトスタチン、プロテアーゼ阻害剤、アドレノコルチコトロピン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、オキシトシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、卵胞刺激ホルモン、グルコセレブロシダーゼ、トロンボポイエチン、フィルグラスチム、プロスタグランジン、シクロスポリン、バソプレシン、クロモリナトリウム、クロモグリク酸ナトリウム、クロモグリク酸2ナトリウム、バンコマイシン、デスフェリオキサミン、副甲状腺ホルモン、PTHのフラグメント、抗菌剤、抗真菌剤、ビタミン;それらの化合物のアナログ、フラグメント、模倣剤、およびポリエチレングリコール修飾誘導体;ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される請求項10に記載の用量単位。

40

【請求項13】

生物学的活性剤が、インスリン、BIBN-4096BS、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、エリ

50

スロポイエチン、ヒト成長ホルモン、またはそれらの組み合わせを含む請求項10に記載の用量単位。

【請求項14】

活性剤が組換えBIBN-4096BSを含む請求項9に記載の用量単位。

【請求項15】

活性剤がインスリンを含む請求項9に記載の用量単位。

【請求項16】

用量単位が、錠剤、カプセル、粉末、液体を含む投与ビヒクルを含む請求項9に記載の用量単位。

【請求項17】

投与ビヒクルが、水、1,2-プロパンジオール、エタノール、および任意の組み合わせからなる群から選択された液体である請求項9に記載の用量単位。

【請求項18】

生物学的活性剤をその薬剤を必要としている動物に投与する方法であって、請求項3に記載の組成物をその動物に経口的に投与することを含む方法。

【請求項19】

(A)少なくとも1種の活性剤、
(B)請求項1に記載の化合物、および
(C)任意選択で投与ビヒクル
を混合することを含む、組成物を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2001年3月1日出願の米国仮出願番号60/272,726、2001年8月24日出願の米国仮出願番号60/314,783、および2001年9月17日出願の米国仮出願番号60/323,139の利益を主張するものであり、それらすべてを参照により本明細書の一部とする。

【0002】

本発明は、生物学的または化学的活性剤などの活性剤を標的に送達するための化合物に関する。これらの化合物は、経口、結腸内、肺、および他の経路によって動物に投与するための活性剤との非共有結合混合物を形成するのによく適している。そのような組成物を調製および投与する方法も開示される。

【背景技術】

【0003】

活性剤を送達するための従来の方法は、多くの場合、生物学的、化学的、および物理的バリアによって厳しく制限される。典型的にそれらのバリアは、送達が生じる環境、送達される標的の環境、および/または標的自体によって課せられる。生物学的および化学的活性剤は、特にそのようなバリアに対して脆弱である。

【0004】

生物学的および化学的に活性な薬剤および治療剤の動物への送達において、バリアは身体によって課せられる。物理的バリアの例は、ある種の活性剤に対して比較的不透過性であるが、循環系などの標的に到達する前に通過しなければならない皮膚、脂質2重層、および種々の器官の膜である。化学的バリアには、これに限定されるものではないが、胃腸(GI)管におけるpH変動、および分解酵素が含まれる。

【0005】

これらのバリアは、経口送達系の設計において特に重要である。多くの生物学的または化学的活性剤の経口送達は、生物学的、化学的、および物理的バリアがなければ動物に投与するための最適な経路となるであろう。典型的に経口投与に供することのできない多数の薬剤には、カルシトニンおよびインスリンなどの生物学的または化学的に活性なペプチド;多糖類、および特にこれに限定されるものではないがヘパリンを含むムコ多糖類;ヘパリンノイド;抗生物質;ならびに他の有機物質が挙げられる。これらの薬剤は、酸加水分解、酵

10

20

30

40

50

素などによって胃腸管において急速に無効となるか、破壊される可能性がある。さらに、高分子薬剤の大きさおよび構造が吸収を妨げる可能性がある。

【0006】

脆弱な薬剤を経口投与するための従来の方法は、腸管壁の透過性を人為的に増大する補助薬(たとえば、レゾルシノール、ならびにポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルなどの非イオン性界面活性剤)の同時投与、ならびに酵素による分解を阻害する酵素阻害剤(たとえば、膵臓トリプシン阻害剤、フルオロリン酸ジイソプロピル(DFF)、およびトラジロール)の同時投与に依存していた。リポソームモインスリンおよびヘパリンの薬剤送達系として記載されている。しかしながら、(1)それらの系は毒性量の補助薬または阻害剤を必要とする、(2)適切な低分子量の積載物、すなわち活性剤が得られない、(3)系が良好でない安定性、および不十分な保存寿命を示す、(4)系の製造が困難である、(5)系が活性剤(積載物)を保護できない、(6)系が活性剤を不利に改変する、あるいは(7)系が活性剤の吸収を許容または促進しないため、そのような薬剤送達系の広範囲にわたる使用は妨げられている。

10

【0007】

薬剤を送達するために、プロテノイドミクロスフェアが用いられてきた。たとえば、米国特許第5,401,516号、第5,443,841号、およびRe.35,862を参照されたい。さらに、薬剤を送達するために、ある種の変性アミノ酸が用いられてきた。たとえば、米国特許第5,629,020号、第5,643,957号、第5,766,633号、第5,776,888号、および第5,866,536号を参照されたい。

20

【0008】

より最近では、ポリマー送達剤を提供するために、結合基を介してポリマーを変性アミノ酸またはその誘導体にコンジュゲートしている。この変性ポリマーは任意のポリマーであってよいが、好ましいポリマーには、これに限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)、およびその誘導体が含まれる。たとえば、国際特許公開W000/40203を参照されたい。

【特許文献1】

米国仮出願番号60/272,726

【特許文献2】

米国仮出願番号60/314,783

30

【特許文献3】

米国仮出願番号60/323,139

【特許文献4】

米国特許第5,401,516号

【特許文献5】

米国特許第5,443,841号

【特許文献6】

米国特許Re.35,862

【特許文献7】

米国特許第5,629,020号

40

【特許文献8】

米国特許第5,643,957号

【特許文献9】

米国特許第5,766,633号

【特許文献10】

米国特許第5,776,888号

【特許文献11】

米国特許第5,866,536号

【特許文献12】

国際特許公開W000/40203

50

【非特許文献1】

Physicians' Desk Reference(第54版、2000、Medical Economics Company Inc.、Montvale、NJ)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかしながら、容易に調製され、種々の経路によって広範な活性剤を送達することのできる、単純で安価な送達系が依然として求められている。

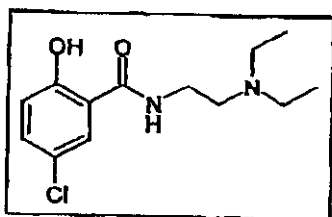
【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、活性剤の送達を容易にする化合物および組成物を提供する。本発明の送達剤化合物には、以下の式を有するもの、およびその塩が含まれる。これらの送達剤化合物の混合物も、活性剤の送達を容易にするために用いることができる。

【0011】

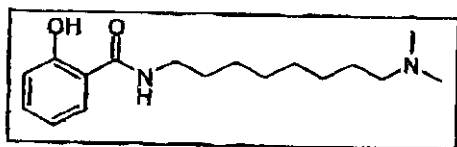
【化2a】



化合物1

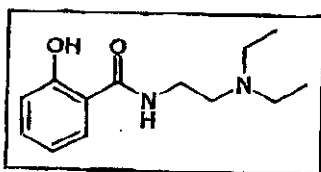
10

20



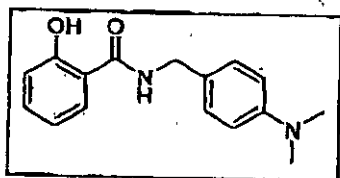
化合物2

30

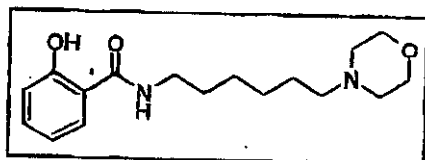


化合物3

40

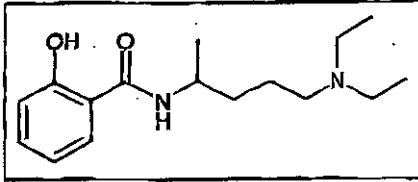


化合物4

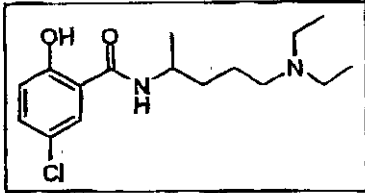


化合物5

【化2b】

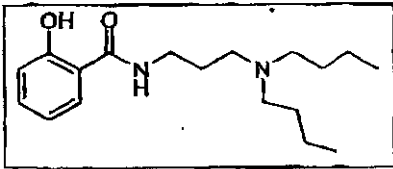


化合物6



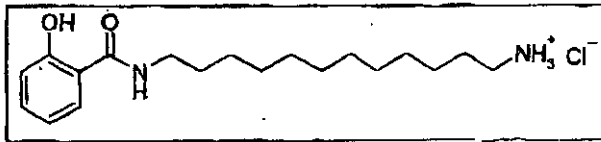
化合物7

10

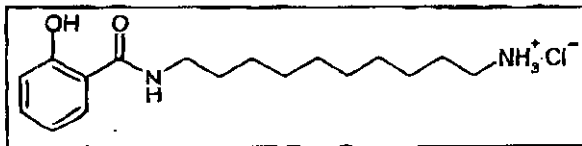


化合物8

20



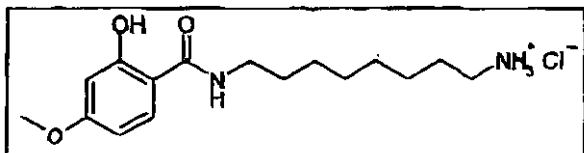
化合物9



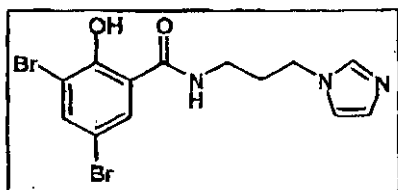
化合物10

30

【化 2 c】

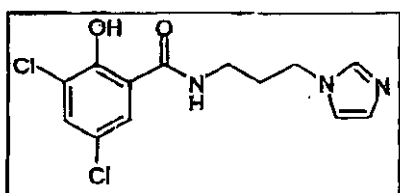


化合物11



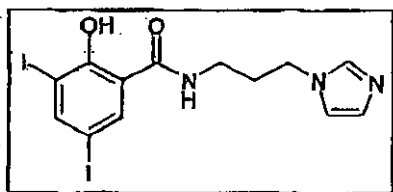
化合物12

10



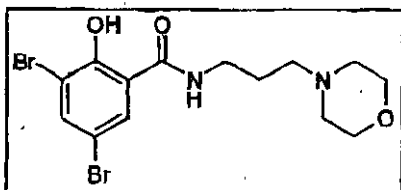
化合物13

20



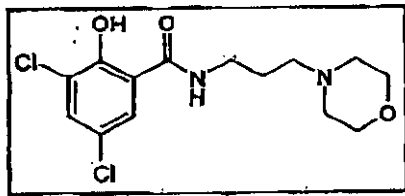
化合物14

30

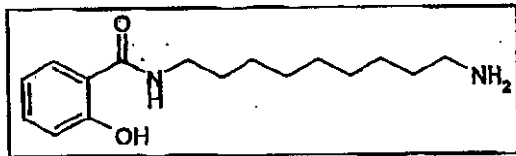


化合物15

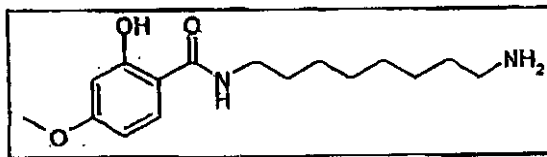
【化 2 d】



化合物16



化合物17



化合物18

10

20

【0012】

本発明はさらに、少なくとも1種の上式の送達剤化合物、および少なくとも1種の活性剤を含む組成物を提供する。これらの組成物は、送達剤化合物を用いない活性剤の投与に比べて増大または改善された活性剤のバイオアベイラビリティで、選択された生体系に活性剤を送達する。

【0013】

さらに、その組成物を含む用量単位が提供される。投与単位は、液体、あるいは錠剤、カプセル、または粉剤もしくはサシェを含む粒剤などの固体であることができる。

【0014】

他の実施形態は、少なくとも1種の上式の送達剤化合物および活性剤を含む組成物を動物に投与することによって、その活性剤を必要とする動物に活性剤を投与する方法である。好ましい投与経路には、経口、結腸内、および肺経路が含まれる。

【0015】

他の実施形態は、本発明の組成物を投与することによって、動物において疾患を治療する、または所望の生理的効果を得る方法である。

【0016】

他の実施形態は、少なくとも1種の上式の送達剤化合物、および少なくとも1種の活性剤を混合することによって、本発明の組成物を調製する方法である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

送達剤化合物

本明細書において「アルキル」および「アルケニル」という用語には、それぞれ直鎖および分枝鎖アルキルおよびアルケニル置換基が含まれる。

【0018】

この送達剤化合物は、遊離塩基、またはその塩の形態であることができる。適切な塩には、これに限定されるものではないが、有機および無機塩、たとえば塩酸塩、アンモニウム、酢酸塩、クエン酸塩、ハロゲン化物、水酸化物、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、アルコキ

50

シ、過塩素酸塩、テトラフルオロホウ酸塩、カルボン酸塩、メシル酸塩、フメル酸塩(fum erate)、マロン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、酢酸塩、グルコン酸塩、およびマレイン酸塩が含まれる。これらの塩は、エタノール溶媒和物を含む溶媒和物、および水和物であることもできる。メシル酸塩は、送達剤化合物の遊離塩基をメタンスルホン酸と反応させることによって形成することができる。

【0019】

本発明の送達剤化合物の塩は、当分野で知られている方法によって調製することができる。たとえば、クエン酸塩は、エタノール、トルエン、およびクエン酸中で調製することができる。この塩は、エタノール溶媒和物を含む溶媒和物、および水和物であることもできる。

10

【0020】

この送達剤化合物は、再結晶によって、あるいは単独またはタンデムに連結した1つまたは複数の固体クロマトグラフィ支持体での分画によって精製することができる。適切な再結晶溶媒系には、これに限定されるものではないが、エタノール、水、ヘプタン、酢酸エチル、アセトニトリル、メタノール、およびテトラヒドロフラン(THF)、ならびにそれらの混合物が含まれる。分画は、移動相としてメタノール/n-プロパノール混合物を用い、アルミナなどの適切なクロマトグラフィ支持体において、移動相としてトリフルオロ酢酸/アセトニトリル混合物を用い、逆相クロマトグラフィにおいて、および移動相として水または適切なバッファーを用い、イオン交換クロマトグラフィにおいて行うことができる。アニオン交換クロマトグラフィを行うとき、好ましくは0-500mMの塩化ナトリウム勾配

20

【0021】

この送達剤は、NHC(O)NH-、-C(O)NH-、-NHC(O)、-OOC-、-COO-、-NHC(O)O-、-OC(O)NH-、-CH₂NH-、-NHCH₂-、-CH₂NHC(O)O-、-OC(O)NHCH₂-、-CH₂NHCOCH₂O-、-OCH₂C(O)NHCH₂-、-NHC(O)CH₂O-、-OCH₂C(O)NH-、-NH-、-O-、および炭素-炭素結合からなる群から選択された結合基によって送達剤に複合(コンジュゲート)したポリマーを含有することができるが、ただしポリマー送達剤は、ポリペプチドまたはポリアミノ酸でない。ポリマーは、これに限定されるものではないが、交互コポリマー、ブロックコポリマー、およびランダムコポリマーを含む、哺乳動物での使用に安全な任意のポリマーであることができる。好ましいポリマーには、これに限定されるものではないが、ポリエチレン、ポリアクリレート、

30

【0022】

活性剤

本発明での使用に適した活性剤には、これに限定されるものではないが、殺虫剤、薬剤、および治療剤を含む生物学的活性剤および化学的活性剤が含まれる。適切な活性剤には、

40

【0023】

たとえば、本発明での使用に適した生物学的または化学的活性剤には、これに限定されるものではないが、タンパク質;ポリペプチド;ペプチド;ホルモン;多糖類、および特にムコ多糖類の混合物;炭水化物;脂質;小極性有機分子(すなわち、500ダルトン以下の分子量を有する極性有機分子);他の有機化合物;ならびに特にそれだけでは胃腸粘膜を通過できず(または投与量の少量のみが通過する)、かつ/または胃腸管において酸および酵素による化

50

学的開裂を受け易い化合物;またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0024】

さらなる例には、これに限定されるものではないが、それらの合成、天然、または組換え供給源を含む以下の剤、ヒト成長ホルモン(hGH)、組換えヒト成長ホルモン(rhGH)、ウシ成長ホルモン、およびブタ成長ホルモンを含む成長ホルモン;成長ホルモン放出ホルモン;成長ホルモン放出因子、
、
、および
を含むインターフェロン;インターロイキン-1;インターロイキン-2;亜鉛、ナトリウム、カルシウム、およびアンモニウムを含むカウん
タイオンを任意選択で有する、ブタ、ウシ、ヒト、およびヒト組換えを含むインスリン;IGF-1を含むインスリン様成長因子;未分画ヘパリン、ヘパリノイド、デルマトン、コンド
ロイチン、低分子量ヘパリン、極低分子量ヘパリン、および超低分子量ヘパリンを含むヘ
パリン;サケ、ウナギ、ブタ、およびヒトを含むカルシトニン;エリスロポイエチン;心房
性ナトリウム利尿因子(atrial natriuretic factor);抗原;モノクローナル抗体;ソマトスタ
チン;プロテアーゼ阻害剤;アドレノコルチコトロピン;性腺刺激ホルモン放出ホルモン;オ
キシトシン;黄体形成ホルモン放出ホルモン;卵胞刺激ホルモン;グルコセレブロシターゼ;
トロンボポイエチン;フィルグラスチム;プロスタグランジン;シクロスポリン;バソプレシ
ン;クロモリンナトリウム(クロモグリク酸ナトリウムまたは2ナトリウム);バンコマイシ
ン;デスフェリオキサミン(DF0);アレンドロネート、チルドロネート、エチドロネート、
クロドロネート、パミドロネート、オルパドロネート、およびインカドロネートを含むピ
スホスホネート;そのフラグメントを含む副甲状腺ホルモン(PTH);BIBN-4096BS、および他
のカルシトニン遺伝子関連タンパク質アンタゴニストなどの抗片頭痛剤;抗生物質、抗細
菌、および抗真菌剤を含む抗菌剤;ビタミン;これらの化合物のアナログ、フラグメント、
模倣剤、またはポリエチレングリコール(PEG)修飾誘導体;あるいはそれらの任意の組み合
わせが含まれる。抗生物質の非限定的な例には、グラム陽性作用性、殺菌性、リポペプチ
ド、および環状ペプチド抗生物質、ダプトマイシンなど、ならびにそれらのアナログが含
まれる。

10

20

【0025】

送達系

本発明の組成物は、1種または複数の本発明の送達剤化合物、および1種または複数の活性剤を含む。一実施形態において、1種または複数の送達剤化合物、またはそれらの化合物の塩、あるいはそれらの化合物または塩が1つまたは複数のそれらの単位を形成するポリ
アミノ酸またはペプチドを、投与前に活性剤と混合して投与組成物を形成することによっ
て、送達剤として用いることができる。

30

【0026】

この投与組成物は、液体の形態であることができる。溶液媒質は、水(たとえば、サケカルシトニン、副甲状腺ホルモン、およびエリスロポイエチンの場合)、25%プロピレングリ
コール水溶液(たとえば、ヘパリンの場合)、およびリン酸バッファー(たとえば、rhGHの
場合)であることができる。他の投与ビヒクルには、ポリエチレングリコールが含まれる
。投与溶液は、投与直前に送達剤化合物の溶液を活性剤の溶液と混合することによって調
製できる。あるいは、送達剤化合物(または活性剤)の溶液を固体形態の活性剤(または送
達剤化合物)と混合することができる。送達剤化合物および活性剤は、乾燥粉末として混
合することもできる。送達剤化合物および活性剤は、製造工程中に混合することもできる
。

40

【0027】

投与溶液は、リン酸バッファー塩、クエン酸、グリコール、または他の分散剤などの添加剤を任意選択で含むことができる。好ましくは約0.1から20%(w/v)の範囲の濃度で、溶液中に安定添加剤を混合することができる。

【0028】

一実施形態において、BIBN-4096BSを含有する投与溶液は、8未満のpHを有する。他の実施形態によれば、BIBN-4096BSを含有する投与溶液は、7未満のpHを有する。

【0029】

50

あるいは投与組成物は、錠剤、カプセル、または粉剤もしくはサシェなどの粒剤などの固体の形態であることができる。固体投与形態は、固体形態の化合物を固体形態の活性剤と混合することによって調製できる。あるいは、凍結乾燥(凍結乾燥法)、析出、結晶化、および固体分散などの当分野で知られている方法によって、化合物と活性剤の溶液から固体を得ることができる。

【0030】

本発明の投与組成物は、1種または複数の酵素阻害剤を含むこともできる。そのような酵素阻害剤には、これに限定されるものではないが、アクチノニンまたはエピアクチノニンなどの化合物、およびそれらの誘導体が含まれる。他の酵素阻害剤には、これに限定されるものではないが、アプロチニン(Trasylol)およびボーマン-バーク阻害剤が含まれる。

10

【0031】

本発明の投与組成物において用いられる活性剤の量は、標的適応症に対する特定の活性剤の目的を達成するのに有効な量である。組成物における活性剤の量は典型的に、薬理的、生物学的、治療的、または化学的に有効な量である。しかしながら、組成物が用量単位で用いられるとき、用量単位が複数の送達剤化合物/活性剤組成物を含有する可能性があり、あるいは分割された薬理的、生物学的、治療的、または化学的有効量を含有する可能性があるため、量はその量より少ない量であり得る。そのとき全有効量は、合計して活性剤の有効量を含有する蓄積単位で投与され得る。

【0032】

用いられる活性剤の全量は、当分野の技術者に知られている方法によって求めることができる。しかしながら、本発明の組成物は活性剤を単独で含有する組成物より効率的に活性剤を送達する可能性があるため、従来の用量単位または送達系において用いられるものより少量の生物学的または化学的活性剤を対象に投与し、同じ血中濃度および/または治療効果を得ることができる。

20

【0033】

ここに開示される送達剤化合物は、特に経口、鼻腔内、舌下、十二指腸内、皮下、口腔内、結腸内、直腸、膈、粘膜、肺、経皮、皮内、非経口、静脈内、筋肉内、および眼系において、生物学的および化学的活性剤の送達を容易にし、血液-脳バリアを通過させる。

【0034】

用量単位はさらに、賦形剤、希釈剤、崩壊剤、潤滑剤、可塑剤、着色剤、香味剤、風味マスキング剤、糖、甘味料、塩、およびこれに限定されるものではないが、水、1,2-プロパンジオール、エタノール、オリーブ油、またはそれらの任意の組み合わせを含む投与ビヒクルのいずれか1種または組み合わせを含むことができる。

30

【0035】

本発明の化合物および組成物は、これに限定されるものではないが、ニワトリなどの鳥類;ネズミ類、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、霊長類、特にヒトなどの哺乳動物;および昆虫を含む任意の動物に、生物学的または化学的活性剤を投与するのに有用である。

【0036】

この系は、これを用いなければ活性剤がその標的域(すなわち、送達組成物の活性剤が放出される領域)に到達する前、およびそれらが投与される動物の体内で遭遇する条件によって破壊されるか、有効性が低下する化学的または生物学的活性剤を送達するのに特に有利である。特に、本発明の化合物および組成物は、活性剤、特に通常は経口で送達できない活性剤、または改善された送達が所望である活性剤を経口で投与するのに有用である。

40

【0037】

この化合物および活性剤を含む組成物は、選択された生体系に、送達剤を用いない活性剤の投与に比べて増大または改善されたバイオアベイラビリティで活性剤を送達するのに有用である。送達は、ある期間にわたってより多くの活性剤送達することによって、または特定の期間に活性剤を送達する(すなわち、より迅速な送達、または遅延送達など)、または特定の時間に、もしくはある期間にわたって活性剤を送達する(持続送達など)ことにおいて改善され得る。

50

【0038】

本発明の他の実施形態は、本発明の組成物を投与することによって、動物において、以下の表に挙げたような疾患を治療または予防する方法、あるいは所望の生理的効果を達成する方法である。活性剤に関する特定の適応症は、参照により本明細書の一部とするPhysicians' Desk Reference(第54版、2000、Medical Economics Company Inc.、Montvale、NJ)に見出すことができる。以下の表の活性剤には、それらのアナログ、フラグメント、模倣剤、およびポリエチレングリコール修飾誘導体が含まれる。

【0039】

【表1】

活性剤	疾患および生理的効果
成長ホルモン	成長障害
α、β、およびγを含むインターフェロン	慢性癌および多発性硬化症を含むウイルス感染
インターロイキン-1、インターロイキン-2	ウイルス感染、癌
インスリン、インスリン様成長因子IGF-1	糖尿病
ヘパリン	血栓症、血液凝固の予防
カルシトニン	骨粗鬆症、骨の疾患
エリスロポイエチン	貧血
心房性ナトリウム利尿因子	血管拡張
抗原	感染
モノクローナル抗体	移植拒絶の予防、癌
ソマトスタチン	出血性潰瘍、びらん性胃炎
プロテアーゼ阻害剤	AIDS
アドレノコルチコトロピン	高コレステロール(コレステロールの低下)
性腺刺激ホルモン放出ホルモン	排卵機能不全(排卵の刺激)
オキシトシン	分娩機能不全(収縮の刺激)
黄体形成ホルモン放出ホルモン、卵胞刺激ホルモン	生殖機能の調節
グルコセレブロシダーゼ	ゴーシェ病(リポタンパク質の代謝)
トロンボポイエチン	血小板減少症
フィルグラスチム	化学療法患者における感染の減少
プロスタグランジン	高血圧
シクロスポリン	移植拒絶
バソプレシン	夜尿症、抗利尿剤
クロモリンナトリウム、バンコマイシン	喘息、アレルギー
デスフェリオキサミン(DFO)	鉄過剰
フラグメントを含む副甲状腺ホルモン(PTH)	骨粗鬆症、骨の疾患
抗菌剤	グラム陽性細菌感染を含む感染
ビタミン	ビタミン欠乏症
ビスホスホネート	骨粗鬆症、パジェット病、破骨細胞の阻害
BIBN4096BS-(1-ピペリジンカルボキシアミド、N-[2-[[5-アミノ-1-[[4-(4-ピリジニル)-1-ピペラジニル]カルボニル]ペンチル]アミノ]-1-[(3,5-ジプロモ-4-ヒドロキシフェニル)メチル]-2-オキソエチル]-4(1,4-ジヒドロ-2-オキソ-3(2H)-キナゾリニル)-[R-(R*,S*)]-)	抗片頭痛、カルシトニン遺伝子関連ペプチドアンタゴニスト

10

20

30

40

【0040】

たとえば、本発明の一実施形態は、インスリンおよび少なくとも1種の本発明の送達剤化合物を投与することによって、糖尿病を罹患している、または罹患しやすい患者を治療する方法である。

【0041】

50

投与に続いて、組成物または用量単位に存在する活性剤は、血液循環に取り込まれる。その薬剤のバイオアベイラビリティは、たとえばヘパリンによって引き起こされる血液凝固時間の増加、またはカルシトニンによって引き起こされる血中カルシウム濃度の減少のような、血液中の既知の薬理活性を測定することによって容易に評価される。あるいは、活性剤自体の血中濃度を直接測定することができる。

【0042】

以下の実施例は、限定することなく本発明を例示する。すべての部は、別段の指示のない限り、重量によって示される。

【0043】

以下に挙げた化合物に関するプロトン核磁気共鳴 (^1H NMR) 分析は、別段の指示のない限り、溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO- d_6) を用いて、300MHzのBrukerスペクトロメータで行った。 10

【0044】

液体クロマトグラフ/マススペクトロメトリ (LC-MS) 分析は、以下のパラメータを有するAgilent TechnologiesのLC/MSD1100 (シングル四重極) を用いて行った。

移動相A 50:950:5 アセトニトリル:水:酢酸 (v/v/v)

移動相B 950:50:5 アセトニトリル:水:酢酸 (v/v/v)

勾配溶離 0-100%Bの直線勾配4分、注入当たりの合計時間は11分

注入量 5 μ l

カラム ZORBAX Rapid Resolution Cartridge, SB-C18, 2.1 \times 30mm, 3.5 μ m 20

粒径、カタログ#873700-902

カラム温度 40

244nmにおいてUV検出

MSDパラメータ

ソース API-ES、正極性

スキャンパラメータ

質量範囲 125.00-600.00

フラグメンタ 60V

ゲイン 1.0EMV

閾値 150 30

スプレーチャンバ

ガス温度 350deg.D

乾燥ガス 12.0 l/分

ネブライザ圧 40psig

VCap 4000V 正/負

【実施例1】

【0045】

化合物の調製

1a 化合物2の調製

40%ジメチルアミン/水 (30ml, 26.9g, 239mmol) およびエタノール (50ml) の溶液を、10分かけて1滴ずつ加えた8-プロモ-1-オクタノール (15.13g, 72.3mmol) およびエタノール (20ml) の溶液で処理した。反応混合物を75時間攪拌し、酢酸エチル (80ml) で希釈、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄した。水相を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機相を飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (50ml) およびブライン (2 \times 40ml) で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。黄色の油として単離した11.4gの8-ジメチルアミノ-1-オクタノールをそのまま用いた。 40

【0046】

カルサラム (carsalam) (10.80g, 66.2mmol)、8-ジメチルアミノ-1-オクタノール (11.4g, 65.8mmol)、トリフェニルホスフィン (17.53g, 66.8mmol)、およびテトラヒドロフラン (40ml) のスラリーを、25分かけて1滴ずつ加えたアゾジカルボン酸ジイソプロピル (13.0ml, 13 50

.35g、66.0mmol)およびテトラヒドロフラン(20ml)の溶液で処理し、温度は50 に上昇した。反応混合物を25 に冷まし、40時間攪拌した。その溶液を、2NのNaOH水溶液(70ml、140mmol)で処理し、180分間60 に加温した。冷却した反応混合物を、酢酸エチル(2×50ml)で洗浄した。水相を4%HCl水溶液でわずかに0に満たないpHに酸性化し、酢酸エチル(2×40ml)で洗浄した。固体炭酸水素ナトリウムで処理することによって、水相のpHは9.5に上昇した。水相を塩化メチレン(10×40ml)で抽出した。合わせた塩化メチレン抽出物を、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮して、生成物0.6gを得た。生成物の残部は、以前の酢酸エチル抽出物に見出された。これらの酢酸エチル層を、1NのNaOH水溶液(4×30ml)で抽出した。4つの水相を合わせ、4%HCl水溶液でpH0.7に酸性化し、酢酸エチル(2×30ml)で洗浄した。2NのNaOH水溶液を用いて、この水溶液のpHを5に調整した。泡が生じなくなるまで、溶液を固体炭酸水素ナトリウムで処理し、酢酸エチル(6×50ml)で抽出した。合わせた酢酸エチル層を、硫酸ナトリウムで乾燥し、固体に濃縮した。その固体をテトラヒドロフランに溶解し、HClガスで処理した。水を添加し、固体を溶液から沈殿させた。濾過によって、合わせて4.73gのN-(8-ジメチルアミノオクチル)サリチルアミド塩酸塩を単離した。融点78~80 ;¹HNMR (DMSO-d₆)、 (ppm): 10.5 (bs, 1H)、8.9 (t, 1H)、7.9 (dd, 1H)、7.4 (td, 1H)、6.9 (m, 2H)、3.3 (q, 2H)、3.0 (m, 2H)、2.7 (s, 6H)、1.6 (t, 4H)、1.3 (m, 8H)。KF値 = 5.19% 水。元素分析: %C: 58.86 (計算値)、58.87 (実測値); %H: 9.01 (計算値)、8.98 (実測値); %N: 8.08 (計算値)、7.98 (実測値)。

10

【0047】

1b 化合物4の調製

1つ口の250ml丸底フラスコに、4-(ジメチルアミノ)ベンジルアミノ二塩酸塩(8.0g、0.0358mol)および塩化メチレン50mlを充填した。攪拌した溶液を氷浴で冷却した。トリエチルアミン(20.0ml、0.1432mol)および触媒量の4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)を、反応混合物に添加した。塩化アセチルサリチロイル(7.12g、0.1432mol)の塩化メチレン(30ml)溶液を、冷却した反応フラスコに添加した。添加が完了した後、反応混合物を室温に温め、一晚攪拌した。

20

【0048】

反応混合物を2NのHClで希釈し、層を分離した。有機相を水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、真空中で濃縮した。生じた油を、2NのNaOH中で4時間攪拌し、酢酸エチルで洗浄した。水相を真空中で濃縮し、残留する酢酸エチルを除去した。水相のpHを7に調整し、生じた固体を真空濾過によって集めた。粗固体の重量は1.76gであった。反応を繰り返し、さらに0.88gの粗生成物を得た。合わせた固体をエタノール/水から再結晶し、白色の固体として、2.64gのN-(4-ジメチルアミノベンジル)サリチルアミドを得た。

30

融点129~132 ;¹HNMR(d₆-DMSO)、 (ppm): 9.3 (s, 1H)、7.87 (dd, 1H)、7.39 (dt, 1H)、7.16 (d, 2H)、6.87 (t, 2H)、6.69 (d, 2H)、4.38 (d, 2H)、2.86 (s, 6H)。元素分析: %C: 71.09 (計算値)、70.84 (実測値); %H: 6.71 (計算値)、6.50 (実測値); %N: 10.36 (計算値)、10.14 (実測値)。

【0049】

1c 化合物5の調製

ホルホルン(3.30ml、3.30g、37.8mmol)、6-ブromo-1-ヘキサノール(6.72g、72.3mmol)、エタノール(20ml)、および炭酸カリウム(6.23g、45.1mmol)の懸濁液を、最初のわずかな発熱の後、25 で36時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル(30ml)で希釈し、濾過し、濃縮した。残渣を酢酸エチルに溶解し、濾過し、濃縮した。黄色の油として7.0gの4-(6-ヒドロキシヘキシル)ホルホルンを単離し、そのまま用いた。

40

【0050】

カルサラム(6.13g、37.6mmol)、4-(6-ヒドロキシヘキシル)ホルホルン(7.0g、37.4mmol)、トリフェニルホスフィン(9.97g、35.0mmol)、およびテトラヒドロフラン(40ml)のスラリーを、15分かけて1滴ずつ加えたアゾジカルボン酸ジイソプロピル(7.40ml、7.60g、37.6mmol)およびテトラヒドロフラン(10ml)の溶液で処理した。反応混合物を25 で60時間攪拌した。その溶液を、2NのNaOH水溶液(50ml、100mmol)で処理し、180分間60 に加温した

50

。冷却した反応混合物を濃縮して、テトラヒドロフランを除去した。水性残渣を酢酸エチル(2×40ml)で洗浄し、4% HCl水溶液でpH0.84に酸性化した(二酸化炭素ガスが発生した)。2NのNaOH水溶液で水相のpHを7.8に上げた。固体炭酸水素ナトリウムを添加した。酢酸エチル(8×40ml)で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥、濃縮して油を得たが、それは放置によって固化した。合わせて4.26gの4-(6-モルホリン-4-イルヘキシル)-サリチルアミドを単離した。

融点70~73 ; ¹HNMR (d₆-DMSO)、 (ppm): 8.8 (t, 1H)、7.8 (dd, 1H)、7.4 (td, 1H)、6.9 (m, 2H)、3.5 (t, 4H)、3.3 (q, 2H)、2.3 (t, 4H)、2.2, (t, 2H)、1.5 (t, 2H)、1.3~1.4 (m, 6H)。KF値 = 5.39 % 水。元素分析: %C: 63.05 (計算値)、63.06 (実測値); %H: 8.70 (計算値)、8.53 (実測値); %N: 8.65 (計算値)、8.73 (実測値)。

10

【0051】

1d 化合物1、7のクエン酸塩の調製

N-ヒドロキシスクシミド-0-アセチル-5-クロロサリチレートの合成

5-クロロサリチル酸(17.3g、100mmol)および3滴の濃硫酸(98%)を、無水酢酸(14g、137mmol)および氷酢酸(16.4g、274mmol)の溶液に攪拌しながら添加した。反応混合物をゆっくりと70 に加熱し、2時間攪拌した。反応混合物を室温に冷却し、徐々に氷水(500ml)に添加し、アセチル化生成物を沈殿させた。それらの固体を集め、水で洗浄した。生成物の2つのバッチを合わせ、酢酸エチルで再結晶した。真空濾過によって純粋な結晶を集め、16.3gの0-アセチル-5-クロロサリチル酸(76mmol、収率76%)を得た。

C₉H₇O₄Clの元素分析計算値C 50.37%、H 3.29%、N 0.0%、実測値C 50.36%、H 3.20%、N < 0.02%

20

【0052】

N-ヒドロキシスクシンイミド(8.6g、82mmol)を、ジメチルホルムアミド(DMF)(8ml)に溶解した。この溶液を室温でジクロロメタン(DCM)(150ml)中の0-アセチル-5-クロロサリチル酸(16g、74.6mmol)と混合した。混合物を水浴で攪拌した。1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(17g、82mmol)をジクロロメタン(55ml)に溶解し、混合物に徐々に添加した。反応物を室温に平衡させ、24時間攪拌した。混合物を-10 に冷却し、濾過して固体を除去した。濾液をジクロロメタン(100ml)で希釈した。溶液を1NのHCl(2×20ml)、ブライン(2×200ml)、5%炭酸水素ナトリウム(2×200ml)、およびブライン(2×200ml)で洗浄した。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空中で蒸発した。生成物を集め、22.5g(72mmol、97%)を得た。

30

【0053】

化合物7 2-(5-クロロ-2-ヒドロキシベンゾイル)アミノ-5-(N',N'-ジエチルアミノ)ペンタンモノシトレート

IUPAC名 N-[5-(ジエチルアミノ)-1-メチルペンチル]-5-クロロ-2-ヒドロキシベンズアミドモノシトレート

上で得たN-ヒドロキシスクシミド-0-アセチル-5-クロロサリチレート(3.1g、10mmol)をジクロロメタン(15ml)に溶解した。この溶液をジクロロメタン(35ml)中の2-アミノ-5-ジエチルアミノペンタン(3.2g、20mmol)に攪拌しながらゆっくり添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。HPLCは反応の完了を示した。反応混合物を5%炭酸水素ナトリウム(3×100ml)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ジクロロメタンを真空中で蒸発して、遊離3級アミン生成物(2.3g、7.4mmol、74%)を得た。

40

【0054】

上で得た2-(5-クロロ-2-ヒドロキシベンゾイルアミノ)-5-(N,N-ジエチルアミノ)ペンタン(2.3g、7.4mmol)およびクエン酸(1.4g、7.4mmol)を無水エチルアルコール(8ml)に溶解した。溶液が濁るまで、ジエチルエーテル(~30ml)を溶液に添加した。濁った溶液を一晩冷却し、クエン酸塩を沈殿させた。最終生成物2-(5-クロロ-2-ヒドロキシベンゾイルアミノ)-5-(N,N-ジエチルアミノ)ペンタンモノシトレートを真空濾過によって集め、窒素フロー下で乾燥して2.0g(4.0mmol、54%)を得た。

融点57~59 ; ¹HNMR (DMSO-d₆) (ppm): 1.18 (m, 9H)、1.60 (m, 4H)、2.57 (q_{ab}, 4H)

50

)、3.08 (m, 6H)、4.04 (q, 1H)、4.11 (s, 1H)、6.98 (d, 1H)、7.47 (dd, 1H)、8.01 (d, 1H)、8.70 (s, 1H)。KF値 = 0.59%。元素分析: $C_{22}H_{33}N_2O_9Cl$ の計算値: C 52.33、H 6.54、N 5.55。実測値: C 52.21、H 6.79、N 5.20。

【0055】

化合物1 N-(5-クロロ-2-ヒドロキシベンゾイル)-N',N'-ジエチレンジアミンモノシレート

IUPAC名 N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-5-クロロ-2-ヒドロキシベンズアミドモノシレート

適切な出発原料を用い、化合物7と同じ手順で化合物1を調製した。

融点107~109 ; 1H NMR (DMSO- d_6)、 (ppm): 1.16 (t, 6H)、2.61 (q_{ab} , 4H)、3.09 (m, 6H)、3.59 (s, 2H)、6.98 (d, 1H)、7.44 (dd, 1H)、7.88 (d, 1H)、9.09 (s, 1H)、9.95~11.20 (s, 3H)。元素分析: $C_{19}H_{27}N_2O_9Cl$ の計算値: C 49.30、H 5.84、N 6.05; 実測値: C 49.30、H 5.78、N 5.94。

【0056】

1e 化合物11、18の調製

N-ヒドロキシスクシミド-0-アセチル-4-メトキシサリチレートの合成

適切な出発原料を用い、N-ヒドロキシ-0-アセチル-5-クロロサリチレートと同じ手順で、N-ヒドロキシスクシミド-0-アセチル-4-メトキシサリチレートを調製した。

【0057】

化合物11 8-(2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾイルアミド)オクチルアミン塩化水素

IUPAC名 N-(8-アミノオクチル)-2-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアミド塩化水素

上で得たN-ヒドロキシスクシミド-0-アセチル-4-メトキシサリチレート(13g、42.3mmol)をジクロロメタン(70ml)中に溶解し、水浴中で攪拌しながら1,8-ジアミノオクタン(13g、90mmol)のジクロロメタン(230ml)溶液に1滴ずつ添加した。反応物を一晩攪拌した。生成物を溶液から沈殿させ、真空濾過によって集めた。沈殿物をジクロロメタンで洗浄し、風乾し、粗生成物9.0gを得た。沈殿物を水(50ml)で洗浄し、0.5時間攪拌しながら、0.1NのHCl水溶液(50ml)で抽出した。この酸性水溶液を濾過し、不溶性物質を除去した。濾液をエチルエーテル(150ml)で洗浄し、pH10に調整した。すぐに沈殿が生じた。この混合物を室温で一晩放置した。沈殿物を濾過によって集め、風乾し、2.6g(8.8mmol、21%)を得た。

【0058】

上で得た遊離1級アミン(1.7g、5.8mmol)を無水エチルアルコール20mlに懸濁した。この混合物にHClガスを10分間通気し、透明溶液を得た。この溶液に窒素ガスを通気して過剰HClを除去し、溶液の量が10mlになるまでエチルアルコールを蒸発した。この溶液を2時間冷却し、生成物を沈殿させた。生成物を真空濾過によって集め、エチルエーテルで洗浄、真空中で乾燥して、塩酸塩1.7g(5.1mmol、89%)を得た。

融点162~164 ; 1H NMR (DMSO- d_6)、 (ppm): 1.36 (s, 8H)、1.53 (m, 4H)、2.71 (六重線, 2H)、3.22 (q, 2H)、3.76 (s, 3H)、6.42 (m, 2H)、7.83 (d, 1H)、7.93~8.11 (s, 3H)、8.77 (t, 1H)、13.12 (bs, 1H)。元素分析: $C_{16}H_{27}N_2O_3Cl$ の計算値: C 58.08、H 8.23、N 8.47; 実測値: C 57.46、H 8.24、N 8.63。

【0059】

化合物18 N-(2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾイル)-1,8-ジアミノオクタン

IUPAC名 N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-2-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアミド

適切な出発原料を用い、化合物11と同じ手順で化合物18を調製した。

融点151~153 ; 1H NMR (DMSO- d_6)、 (ppm): 1.16~1.40 (m, 8H)、1.46 (m, 4H)、2.64 (t, 2H)、3.23 (s, 2H)、3.69 (s, 3H)、6.13 (d, 1H)、6.17 (s, 1H)、7.67 (d, 1H)、10.05 (s, 1H)。KF値 = 0.93%。元素分析: $C_{16}H_{26}N_2O_3 \cdot 0.16H_2O$ の計算値: C 64.67、H 8.86、N 9.43; 実測値: C 64.26、H 8.84、N 9.65。

【0060】

1f 化合物3、6、8および化合物9、10、17のクエン酸塩の調製

N-ヒドロキシスクシミド-0-アセチルサリチレートの合成

10

20

30

40

50

N-ヒドロキシスクシンイミド(12g、104mmol)をDMF(15ml)に溶解した。この溶液を室温でジクロロメタン(150ml)中の塩化O-アセチルサリコイル(20g、101mmol)と混合した。この混合物に攪拌しながらトリエチルアミン(11g、109mmol)を1滴ずつ加えた。反応混合物を2時間攪拌した。混合物を濾過し、不溶性物質を除去した。濾液を集め、溶媒を真空中で蒸発した。生じた油を酢酸エチル200mlに溶解した。残留している固体を濾過によって除去した。濾液を1NのHCl(3×150ml)、ブライン(1×150ml)、4%炭酸水素ナトリウム(3×150ml)、およびブライン(1×150ml)で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。真空蒸発、その後の窒素パージによって酢酸エチルを除去した。N-ヒドロキシスクシンイミド-O-アセチルサリチレート20g(72mmol、72%)を生成した。

【0061】

化合物3 N-(2-ヒドロキシベンゾイル)-N',N'-ジエチレンジアミンモノシトレート
IUPAC名 N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-2-ヒドロキシベンズアミドモノシトレート
適切な出発原料を用い、化合物7と同じ手順で化合物3を調製した。

融点111~113 ;¹HNMR (DMSO-d₆)、 (ppm): 1.17 (t, 6H)、2.59 (q_{ab}, 4H)、3.09 (m, 6H)、3.61 (q, 2H)、6.95 (m, 2H)、7.44 (t, 1H)、7.85 (d, 1H)、9.07 (s, 1H)、10.25 (bs, 2H)。KF値= 0.30%。元素分析: C₁₉H₂₈N₂O₉の計算値: C 53.27、H 6.54、N 6.54; 実測値: C 52.96、H 6.28、N 6.37。

【0062】

2-(2-ヒドロキシベンゾイル)アミノ-5-(N,N-ジエチルアミノ)ペンタンモノシトレート
IUPAC名 N-[5-(ジエチルアミノ)-1-メチルペンチル]-2-ヒドロキシベンズアミドモノシトレート

適切な出発原料を用い、化合物7と同じ手順で2-(2-ヒドロキシベンゾイル)アミノ-5-(N,N-ジエチルアミノ)ペンタンモノシトレートを調製した。

融点62~64 ;¹HNMR (DMSO-d₆)、 (ppm): 1.18 (m, 9H)、1.61 (m, 4H)、2.57 (q_{ab}, 4H)、3.02 (m, 6H)、4.03 (q, 1H)、4.11 (s, 1H)、6.91 (m, 2H)、7.41 (t, 1H)、7.89 (d, 1H)、8.58 (s, 1H)、10.6~11.8 (s, 2H)。元素分析: C₂₂H₃₄N₂O₉の計算値: C 56.17、H 7.23、N 5.96; 実測値: C 55.77、H 7.35、N 5.71。

【0063】

化合物8 N-(2-ヒドロキシベンゾイル)-N',N'-ジ(n-ブチル)-1,3-ジアミノプロパンモノシトレート

IUPAC名 N-{3-[ジブチルアミノ]プロピル}-5-クロロ-2-ヒドロキシベンズアミドモノシトレート

出発原料を除いて、手順は化合物7に記載したものと同一であった。

融点87~89 ;¹HNMR (DMSO-d₆)、 (ppm): 0.89 (t, 6H)、1.30 (六重線, 4H)、1.53 (m, 4H)、1.77 (五重線, 2H)、2.59 (q_{ab}, 4H)、2.84~3.04 (m, 6H)、3.36 (t, 2H)、6.96 (d, 1H)、7.44 (dd, 1H)、7.90 (d, 1H)、8.97 (s, 1H)。元素分析: C₁₉H₂₇N₂O₉Clの計算値: C 54.08、H 6.95、N 5.26; 実測値: C 54.13、H 7.00、N 5.10。

【0064】

化合物9 N-(2-ヒドロキシベンゾイル)-1,12-ジアミノドデカン塩化水素

IUPAC名 N-(12-アミノドデカニル)-2-ヒドロキシベンズアミド塩化水素

適切な出発原料を用い、化合物7と同じ手順で化合物9を調製した。

融点140~142 ;¹HNMR (DMSO-d₆)、 (ppm): 1.21 (s, 16H)、1.53 (m, 4H)、2.72 (六重線, 2H)、3.27 (q, 2H)、6.89 (m, 2H)、7.37 (t, 1H)、7.7.91 (d, 1H)、7.96~8.20 (s, 3H)、8.93 (s, 1H)、12.87 (s, 1H)。元素分析: C₁₉H₃₃N₂O₂Clの計算値: C 63.94、H 9.32、N 7.85、Cl 9.93; 実測値: C 63.33、H 9.45、N、7.28、Cl 10.87。

【0065】

化合物10 10-(2-ヒドロキシベンゾイルアミド)デシルアミン塩化水素

IUPAC名 N-(10-アミノデシル)-2-ヒドロキシベンズアミド塩化水素

適切な出発原料を用い、化合物11と同じ手順で化合物10を調製した。

融点136~138 ;¹HNMR (DMSO-d₆)、 (ppm): 1.24 (s, 12H)、1.51 (m, 4H)、2.71 (t, 50

10

20

30

40

50

2H)、3.26 (q, 2H)、6.87 (m, 2H)、7.37 (t, 1H)、7.88 (d, 1H)、7.89~8.13 (s, 3H)、8.91 (t, 1H)、12.76 (s, 1H)。元素分析: $C_{17}H_{29}N_2O_2Cl$ の計算値: C 62.09、H 8.89、N 8.52; 実測値: C 60.66、H 9.11、N 8.73。

【0066】

化合物17 N-(2-ヒドロキシベンゾイル)-1,9-ジアミノノナン

IUPAC名 N-(8-アミノノニル)-2-ヒドロキシベンズアミド

適切な出発原料を用い、化合物11の遊離アミンの調製と同じ手順で化合物17を調製した。

1H NMR (DMSO- d_6)、(ppm): 1.21~1.42 (m, 12H)、1.51 (m, 2H)、2.60 (t, 2H)、3.27 (t, 2H)、6.63 (t, 1H)、6.70 (d, 1H)、7.22 (t, 1H)、7.78 (d, 1H)、9.80 (s, 1H)。

KF値 = 0.91%。元素分析: $C_{16}H_{26}N_2O_2$ (0.91% H_2O) の計算値: C 68.61、H 9.33、N 9.97; 実測値: C 68.54、H 9.41、N 10.31。 10

【0067】

1g 化合物12の調製

20mlのシンチレーションバイアルに、3,5-ジブromoサリチル酸(1.299g、4.39mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ)-プロピル]-3-エチルカルボジイミド*HCl(0.99g、5.2mmol)、および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.79g、5.8mmol)を充填した。1-(3-アミノプロピル)イミダゾール(476 μ l、3.99mmol)を自動ピペットで添加した。THF(10ml)を添加し、バイアルに蓋をして、60 で一晩オービタルシェーカーに置いた。加熱を止め、バイアルを冷まし室温に戻した。トリスアミン樹脂(200mg、0.85mmol)を添加し、バイアルを4時間オービタルシェーカーに戻した。アンバーリスト-15(2g、9.4mmol)およびアンバーリスト-2 1(2g、9.4mmol)イオン交換樹脂をDCM(5ml)と共にバイアルに加え、樹脂を懸濁した。バイアルを一晩オービタルシェーカーに戻した。反応混合物を濾過し、樹脂をDCM(2 \times 5ml)で洗淨した。合わせた濾液を一晩、窒素流下に置いた。2.3985gの物質を回収した。 20

LC-MC:rt=2.39分、89%、M+H=404

【0068】

1h 化合物13の調製

20mlのシンチレーションバイアルに、3,5-ジクロロサリチル酸(0.9082g、4.39mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド*HCl(0.99g、5.2mmol)、および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.79g、5.8mmol)を充填した。1-(3-アミノプロピル)イミダゾール(476 μ l、3.99mmol)を自動ピペットで添加した。THF(10ml)を添加し、バイアルに蓋をして、60 で一晩オービタルシェーカーに置いた。加熱を止め、バイアルを冷まし室温に戻した。トリスアミン樹脂(200mg、0.85mmol)を添加し、バイアルを4時間オービタルシェーカーに戻した。アンバーリスト-15(2g、9.4mmol)およびアンバーリスト-2 1(2g、9.4mmol)イオン交換樹脂をDCM(5ml)と共にバイアルに加え、樹脂を懸濁した。バイアルを一晩オービタルシェーカーに戻した。反応混合物を濾過し、樹脂をDCM(2 \times 5ml)で洗淨した。合わせた濾液を一晩、窒素流下に置いた。2.0343gの物質を回収した。 30

LC-MC:rt=2.24分、79%、M+H=315

【0069】

1i 化合物14の調製

20mlのシンチレーションバイアルに、3,5-ジヨードサリチル酸(1.700g、4.39mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド*HCl(0.99g、5.2mmol)、および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.79g、5.8mmol)を充填した。1-(3-アミノプロピル)イミダゾール(476 μ l、3.99mmol)を自動ピペットで添加した。THF(10ml)を添加し、バイアルに蓋をして、60 で一晩オービタルシェーカーに置いた。加熱を止め、バイアルを冷まし室温に戻した。トリスアミン樹脂(200mg、0.85mmol)を添加し、バイアルを4時間オービタルシェーカーに戻した。アンバーリスト-15(2g、9.4mmol)およびアンバーリスト-2 1(2g、9.4mmol)イオン交換樹脂をDCM(5ml)と共にバイアルに加え、樹脂を懸濁した。バイアルを一晩オービタルシェーカーに戻した。反応混合物を濾過し、樹脂をDCM(2 \times 5ml)で洗淨した。合わせた濾液を一晩、窒素流下に置いた。2.7305gの物質を回収した。 40

LC-MC:rt=2.62分、84%、M+H=498

【0070】

1j 化合物15の調製

20mlのシンチレーションバイアルに、3,5-ジブromoサリチル酸(1.299g、3.8mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド*HCl(0.84g、4.39mmol)、および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.59g、4.38mmol)を充填した。4-(3-アミノプロピル)モルホリン(506 μ l、3.47mmol)を自動ピペットで添加した。THF(10ml)を添加し、バイアルに蓋をして、60 $^{\circ}$ で一晩オービタルシェーカーに置いた。加熱を止め、バイアルを冷まし室温に戻した。トリスアミン樹脂(200mg、0.85mmol)を添加し、バイアルを4時間オービタルシェーカーに戻した。アンバーリスト-15(2g、9.4mmol)およびアンバーリスト-21(2g、9.4mmol)イオン交換樹脂をDCM(5ml)と共にバイアルに加え、樹脂を懸濁した。バイアルを一晩オービタルシェーカーに戻した。反応混合物を濾過し、樹脂をDCM(2 \times 5ml)で洗浄した。合わせた濾液を一晩、窒素流下に置いた。2.103gの物質を回収した。

10

LC-MC:rt=2.36分、74%、M+H=423

【0071】

1k 化合物16の調製

20mlのシンチレーションバイアルに、3,5-ジクロロサリチル酸(0.786g、3.8mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド*HCl(0.84g、4.39mmol)、および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.59g、4.38mmol)を充填した。4-(3-アミノプロピル)モルホリン(506 μ l、3.47mmol)を自動ピペットで添加した。THF(10ml)を添加し、バイアルに蓋をして、60 $^{\circ}$ で一晩オービタルシェーカーに置いた。加熱を止め、バイアルを冷まし室温に戻した。トリスアミン樹脂(200mg、0.85mmol)を添加し、バイアルを4時間オービタルシェーカーに戻した。アンバーリスト-15(2g、9.4mmol)およびアンバーリスト-21(2g、9.4mmol)イオン交換樹脂をDCM(5ml)と共にバイアルに加え、樹脂を懸濁した。バイアルを一晩オービタルシェーカーに戻した。反応混合物を濾過し、樹脂をDCM(2 \times 5ml)で洗浄した。合わせた濾液を一晩、窒素流下に置いた。1.648gの物質を回収した。

20

LC-MC:rt=2.23分、75%、M+H=334

【0072】

1k 化合物12、13、14、15、16の別の調製

適切な出発原料を用い、化合物7の製造に記載したのと同じ手順で、化合物12、13、14、15、および16を合成した。

30

【実施例2】

【0073】

2A インスリンの経口送達

送達剤化合物およびヒト垂鉛インスリン(最小量26IU/mg、Calbiochem-Novabiochem Corp、La Jolla、CAから入手可能)の経口投与(P0)組成物を、脱イオン水中で調製した。典型的に、送達剤化合物500mgを水1.5mlに添加した。溶液をボルテックスし、次いで加熱し(約37 $^{\circ}$)、超音波処理した。NaOHまたはHClを用いて、pHを約7から8.5に調整した。必要であれば追加のNaOHを加えて均一な溶解性を得て、pHを再び約7から8.5に調整した。次いで水を加えて全容量を約2.4mlとし、ボルテックスした。インスリンストック溶液(15mg/ml、インスリン0.5409gおよび脱イオン水18mlから製造し、濃HCl40ml、10NのNaOH25ml、および1NのNaOH50mlを用いてHClおよびNaOHでpH8.15に調整し、透明な溶液を得た)から約1.25mgのインスリンをその溶液に加え、逆さにして混合した。この溶液はすぐに投与プロトコルに用いることができ、あるいは投与前に1時間37 $^{\circ}$ の水浴に入れることもできる。最終送達剤化合物投与量、インスリン投与量、および容量投与量を以下の表1に示す。

40

【0074】

典型的な投与および試料採取プロトコルは以下のとおりであった。体重約200-250gの雄のSprague-Dawleyラットを24時間絶食させ、投与の15分前にケタミン(44mg/kg)およびクロルプロマジン(1.5mg/kg)を投与し、必要に応じて再投与し麻酔状態を維持した。動物5頭の1つの投与群に、投与溶液の1種を投与した。経口投与のために、11cmのRusch8Frenchカテーテルを、ピペットチップを備えた1mlシリンジに適合させた。カテーテルを通して溶

50

液をくみ上げ、シリンジに投与溶液を充填し、次いでそれを拭き取った。チューピングを切歯から1cm残して、カテーテルを食道に入れた。シリンジプランジャを押し、投与溶液を投与した。

【0075】

典型的に、15、30、60、120、180分の時点で、尾の動脈から血液試料を連続して採取した。本プロトコルで用いる試料の容量および濃度に関する標準曲線の感度および直線範囲を最適化するために標準的なプロトコルを変更し、Insulin ELISA Test Kit(Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TXのKit#DSL-10-1600)を用いて血清インスリン濃度を求めた。血清ヒトインスリン濃度($\mu\text{U/ml}$)を、各投与群の5頭の各動物に関して各時点で測定した。各時点の5つの値を平均し、血清インスリン濃度対時間として結果をプロットした(以前の試験は、ヒトインスリン単独での経口投与後のヒトインスリンの測定可能濃度を示していない)。最大値(ピーク)および曲線下面積(AUC)を以下の表1に示す。

10

【0076】

【表2】

表1 インスリン 経口送達

送達剤化合物	送達剤化合物投与量 (mg/kg)	インスリン 投与量 (mg/kg)	容量投与量 (ml/kg)	血清ピーク平均 [INS]±SD
15	200	0.25	1	60.42±117.16
16	200	0.25	1	61.27±116.59
12	200	0.25	1	83.4±14.69
13	200	0.25	1	76.8±6.80

20

【0077】

2B ビオチン化リボヌクレアーゼA(bRNアーゼA)の経口送達

送達剤化合物およびbRNアーゼA(Sigma(Milwaukee, WI)、ウシ膵臓由来のリボヌクレアーゼA Type XII-A)の経口強制(P0)投与用の脱イオン水溶液を混合によって調製した。この送達剤化合物溶液をリン酸バッファー中で調製し、攪拌した。必要であれば、送達剤化合物が完全に溶解するまで適切な規定度のNaOHを少しずつ添加することによって、混合物のpHを上方に調整した。溶解した送達剤化合物最終pHは、7.5から9.5の間であった。9容量の送達剤化合物溶液を1容量のbRNアーゼAストック溶液(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中bRNアーゼA20mg)と混合することによって、最終投与溶液を調製した。最終濃度は、送達剤化合物150mg/ml、bRNアーゼA2mg/mlであった。

30

【0078】

投与および試料採取プロトコルは以下のとおりであった。体重約200-250gの雄のSprague-Dawleyラットを24時間絶食させ、投与の15分前にケタミン(44mg/kg)およびクロルプロマジン(1.5mg/kg)を投与し、必要に応じて再投与し麻酔状態を維持した。動物5頭の1つの投与群に、以下の方法で投与溶液の1種を投与した。11cmのRusch8Frenchカテーテルを、ペットチップを備えた1mlシリンジに適合させた。カテーテルを通して溶液をくみ上げ、シリンジに投与溶液を充填し、次いでそれを拭き取った。チューピングを切歯から1cm残して、カテーテルを食道に入れた。シリンジプランジャを押し、投与溶液を投与した。15、30、45、60、90分に、尾の動脈から血液試料を連続して採取した。血清bRNアーゼA濃度を以下に記載する変更したイムノアッセイによって定量した。

40

【0079】

リボヌクレアーゼAのビオチン化

各RNアーゼA分子を1つのビオチン分子で標識するために、活性化ビオチンの比率をビオチン3モル/RNアーゼA1モルに維持した。代表的なビオチン化反応において、RNアーゼA500mgを50mMの NaHCO_3 、pH7.6、20mlに溶解した。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC Biotin(Pierce Che

50

mical Company、Rockford、IL)57.08gを溶液に添加、溶解し、氷上に2時間放置した。次いで反応混合物を、4 で一晩、4lのPBSに対して透析した(10000MW分画透析膜(Pierce、Rockford、IL)。反応混合物を新しいPBS4l中に入れ、さらに4時間透析した。透析したbRNAアーゼAを透析膜から除去し、PBSを用いて最終容量25mlに希釈(bRNAアーゼA最終濃度20mg/ml)、4 で保存した。

【0080】

経口投与したbRNAアーゼAの血清濃度のアッセイ

一般に、種々の時点で採取されたラット血清の100 μ l分量を、96ウェルReacti-Bindストレプタビジンコートポリスチレンプレート(Pierce)の適切なウェルに入れた。2時間のインキュベーション期間後、プレートを洗浄し、次いでアルカリホスファターゼにコンジュゲートしたポリクローナルウサギ抗RNAアーゼA(Chemicon、Pittsburgh、PA)と共にインキュベートした。洗浄後、アルカリホスファターゼに複合したポリクローナルウサギ抗ウサギIgG(chemicon、Pittsburg、PA)で2時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、パラニトロフェニルホスフェート(アルカリホスファターゼの基質)(Pierce、Rockford、IL)を添加することによって最初に捕捉したbRNAアーゼAの量を検出する。本来のラット血清に循環するbRNAアーゼAの量は、15の2倍希釈液における1000-0.1ng/mlにわたるbRNAアーゼAの標準曲線との比較によって定量する。最大値 \pm 標準偏差を以下の表2に示す。

10

【0081】

【表3】

20

表2 RNAアーゼの経口送達

送達剤化合物	送達剤化合物 投与量 (mg/kg)	bRNAアーゼ 投与量 (mg/kg)	容量投与量 (ml/kg)	血清ピーク平均 ng/ml
1	150	1	1	2.38 \pm 2.2
3	150	1	1	2.98 \pm 1.66

【0082】

2c BIBN4096BSの経口送達

30

送達化合物およびカルシトニン遺伝子関連ペプチドアンタゴニスト、1-ピペリジンカルボキシアミド.N-[2-[[5-アミノ-1-[[4-(4-ピリジニル)-1-ピペラジニル)カルボニル]ペンチル]アミノ]-1-[(3,5-ジブromo-4-ヒドロキシフェニル)メチル]-2-オキソエチル]-4(1,4-ジヒドロ-2-オキソ-3(2H0-キナゾリニル)-. [R-(R*, S*)]-(BIBN4096BS)の経口強制(P0)投与水溶液を調製した。典型的に、送達剤化合物の溶液を水中で調製し、攪拌した。送達剤化合物をBIBN4096BSストック溶液と混合し、所望の容量(通常は1.0ml)に希釈することによって最終投与溶液を調製した。必要であれば、投与溶液の最終pHが7.0未満になるまで適切な規定度の塩酸水溶液を少しずつ添加することによって、混合物のpHを調節した。投与当たりの最終化合物量は、全容量1ml/kg中、BIBN4096BS25mg/kg、送達剤化合物200mg/kgであった。

40

【0083】

典型的な投与および試料採取プロトコルは以下のとおりであった。体重約200-250gの雄のSprague-Dawleyラットを24時間絶食させ、投与の15分前にケタミン(44mg/kg)およびクロルプロマジン(1.5mg/kg)を投与した。ラット5頭の1つの投与群に、投与溶液の1種を投与した。経口強制(P0)投与のために、11cmのRusch8Frenchカテーテルを、ピペットチップを備えた1mlシリンジに適合させた。カテーテルを通して溶液をくみ上げ、シリンジに投与溶液を充填し、次いでそれを拭き取った。チューピングを切歯から1cm残して、カテーテルを食道に入れた。シリンジプランジャを押して、溶液を投与した。典型的に、経口の0、15、30、45、60分の時点で、尾の動脈から血液試料を連続して採取した。血漿BIBN4096BS濃度は、液体クロマトグラフィ/マススペクトロメトリ/UV検出を用いるマススペクトロ

50

メトリアッセイ法を用いて定量した。このアッセイの標準範囲は5-2000ng/mlであった。以前の研究は、約10ng/mlの基準値を示している。最大値を以下の表3に示す。

【0084】

【表4】

表3 BIBN4096BS経口送達

送達剤化合物	送達剤化合物 投与量 (mg/kg)	BIBN4096BS 投与量(mg/kg)	容量投与量 (ml/kg)	血清ピーク平均 ng/ml
1	200	25	1	28±19
4	200	25	1	23±14
2	200	25	1	453±300*
5	200	25	1	402±608*
13	200	25	1	12±3.6
15	200	25	1	0
16	200	25	1	15±8.1

10

*いくつかの投与溶液はpH≥8.0であった

【0085】

上述の特許、出願、試験法、および文献は、それらの全体を参照により本明細書の一部とする。

20

【0086】

上述の詳細な説明に照らして、当分野の技術者には本発明の多くの変形例が示唆されるであろう。そのような自明の変形例はすべて、添付の請求の範囲の完全に意図された範囲内である。

【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
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/069937 A1

- (51) **International Patent Classification:** **A61K 9/48**,
9/20, 9/14, 38/00, 38/28, A01N 37/18
Emisphere Technologies, Inc., 765 Old Saw Mill River
Road, Tarrytown, NY 10591 (US).
- (21) **International Application Number:** PCT/US02/06610
- (22) **International Filing Date:** 1 March 2002 (01.03.2002)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
60/272,726 1 March 2001 (01.03.2001) US
60/314,783 24 August 2001 (24.08.2001) US
60/523,139 17 September 2001 (17.09.2001) US
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** **EMISPHERE TECHNOLOGIES, INC.** [US/US]; 765 Old Saw Mill Road, Tarrytown, NY 10591 (US).
- (72) **Inventors; and**
(75) **Inventors/Applicants (for US only):** **LIAO, Jun** [CN/US]; c/o Emisphere Technologies, Inc., 765 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591 (US); **GSCHNEIDER, David** [US/US]; c/o Emisphere Technologies, Inc., 765 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591 (US); **WEIDNER, John, J.** [US/US]; c/o Emisphere Technologies, Inc., 765 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591 (US); **WANG, Nai, Fang** [US/US]; c/o
- (74) **Agents:** **LESSLER, Jay, P.** et al.; Darby & Darby P.C., 805 Third Avenue, New York, NY 10022-7513 (US).
- (81) **Designated States (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, 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, 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, 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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, MC, NL, PT, SE, 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 02/069937 A1

(54) **Title:** COMPOUNDS AND COMPOSITIONS FOR DELIVERING ACTIVE AGENTS(57) **Abstract:** Compounds and compositions for the delivery of active agents are provided. Methods of administration and preparation are provided as well.

WO 02/069937

PCT/US02/06610

COMPOUNDS AND COMPOSITIONS FOR DELIVERING ACTIVE AGENTS

5
This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/272,726, filed March 1, 2001; U.S. Provisional Application No. 60/314,783, filed August 24, 2001; and U.S. Provisional Application No. 60/323,139, filed
10 September 17, 2001, all of which are hereby incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to compounds for delivering
15 active agents, such as biologically or chemically active agents, to a target. These compounds are well suited for forming non-covalent mixtures with active agents for oral, intracolonic, pulmonary, and other routes of administration to animals. Methods for the preparation and administration of
20 such compositions are also disclosed.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Conventional means for delivering active agents are often
25 severely limited by biological, chemical, and physical barriers. Typically, these barriers are imposed by the environment through which delivery occurs, the environment of the target for delivery, and/or the target itself. Biologically and chemically active agents are particularly
30 vulnerable to such barriers.

In the delivery to animals of biologically active and chemically active pharmacological and therapeutic agents, barriers are imposed by the body. Examples of physical barriers are the skin, lipid bi-layers and various organ
35 membranes that are relatively impermeable to certain active

WO 02/069937

PCT/US02/06610

agents but must be traversed before reaching a target, such as the circulatory system. Chemical barriers include, but are not limited to, pH variations in the gastrointestinal (GI) tract and degrading enzymes.

5 These barriers are of particular significance in the design of oral delivery systems. Oral delivery of many biologically or chemically active agents would be the route of choice for administration to animals if not for biological, chemical, and physical barriers. Among the numerous agents
10 which are not typically amenable to oral administration are biologically or chemically active peptides, such as calcitonin and insulin; polysaccharides, and in particular mucopolysaccharides including, but not limited to, heparin; heparinoids; antibiotics; and other organic substances. These
15 agents may be rapidly rendered ineffective or destroyed in the gastro-intestinal tract by acid hydrolysis, enzymes, and the like. In addition, the size and structure of macromolecular drugs may prohibit absorption.

 Earlier methods for orally administering vulnerable
20 pharmacological agents have relied on the co-administration of adjuvants (e.g., resorcinols and non-ionic surfactants such as polyoxyethylene oleyl ether and n-hexadecylpolyethylene ether) to increase artificially the permeability of the intestinal walls, as well as the co-administration of enzymatic
25 inhibitors (e.g., pancreatic trypsin inhibitors, diisopropylfluorophosphate (DPF) and trasylol) to inhibit enzymatic degradation. Liposomes have also been described as drug delivery systems for insulin and heparin. However, broad spectrum use of such drug delivery systems is precluded
30 because: (1) the systems require toxic amounts of adjuvants or inhibitors; (2) suitable low molecular weight cargos, i.e. active agents, are not available; (3) the systems exhibit poor stability and inadequate shelf life; (4) the systems are

WO 02/069937

PCT/US02/06610

difficult to manufacture; (5) the systems fail to protect the active agent (cargo); (6) the systems adversely alter the active agent; or (7) the systems fail to allow or promote absorption of the active agent.

5 Proteinoid microspheres have been used to deliver pharmaceuticals. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,401,516; 5,443,841; and Re. 35,862. In addition, certain modified amino acids have been used to deliver pharmaceuticals. See, for example, U.S. Patent Nos. 10 5,629,020; 5,643,957; 5,766,633; 5,776,888; and 5,866,536.

More recently, a polymer has been conjugated to a modified amino acid or a derivative thereof via a linkage group to provide for polymeric delivery agents. The modified polymer may be any polymer, but preferred polymers include, 15 but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), and derivatives thereof. See, for example, International Patent Publication No. WO 00/40203.

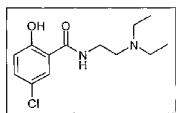
However, there is still a need for simple, inexpensive delivery systems which are easily prepared and which can 20 deliver a broad range of active agents by various routes.

SUMMARY OF THE INVENTION

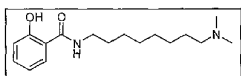
The present invention provides compounds and compositions 25 which facilitate the delivery of active agents. Delivery agent compounds of the present invention include those having the following formulas:

WO 02/069937

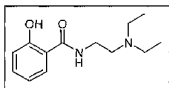
PCT/US02/06610



Compound 1

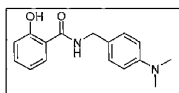


Compound 2

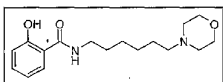


5

Compound 3



Compound 4

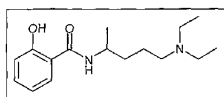


Compound 5

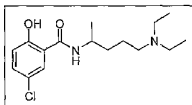
10

WO 02/069937

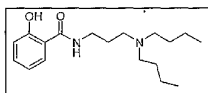
PCT/US02/06610



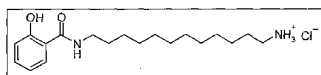
Compound 6



Compound 7

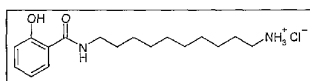


Compound 8



5

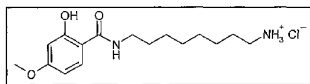
Compound 9



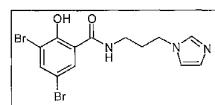
Compound 10

WO 02/069937

PCT/US02/06610

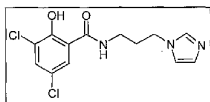


Compound 11

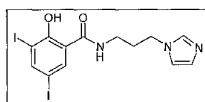


Compound 12

5

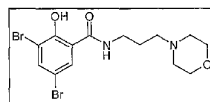


Compound 13



Compound 14

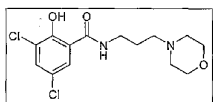
10



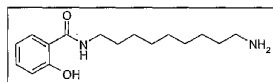
Compound 15

WO 02/069937

PCT/US02/06610

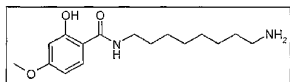


Compound 16



Compound 17

5



Compound 18

and salts thereof. Mixtures of these delivery agent compounds may also be used to facilitate the delivery of active agents.

10

The invention also provides a composition comprising at least one of the delivery agent compounds of the formulas above, and at least one active agent. These compositions deliver active agents to selected biological systems in increased or improved bioavailability of the active agent compared to administration of the active agent without the delivery agent compound.

Also provided are dosage unit forms comprising the compositions. The dosage unit may be in the form of a liquid or a solid, such as a tablet, capsule or particle, including a powder or sachet.

20

Another embodiment is a method for administering an

WO 02/069937

PCT/US02/06610

active agent to an animal in need of the active agent, by administering a composition comprising at least one of the delivery agent compounds of the formula above and the active agent to the animal. Preferred routes of administration include the oral, intracolonic and pulmonary routes.

Yet another embodiment is a method of treating a disease or for achieving a desired physiological effect in an animal by administering the composition of the present invention.

Yet another embodiment is a method of preparing a composition of the present invention by mixing at least one delivery agent compound of the formula above, and at least one active agent.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Delivery Agent Compounds

The terms "alkyl" and "alkenyl" as used herein include linear and branched alkyl and alkenyl substituents, respectively.

The delivery agent compounds may be in the form of the free base or salts thereof. Suitable salts include, but are not limited to, organic and inorganic salts, for example, hydrochloride, ammonium, acetate, citrate, halide, hydroxide, sulfate, nitrate, phosphate, alkoxy, perchlorate, tetrafluoroborate, carboxylate, mesylate, fumarate, malonate, succinate, tartrate, acetate, gluconate, and maleate salts. The salts may also be solvates, including ethanol solvates, and hydrates. The mesylate salt can be formed by reacting the free base of the delivery agent compound with methanesulfonic acid.

Salts of the delivery agent compounds of the present invention may be prepared by methods known in the art. For

WO 02/069937

PCT/US02/06610

example, citrate salts may be prepared in ethanol, toluene and citric acid. The salts may also be solvates, including ethanol solvates, and hydrates.

The delivery agent compound may be purified by
 5 recrystallization or by fractionation on one or more solid chromatographic supports, alone or linked in tandem. Suitable recrystallization solvent systems include, but are not limited to, ethanol, water, heptane, ethyl acetate, acetonitrile, methanol, and tetrahydrofuran (THF) and mixtures thereof.
 10 Fractionation may be performed on a suitable chromatographic support such as alumina, using methanol/n-propanol mixtures as the mobile phase; reverse phase chromatography using trifluoroacetic acid/acetonitrile mixtures as the mobile phase; and ion exchange chromatography using water or an appropriate buffer as the mobile phase. When anion exchange chromatography is performed, preferably a 0-500 mM sodium chloride gradient is employed.

The delivery agent may contain a polymer conjugated to it by a linkage group selected from the group consisting of -
 20 NHC(O)NH-, -C(O)NH-, -NHC(O), -OOC-, -COO-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH-, -CH₂NH -NHCH₂-, -CH₂NHC(O)O-, -OC(O)NHCH₂-, -CH₂NHCOCH₂O-, -OCH₂C(O)NHCH₂-, -NHC(O)CH₂O-, -OCH₂C(O)NH-, -NH-, -O-, and carbon-carbon bond, with the proviso that the polymeric delivery agent is not a polypeptide or polyamino
 25 acid. The polymer may be any polymer including, but not limited to, alternating copolymers, block copolymers and random copolymers, which are safe for use in mammals. Preferred polymers include, but are not limited to, polyethylene; polyacrylates; polymethacrylates;
 30 poly(oxyethylene); poly(propylene); polypropylene glycol; polyethylene glycol (PEG); and derivatives thereof and combinations thereof. The molecular weight of the polymer typically ranges from about 100 to about 200,000 daltons. The

WO 02/069937

PCT/US02/06610

molecular weight of the polymer preferably ranges from about 200 to about 10,000 daltons. In one embodiment, the molecular weight of the polymer ranges from about 200 to about 600 daltons and more preferably ranges from about 300 to about 550 daltons.

Active Agents

Active agents suitable for use in the present invention include biologically active agents and chemically active agents, including, but not limited to, pesticides, pharmacological agents, and therapeutic agents. Suitable active agents include those that are rendered less effective, ineffective or are destroyed in the gastro-intestinal tract by acid hydrolysis, enzymes and the like. Also included as suitable active agents are those macromolecular agents whose physicochemical characteristics, such as, size, structure or charge, prohibit or impede absorption when dosed orally.

For example, biologically or chemically active agents suitable for use in the present invention include, but are not limited to, proteins; polypeptides; peptides; hormones; polysaccharides, and particularly mixtures of mucopolysaccharides; carbohydrates; lipids; small polar organic molecules (i.e. polar organic molecules having a molecular weight of 500 daltons or less); other organic compounds; and particularly compounds which by themselves do not pass (or which pass only a fraction of the administered dose) through the gastro-intestinal mucosa and/or are susceptible to chemical cleavage by acids and enzymes in the gastro-intestinal tract; or any combination thereof.

Further examples include, but are not limited to, the following, including synthetic, natural or recombinant sources thereof: growth hormones, including human growth hormones (hGH), recombinant human growth hormones (rhGH), bovine growth

WO 02/069937

PCT/US02/06610

hormones, and porcine growth hormones; growth hormone releasing hormones; growth hormone releasing factor, interferons, including α , β and γ ; interleukin-1; interleukin-2; insulin, including porcine, bovine, human, and human recombinant, optionally having counter ions including zinc, sodium, calcium and ammonium; insulin-like growth factor, including IGF-1; heparin, including unfractionated heparin, heparinoids, dermatans, chondroitins, low molecular weight heparin, very low molecular weight heparin and ultra low molecular weight heparin; calcitonin, including salmon, eel, porcine and human; erythropoietin; atrial natriuretic factor; antigens; monoclonal antibodies; somatostatin; protease inhibitors; adrenocorticotropin, gonadotropin releasing hormone; oxytocin; luteinizing-hormone-releasing-hormone; follicle stimulating hormone; glucocerebrosidase; thrombopoietin; filgrastim; prostaglandins; cyclosporin; vasopressin; cromolyn sodium (sodium or disodium chromoglycate); vancomycin; desferrioxamine (DFO); bisphosphonates, including alendronate, tiludronate, etidronate, clodronate, pamidronate, olpadronate, and incadronate; parathyroid hormone (PTH), including its fragments; anti-migraine agents such as BIBN-4096BS and other calcitonin gene-related proteins antagonists; antimicrobials, including antibiotics, anti-bacterials and anti-fungal agents; vitamins; analogs, fragments, mimetics or polyethylene glycol (PEG)-modified derivatives of these compounds; or any combination thereof. Non-limiting examples of antibiotics include gram-positive acting, bacteriocidal, lipopeptidal and cyclic peptidal antibiotics, such as daptomycin and analogs thereof.

WO 02/069937

PCT/US02/06610

Delivery systems

The composition of the present invention comprises one or more delivery agent compounds of the present invention, and one or more active agents. In one embodiment, one or more of the delivery agent compounds, or salts of these compounds, or poly amino acids or peptides of which these compounds or salts form one or more of the units thereof, may be used as a delivery agent by mixing with the active agent prior to administration to form an administration composition.

The administration compositions may be in the form of a liquid. The solution medium may be water (for example, for salmon calcitonin, parathyroid hormone, and erythropoietin), 25% aqueous propylene glycol (for example, for heparin) and phosphate buffer (for example, for rhGH). Other dosing vehicles include polyethylene glycol. Dosing solutions may be prepared by mixing a solution of the delivery agent compound with a solution of the active agent, just prior to administration. Alternately, a solution of the delivery agent compound (or active agent) may be mixed with the solid form of the active agent (or delivery agent compound). The delivery agent compound and the active agent may also be mixed as dry powders. The delivery agent compound and the active agent can also be admixed during the manufacturing process.

The dosing solutions may optionally contain additives such as phosphate buffer salts, citric acid, glycols, or other dispersing agents. Stabilizing additives may be incorporated into the solution, preferably at a concentration ranging between about 0.1 and 20% (w/v).

In one embodiment, dosing solution containing BIBN-4096BS have a pH of less than 8. According to another embodiment, dosing solutions containing BIBN-4096BS have a pH of less than 7.

The administration compositions may alternately be in the

WO 02/069937

PCT/US02/06610

form of a solid, such as a tablet, capsule or particle, such as a powder or sachet. Solid dosage forms may be prepared by mixing the solid form of the compound with the solid form of the active agent. Alternately, a solid may be obtained from a solution of compound and active agent by methods known in the art, such as freeze-drying (lyophilization), precipitation, crystallization and solid dispersion.

The administration compositions of the present invention may also include one or more enzyme inhibitors. Such enzyme inhibitors include, but are not limited to, compounds such as actinonin or epiactinonin and derivatives thereof. Other enzyme inhibitors include, but are not limited to, aprotinin (Trasylo) and Bowman-Birk inhibitor.

The amount of active agent used in an administration composition of the present invention is an amount effective to accomplish the purpose of the particular active agent for the target indication. The amount of active agent in the compositions typically is a pharmacologically, biologically, therapeutically, or chemically effective amount. However, the amount can be less than that amount when the composition is used in a dosage unit form because the dosage unit form may contain a plurality of delivery agent compound/active agent compositions or may contain a divided pharmacologically, biologically, therapeutically, or chemically effective amount. The total effective amount can then be administered in cumulative units containing, in total, an effective amount of the active agent.

The total amount of active agent to be used can be determined by methods known to those skilled in the art. However, because the compositions of the invention may deliver active agents more efficiently than compositions containing the active agent alone, lower amounts of biologically or chemically active agents than those used in prior dosage unit

WO 02/069937

PCT/US02/06610

forms or delivery systems can be administered to the subject, while still achieving the same blood levels and/or therapeutic effects.

The presently disclosed delivery agent compounds facilitate the delivery of biologically and chemically active agents, particularly in oral, intranasal, sublingual, intraduodenal, subcutaneous, buccal, intracolonic, rectal, vaginal, mucosal, pulmonary, transdermal, intradermal, parenteral, intravenous, intramuscular and ocular systems, as well as traversing the blood-brain barrier.

Dosage unit forms can also include any one or combination of excipients, diluents, disintegrants, lubricants, plasticizers, colorants, flavorants, taste-masking agents, sugars, sweeteners, salts, and dosing vehicles, including, but not limited to, water, 1,2-propane diol, ethanol, olive oil, or any combination thereof.

The compounds and compositions of the subject invention are useful for administering biologically or chemically active agents to any animals, including but not limited to birds such as chickens; mammals, such as rodents, cows, pigs, dogs, cats, primates, and particularly humans; and insects.

The system is particularly advantageous for delivering chemically or biologically active agents that would otherwise be destroyed or rendered less effective by conditions encountered before the active agent reaches its target zone (i.e. the area in which the active agent of the delivery composition is to be released) and within the body of the animal to which they are administered. Particularly, the compounds and compositions of the present invention are useful in orally administering active agents, especially those that are not ordinarily orally deliverable, or those for which improved delivery is desired.

The compositions comprising the compounds and active

WO 02/069937

PCT/US02/06610

agents have utility in the delivery of active agents to selected biological systems and in an increased or improved bioavailability of the active agent compared to administration of the active agent without the delivery agent. Delivery can be improved by delivering more active agent over a period of time, or in delivering active agent in a particular time period (such as to effect quicker or delayed delivery), or in delivering the active agent at a specific time, or over a period of time (such as sustained delivery).

Another embodiment of the present invention is a method for the treatment or prevention of a disease or for achieving a desired physiological effect, such as those listed in the table below, in an animal by administering the composition of the present invention. Specific indications for active agents can be found in the Physicians' Desk Reference (54th Ed., 2000, Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ), which is herein incorporated by reference. The active agents in the table below include their analogs, fragments, mimetics, and polyethylene glycol-modified derivatives.

Active Agent	Disease and Physiological Effect
Growth hormones	Growth disorders
Interferons, including α , β and γ .	Viral infection, including chronic cancer and multiple sclerosis
Interleukin-1; interleukin-2.	Viral infection; cancer
Insulin; Insulin-like growth factor IGF-1.	Diabetes
Heparin	Thrombosis; prevention of blood coagulation
Calcitonin.	Osteoporosis; diseases of the bone
Erythropoietin	Anemia
Atrial natriuretic factor	Vasodilation
Antigens	Infection
Monoclonal antibodies	To prevent graft rejection; cancer
Somatostatin	Bleeding ulcer; erosive gastritis
Protease inhibitors	AIDS

WO 02/069937

PCT/US02/06610

Active Agent	Disease and Physiological Effect
Adrenocorticotropin	High cholesterol (to lower cholesterol)
Gonadotropin releasing hormone	Ovulatory dysfunction (to stimulate ovulation)
Oxytocin	Labor dysfunction (to stimulate contractions)
Leutinizing-hormone-releasing-hormone; follicle stimulating hormone	Regulate reproductive function
Glucocerebrosidase	Gaucher disease (to metabolize lipoprotein)
Thrombopoietin	Thrombocytopenia
Filgrastim	Reduce infection in chemotherapy patients
Prostaglandins	Hypertension
Cyclosporin	Transplant rejection
Vasopressin	Bed-wetting; antidiuretic
Cromolyn sodium; Vancomycin	Asthma; allergies
Desferrioxamine (DFO)	Iron overload
Parathyroid hormone (PTH), including its fragments.	Osteoporosis; Diseases of the bone
Antimicrobials	Infection including gram-positive bacterial infection
Vitamins	Vitamin deficiencies
Bisphosphonates	Osteoporosis; Paget's disease; Inhibits osteoclasts
EBN4096BS - (1-Piperidinecarboxamide, N-[2-[[5-amino-1-[[4-(4-pyridinyl)-1-piperazinyl]carbonyl]pentyl]amino]-1-[(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxoethyl]-4(1,4-dihydro-2-oxo-3(2H)-quinazoliny)]-. [R-(R*,S*)]-)	Anti-migraine; calcitonin gene-related peptide antagonist

For example, one embodiment of the present invention is a method for treating a patient suffering from or susceptible to diabetes by administering insulin and at least one of the delivery agent compounds of the present invention.

Following administration, the active agent present in the composition or dosage unit form is taken up into the circulation. The bioavailability of the agent is readily assessed by measuring a known pharmacological activity in blood, e.g. an increase in blood clotting time caused by

WO 02/069937

PCT/US02/06610

heparin, or a decrease in circulating calcium levels caused by calcitonin. Alternately, the circulating levels of the active agent itself can be measured directly.

5 **DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS**

The following examples illustrate the invention without limitation. All parts are given by weight unless otherwise indicated.

10 Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) analyses for the compounds listed below were conducted on a 300 MHz Bruker spectrometer using dimethyl sulfoxide (DMSO-d₆) as the solvent unless otherwise indicated.

Liquid chromatograph/mass spectrometry (LC-MS) analyses were performed with an Agilent Technologies, LC/MSD 1100 (single quad) having the following parameters:

15 Mobile Phase A: 50:950:5 acetonitrile:water:acetic acid (v/v/v)

Mobile Phase B: 950:50:5 acetonitrile:water:acetic acid (v/v/v)

20 Gradient Elution: 4 minute linear gradient 0-100% B; total time per injection is 11 minutes

Injection volume: 5uL

Column: ZORBAX Rapid Resolution Cartridge, SB-C18, 2.1 x 30 mm, 3.5 um

25 Particle size, catalog # 873700-902

Column temp: 40° C

UV detection at 244 nm

MSD parameters:

Source: API-ES, positive polarity

30 Scan Parameters:

Mass Range: 125.00-600.00

Fragmentor: 60 V

Gain: 1.0 EMV

WO 02/069937

PCT/US02/06610

Threshold: 150
Spray Chamber:
Gas Temp. 350 deg. D
Drying Gas: 12.0 l/min
5 Neb. Pressure; 40 psig
VCap 4000V positive/negative

10 Example 1: Preparation of Compounds

10 1a: Preparation of Compound 2

A solution of 40% dimethylamine/water (30 mL, 26.9 g, 239 mmol) and ethanol (50 mL) was treated with a solution of 8-bromo-1-octanol (15.13 g, 72.3 mmol) and ethanol (20 mL),
15 added dropwise over 10 minutes. The reaction mixture was stirred for 75 hours, diluted with ethyl acetate (80 mL) and washed with saturated sodium bicarbonate solution. The aqueous phase was extracted with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with saturated sodium bicarbonate
20 solution (50 mL) and brine (2 x 40 mL), dried over sodium sulfate, and concentrated. The 11.4 g of 8-dimethylamino-1-octanol, isolated as a yellow oil, was used as is.

A slurry of carsalam (10.80 g, 66.2 mmol), 8-dimethylamino-1-octanol (11.4 g, 65.8 mmol),
25 triphenylphosphine (17.53 g, 66.8 mmol) and tetrahydrofuran (40 mL) was treated with a solution of diisopropyl azodicarboxylate (13.0 mL, 13.35 g, 66.0 mmol) and tetrahydrofuran (20 mL), added dropwise over 25 minutes causing the temperature to rise to 50° C. The reaction mixture
30 was allowed to cool back to 25° C and stirred for 40 hours. The solution was treated with aqueous 2N NaOH (70 mL, 140 mmol) and warmed to 60° C for 180 minutes. The cooled reaction mixture was washed with ethyl acetate (2 x 50 mL). The aqueous phase was acidified with 4% aqueous HCl to a pH

WO 02/069937

PCT/US02/06610

slightly less than 0 and was washed with ethyl acetate (2 x 40 mL). The pH of the aqueous phase was raised to 9.5 upon treatment with solid sodium bicarbonate. The aqueous phase was extracted with methylene chloride (10 x 40 mL). The combined methylene chloride extracts were dried over sodium sulfate and concentrated to give 0.6 g of product. The rest of the product was found in the earlier ethyl acetate extracts. These ethyl acetate layers were extracted with 1N aqueous NaOH (4 x 30 mL). These 4 aqueous phases were combined, acidified to pH 0.7 with 4% aqueous HCl, and washed with ethyl acetate (2 x 30 mL). The pH of the aqueous solution was adjusted to 5 with aqueous 2N NaOH. The solution was treated with solid sodium bicarbonate until no more bubbling occurred and was extracted with ethyl acetate (6 x 50 mL). The combined ethyl acetate layers were dried over sodium sulfate and concentrated to a solid. The solid was taken up into a tetrahydrofuran and treated with HCl gas. Water was added causing a solid to precipitate out of solution. A total of 4.73 g of *N*-(8-dimethylamino-octyl)salicylamide hydrochloride was isolated by filtration.

m.p. 78-80° C; ¹H NMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 10.5 (bs, 1H), 8.9 (t, 1H), 7.9 (dd, 1H), 7.4 (td, 1H), 6.9 (m, 2H), 3.3 (q, 2H), 3.0 (m, 2H), 2.7 (s, 6H), 1.6 (t, 4H), 1.3 (m, 8H). KF value = 5.19% water. Elemental analysis: %C: 58.86 (calculated), 58.87 (found); %H: 9.01 (calculated), 8.98 (found); %N: 8.08 (calculated), 7.98 (found).

1b: Preparation of Compound 4

A one-neck, 250 mL round bottomed flask was charged with 4-(dimethylamino)benzylamine dihydrochloride (8.0 g, 0.0358 mol) and 50 mL of methylene chloride. The stirred solution was chilled in an ice bath. Triethylamine (20.0 mL, 0.1432 mol) and a catalytic amount of 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) were added to the reaction mixture. A solution of acetylsalicyloyl chloride (7.12 g, 0.1432 mol) in methylene

WO 02/069937

PCT/US02/06610

chloride (30 mL) was added to the chilled reaction flask. After the addition was complete, the reaction mixture was warmed to room temperature and was allowed to stir overnight.

5 The reaction mixture was diluted with 2N HCl, and the layers were separated. The organic phase was washed with water, dried over sodium sulfate, and concentrated *in vacuo*. The resulting oil was stirred in 2N NaOH for 4 hours, and washed with ethyl acetate. The aqueous phase was concentrated
10 in *vacuo* to remove any residual ethyl acetate. The pH of the aqueous phase was adjusted to 7, and the resulting solids were collected by vacuum filtration. The weight of the crude solids was 1.76 g. The reaction was repeated to give an additional 0.98 g of crude product. The combined solids were
15 recrystallized from ethanol/water to give 2.64 g of *N*-(4-dimethylaminobenzyl) salicylamide as a white solid.

m.p. 129-132° C; ¹H NMR(d₆-DMSO), δ(ppm): 9.3 (s, 1H), 7.87 (dd, 1H), 7.39 (dt, 1H), 7.16 (d, 2H), 6.87 (t, 2H), 6.69 (d, 2H), 4.38 (d, 2H), 2.86 (s, 6H). Elemental analysis: %C: 71.09 (calc.), 70.84 (found); %H: 6.71 (calc.), 6.50 (found); %N: 10.36 (calc.), 10.14 (found).

25 **1c: Preparation of Compound 5**

A suspension of morpholine (3.30 mL, 3.30 g, 37.8 mmol), 6-bromo-1-hexanol (6.72 g, 72.3 mmol), ethanol (20 mL), and potassium carbonate (6.23 g, 45.1 mmol) was stirred for 36 hours at 25° C, after a slight exotherm at the beginning. The
30 reaction mixture was diluted with ethyl acetate (30 mL), filtered and concentrated. The residue was taken up in ethyl acetate, filtered and concentrated. The 7.0 g of 4-(6-hydroxyhexyl)morpholine was isolated as a yellow oil and used as is.

35 A slurry of carsalam (6.13 g, 37.6 mmol), 4-(6-

WO 02/069937

PCT/US02/06610

hydroxyhexyl)morpholine (7.6 g, 37.4 mmol), triphenylphosphine (9.97 g, 35.0 mmol), and tetrahydrofuran (40 mL) was treated with a solution of diisopropyl azodicarboxylate (7.40 mL, 7.60 g, 37.6 mmol) and tetrahydrofuran (10 mL), added dropwise over 5 15 minutes. The reaction mixture was stirred at 25° C for 60 hours. The solution was treated with aqueous 2N NaOH (50 mL, 100 mmol) and warmed to 60° C for 180 minutes. The cooled reaction mixture was concentrated to remove the tetrahydrofuran. The aqueous residue was washed with ethyl acetate (2 x 40 mL), and was acidified with 4% aqueous HCl to 10 a pH of 0.84 (causing carbon dioxide gas to evolve). The pH of the aqueous phase was raised to 7.8 with 2N aqueous NaOH. Solid sodium bicarbonate was added. Extraction with ethyl acetate (8 x 40 mL), drying over sodium sulfate and 15 concentration gave an oil which solidified upon standing. A total of 4.26 g of 4-(6-morpholin-4-ylhexyl)-salicylamide was isolated.

m.p. 70-73° C; ¹H NMR(d₆-DMSO), δ(ppm): 8.8 (t, 1H), 7.8 (dd, 1H), 7.4 (td, 1H), 6.9 (m, 2H), 3.5 (t, 4H), 3.3 (q, 2H), 2.3 (t, 4H), 2.2, (t, 2H), 1.5 (t, 2H), 1.3-1.4 (m, 6H). KF value = 5.39 % water. Elemental analysis: %C: 63.05 (calculated), 63.06 (found); %H: 8.70 (calculated), 8.53 (found); %N: 8.65 (calculated), 8.73 (found).

25 **1d: Preparation of the Citrate Salts of Compounds 1,7**

Synthesis of N-Hydroxysuccimide-O-acetyl-5-chlorosalicylate

30 5-Chlorosalicylic acid (17.3 g, 100 mmol) and three drops of concentrated sulfuric acid (98%) were added to a solution of acetic anhydride (14 g, 137 mmol) and glacial acetic acid (16.4 g, 274 mmol) with stirring. The reaction mixture was slowly heated to 70 °C and stirred for 2 hours. The reaction 35 mixture was cooled to room temperature and was gradually added to ice water (500 mL) to precipitate the acetylated product.

WO 02/069937

PCT/US02/06610

These solids were collected and washed with water. The two batches of product were combined and recrystallized in ethyl acetate. The pure crystals were collected via vacuum filtration to give 16.3 g of *O*-acetyl-5-chlorosalicylic acid (76 mmol, 76% yield).

Elemental analysis calculated for C₉H₇O₄Cl: C 50.37%, H 3.29%, N 0.0%; Found: C 50.36%, H 3.20%, N <0.02%.

N-Hydroxysuccinimide (8.6g, 82 mmol) was dissolved in dimethyl formamide (DMF) (8 mL). This solution was mixed with *O*-Acetyl-5-chlorosalicylic acid (16 g, 74.6 mmol) in dichloromethane (DCM) (150 mL) at room temp. This mixture was stirred in a water bath. 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (17 g, 82 mmol) was dissolved in dichloromethane (55 mL) and was gradually added to the mixture. The reaction equilibrated to room temperature and stirred for 24 hours. The mixture was cooled to -10° C and was filtered to remove any solids. The filtrate was diluted with dichloromethane (100 mL). The solution was washed with 1N HCl (2 x 200 mL), brine (2 x 200 mL), 5% sodium bicarbonate (2 x 200mL) and brine (2 x 200 mL). The dichloromethane layer was dried over anhydrous sodium sulfate. The solvent was evaporated *in vacuo*. The product was collected to give 22.5 g (72 mmol, 97%).

25 **Compound 7: 2-(5-chloro-2-hydroxybenzoyl)amino-5-(*N,N'*-diethylamino)pentane mono-citrate**
IUPAC name: *N*-[5-(diethylamino)-1-methylpentyl]-5-chloro-2-hydroxybenzamide mono-citrate

30 N-Hydroxysuccinimide-*O*-acetyl-5-chlorosalicylate obtained above (3.1 g, 10 mmol) was dissolved in dichloromethane (15 mL). This solution was slowly added to 2-amino-5-diethylaminopentane (3.2 g, 20 mmol) in dichloromethane (35 mL) with stirring. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. HPLC indicated the completion of the

WO 02/069937

PCT/US02/06610

reaction. The reaction mixture was washed with 5% sodium bicarbonate (3 x 100 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate. The dichloromethane evaporated *in vacuo* to give the free tertiary amine product (2.3 g, 7.4 mmol, 74%).

The above obtained 2-(5-chloro-2-hydroxybenzoylamino)-5-(N,N-diethylamino)pentane (2.3 g, 7.4 mmol) and citric acid (1.4 g, 7.4 mmol) were dissolved in anhydrous ethyl alcohol (8 mL). Diethylether (~30 mL) was added to this solution until the solution became cloudy. The cloudy solution was refrigerated overnight to precipitate the citric acid salt. The final product, 2-(5-chloro-2-hydroxybenzoylamino)-5-(N,N-diethylamino)pentane mono-citrate, was collected *via* vacuum filtration and dried under nitrogen flow to give 2.0 g (4.0 mmol, 54%).

m.p. 57-59° C; ¹HNMR (DMSO-d₆) δ(ppm): 1.18 (m, 9H), 1.60 (m, 4H), 2.57 (q_{ab}, 4H), 3.08 (m, 6H), 4.04 (q, 1H), 4.11 (s, 1H), 6.98 (d, 1H), 7.47 (dd, 1H), 8.01 (d, 1H), 8.70 (s, 1H). KF value = 0.59%. Elemental analysis for calculated C₂₂H₂₇N₂O₉Cl: C 52.33, H 6.54, N 5.55. Found: C 52.21, H 6.79, N 5.20.

Compound 1: N-(5-chloro-2-hydroxybenzoyl)-N',N'-diethylenediamine mono-citrate
IUPAC name: N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-chloro-2-hydroxybenzamide mono-citrate

Compound 1 was prepared by the same procedure as for compound 7 with the appropriate starting materials.

m.p. 107-109° C; ¹HNMR (DMSO-d₆) δ(ppm): 1.16 (t, 6H), 2.61 (q_{ab}, 4H), 3.09 (m, 6H), 3.59 (s, 2H), 6.98 (d, 1H), 7.44 (dd, 1H), 7.88 (d, 1H), 9.09 (s, 1H), 9.95-11.20 (s, 3H). Elemental analysis for calculated C₁₉H₂₇N₂O₉Cl: C 49.30, H 5.84, N 6.05; found: C 49.30, H 5.78, N 5.94.

1e: Preparation of Compound 11,18

Synthesis of N-Hydroxysuccinimide-O-acetyl-4-methoxysalicylate

WO 02/069937

PCT/US02/06610

N-hydroxysuccinimide-O-acetyl-4-methoxysalicylate was prepared by the same procedure as for N-hydroxy-O-acetyl-5-chlorosalicylate with the appropriate starting materials.

5

Compound 11: 8-(2-hydroxy-4-methoxybenzoylamido) octylamine hydrogen chloride

IUPAC name: N-(8-aminooctyl)-2-hydroxy-4-methoxybenzamide hydrogen chloride

10

N-hydroxysuccinimide-O-acetyl-4-methoxysalicylate as obtained above (13 g, 42.3 mmol) was dissolved in dichloromethane (70 mL) and added dropwise to a solution of 1,8-diaminooctane (13 g, 90 mmol) in dichloromethane (230 mL) in a water bath with stirring. The reaction was stirred overnight. The product precipitated out of solution and was collected via vacuum filtration. The precipitates were washed with dichloromethane and were air-dried to give 9.0 g of crude product. The precipitates were washed with water (50 mL) and extracted with 0.1N HCl aqueous solution (50 mL) for 0.5 hours with stirring. The acidic aqueous solution was filtered to remove insoluble material. The filtrate was washed with ethyl ether (150 mL) and was adjusted to pH 10. Precipitation occurred immediately. The mixture was allowed to stand at room temperature over night. The precipitate was collected by filtration and air-dried to yield 2.6 g (8.8 mmol, 21%).

15

The free primary amine obtained above (1.7 g, 5.8 mmol) was suspended in 20 mL of anhydrous ethyl alcohol. HCl gas was bubbled into this mixture for 10 minutes to obtain a clear solution. Nitrogen gas was bubbled through this solution to purge the excess HCl and to evaporate the ethyl alcohol until the volume of the solution was 10 mL. This solution was refrigerated for 2 hours to precipitate the product. The product was collected via vacuum filtration, was washed with ethyl ether and dried in vacuo to give 1.7 g of the

20

25

30

35

WO 02/069937

PCT/US02/06610

hydrochloric salt (5.1 mmol, 89%).

5 m.p. 162-164° C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.36 (s, 8H), 1.53 (m, 4H), 2.71 (sex, 2H), 3.22 (q, 2H), 3.76 (s, 3H), 6.42 (m, 2H), 7.83 (d, 1H), 7.93-8.11 (s, 3H), 8.77 (t, 1H), 13.12 (bs, 1H). Elemental analysis for calculated C₁₆H₂₇N₂O₃Cl: C 58.08, H 8.23, N 8.47; found: C 57.46, H 8.24, N 8.63.

10 **Compound 18: N-(2-hydroxy-4-methoxybenzoyl)-1,8-diaminooctane**
IUPAC name: N-[2-(diethylamino)ethyl]-2-hydroxy-4-methoxybenzamide

15 Compound 18 was prepared by the same procedure as for compound 11 with the appropriate starting materials.

20 m.p. 151-153° C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.16-1.40 (m, 8H), 1.46 (m, 4H), 2.64 (t, 2H), 3.23 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 6.13 (d, 1H), 6.17 (s, 1H), 7.67 (d, 1H), 10.05 (s, 1H). KF value = 0.93%. Elemental analysis for calculated C₁₆H₂₆N₂O₃*0.16H₂O: C 64.67, H 8.86, N 9.43; found: C 64.26, H 8.84, N 9.65.

25 **1f: Preparation of Citrate Salts of Compounds 3,6,8 and Compounds 9,10,17**

Synthesis of N-Hydroxysuccinimide-O-acetylsalicylate

30 N-Hydroxysuccinimide (12 g, 104 mmol) was dissolved in DMF (15 mL). This solution was mixed with O-acetylsalicyloyl chloride (20 g, 101 mmol) in dichloromethane (150 mL) at room temperature. Triethylamine (11 g, 109 mmol) was added dropwise to this mixture with stirring. The reaction mixture was stirred for 2 hours. The mixture was filtered to remove
35 any insoluble material. The filtrate was collected and the solvents were evaporated in vacuo. The resulting oil was dissolved in 200 mL of ethyl acetate. Any remaining solids were removed by filtration. The filtrate was washed with 1N HCl (3 x 150 mL), brine (1 x 150 mL), 4% sodium bicarbonate (3
40 x 150 mL) and brine (1 x 150 mL). The ethyl acetate layer was dried over anhydrous sodium sulfate. Ethyl acetate was

WO 02/069937

PCT/US02/06610

removed by vacuum evaporation, followed by a nitrogen purge.
20 g (72 mmol, 72%) of N-hydroxysuccinimide-O-acetylsalicylate
was produced.

- 5
- Compound 3: N-(2-hydroxybenzoyl)-N',N'-diethylenediamine mono-citrate**
IUPAC name: N-[2-(diethylamino)ethyl]-2-hydroxybenzamide mono-citrate
- 10 Compound 3 was prepared by the same procedure as for compound 7 with the appropriate starting materials.
- 15 m.p. 111-113°C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.17 (t, 6H), 2.59 (q_{ab}, 4H), 3.09 (m, 6H), 3.61 (q, 2H), 6.95 (m, 2H), 7.44 (t, 1H), 7.85 (d, 1H), 9.07 (s, 1H), 10.25 (bs, 2H). KF value= 0.30%. Elemental analysis for calculated C₁₉H₂₈N₂O₉: C 53.27, H 6.54, N 6.54; found: C 52.96, H 6.28, N 6.37.
- 20 **2-(2-hydroxybenzoyl) amino-5-(N,N-diethylamino)pentane mono-citrate**
IUPAC name: N-[5-(diethylamino)-1-methylpentyl]-2-hydroxybenzamide mono-citrate
- 25 2-(2-hydroxybenzoyl) amino-5-(N,N-diethylamino)pentane mono-citrate was prepared by the same procedure as for compound 7 with the appropriate starting materials.
- 30 m.p. 62-64°C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.18 (m, 9H), 1.61 (m, 4H), 2.57 (q_{ab}, 4H), 3.02 (m, 6H), 4.03 (q, 1H), 4.11 (s, 1H), 6.91 (m, 2H), 7.41 (t, 1H), 7.89 (d, 1H), 8.58 (s, 1H), 10.6-11.8 (s, 2H). Elemental analysis for calculated C₂₂H₃₄N₂O₉: C 56.17, H 7.23, N 5.96; found: C 55.77, H 7.35, N 5.71.
- 35 **Compound 8: N-(2-hydroxybenzoyl)-N',N'-di(n-butyl)-1,3-diaminopropane mono-citrate**
IUPAC name: N-(3-[dibutylamino]propyl)-5-chloro-2-hydroxybenzamide mono-citrate
- 40 The procedures were the same as those described for Compound 7 except for the starting materials.
- m.p. 87-89°C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 0.89 (t, 6H), 1.30

WO 02/069937

PCT/US02/06610

(sex, 4H), 1.53 (m, 4H), 1.77 (quin, 2H), 2.59 (q_{ab}, 4H), 2.84-3.04 (m, 6H), 3.36 (t, 2H), 6.96 (d, 1H), 7.44 (dd, 1H), 7.90 (d, 1H), 8.97 (s, 1H). Elemental analysis for calculated C₁₉H₂₇N₂O₂Cl: C 54.08, H 6.95, N 5.26; found: C 54.13, H 7.00, N 5.10.

Compound 9: N-(2-hydroxybenzoyl)-1,12-diaminododecane hydrogen chloride
 IUPAC name: N-(12-aminododecanyl)-2-hydroxybenzamide hydrogen chloride

Compound 9 was prepared by the same procedure as for compound 7 with the appropriate starting materials.

m.p. 140-142° C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.21 (s, 16H), 1.53 (m, 4H), 2.72 (sex, 2H), 3.27 (q, 2H), 6.89 (m, 2H), 7.37 (t, 1H), 7.7-9.1 (d, 1H), 7.96-8.20 (s, 3H), 8.93 (s, 1H), 12.87 (s, 1H). Elemental analysis for calculated C₁₉H₃₃N₂O₂Cl: C 63.94, H 9.32, N 7.85, Cl 9.93; found: C 63.33, H 9.45, N, 7.28, Cl 10.87.

Compound 10: 10-(2-hydroxybenzoylamido) decylamine hydrogen chloride
 IUPAC name: N-(10-aminodecyl)-2-hydroxybenzamide hydrogen chloride

Compound 10 was prepared by the same procedure as for compound 11 with the appropriate starting materials.

m.p. 136-138° C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.24 (s, 12H), 1.51 (m, 4H), 2.71 (t, 2H), 3.26 (q, 2H), 6.87 (m, 2H), 7.37 (t, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.89-8.13 (s, 3H), 8.91 (t, 1H), 12.76 (s, 1H). Elemental analysis for calculated C₁₇H₂₉N₂O₂Cl: C 62.09, H 8.89, N 8.52; found: C 60.66, H 9.11, N 8.73.

Compound 17: N-(2-hydroxybenzoyl)-1,9-diaminononane
 IUPAC name: N-(9-aminononyl)-2-hydroxybenzamide

Compound 17 was prepared by the same procedure as for preparing the free amine of compound 11 with the appropriate starting materials.

¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.21-1.42 (m, 12H), 1.51 (m, 2H), 2.60 (t, 2H), 3.27 (t, 2H), 6.63 (t, 1H), 6.70 (d, 1H), 7.22

WO 02/069937

PCT/US02/06610

(t, 1H), 7.78 (d, 1H), 9.80 (s, 1H). RF value= 0.91%.
Elemental analysis for calculated $C_{16}H_{26}N_2O_2$ (0.91% H_2O): C
68.61, H 9.33, N 9.97; Found: C 68.54, H 9.41, N 10.31.

5 **1g: Preparation of Compound 12**

A 20 mL scintillation vial was charged with 3,5-
dibromosalicylic acid (1.299 g, 4.39 mmol), 1-[3-
(dimethylamino) propyl]-3-ethylcarbodiimide*HCl (0.99 g, 5.2
mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.79 g, 5.8 mmol).
10 1-(3-Aminopropyl)imidazole (476 μ l, 3.99 mmol) was added by
autopipet. THF (10 mL) was added, the vial was capped, and
placed on an orbital shaker overnight at 60° C. The heat was
turned off and the vial was allowed to cool back to room
temperature. Trisamine resin (200 mg, 0.85 mmol) was added
15 and the vial placed back on the orbital shaker for 4 hours.
Amberlyst-15 (2 g, 9.4 mmol) and Amberlyst-21 (2 g, 9.4 mmol)
ion-exchange resins were added to the vial along with DCM (5
mL) to suspend the resins. The vial was placed back on the
orbital shaker overnight. The reaction mixture was filtered
20 and the resins were rinsed with DCM (2 x 5 mL). The combined
filtrates were placed under a nitrogen stream overnight.
2.3985 g of material was recovered.
LC-MS: rt = 2.39 min, 89 %, M + H = 404.

25 **1h: Preparation of Compound 13**

A 20 mL scintillation vial was charged with 3,5-
dichlorosalicylic acid (0.9082 g, 4.39 mmol), 1-[3-
(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide*HCl (0.99 g,
5.2mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.79 g, 5.8
30 mmol). 1-(3-Aminopropyl)imidazole (476 μ l, 3.99 mmol) was
added by autopipet. THF (10 mL) was added, the vial was
capped, and placed on an orbital shaker overnight at 60° C.
The heat was turned off and the vial was allowed to cool back
to room temperature. Trisamine resin (200 mg, 0.85 mmol) was
35 added and the vial placed back on the orbital shaker for 4

WO 02/069937

PCT/US02/06610

hours. Amberlyst-15 (2 g, 9.4 mmol) and Amberlyst-21 (2 g, 9.4 mmol) ion-exchange resins were added to the vial along with DCM (5 mL) to suspend the resins. The vial was placed back on the orbital shaker overnight. The reaction mixture was filtered and the resins were rinsed with DCM (2 x 5 mL). The combined filtrates were placed under a nitrogen stream overnight. 2.0343 g of material was recovered.
LC-MS: rt = 2.24 min, 79%, M + H = 315

10 1i: Preparation of Compound 14

A 20 mL scintillation vial was charged with 3,5-dihydroxybenzoic acid (1.700 g, 4.39 mmol), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide*HCl (0.99 g, 5.2 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.79 g, 5.8 mmol). 1-(3-Aminopropyl)imidazole (476 µL, 3.99 mmol) was added by autopipet. THF (10 mL) was added, the vial was capped, and placed on an orbital shaker overnight at 60°C. The heat was turned off and the vial was allowed to cool back to room temperature. Trisamine resin (200 mg, 0.85 mmol) was added and the vial placed back on the orbital shaker for 4 hours. Amberlyst-15 (2 g, 9.4 mmol) and Amberlyst-21 (2 g, 9.4 mmol) ion-exchange resins were added to the vial along with DCM (5 mL) to suspend the resins. The vial was placed back on the orbital shaker overnight. The reaction mixture was filtered and the resins were rinsed with DCM (2 x 5 mL). The combined filtrates were placed under a nitrogen stream overnight. 2.7305 g of material was recovered.
LC-MS: rt = 2.62 min, 84 %, M + H = 498

30 1j: Preparation of Compound 15

A 20 mL scintillation vial was charged with 3,5-dibromosalicylic acid (1.299 g, 3.8 mmol), 1-[3-(dimethylamino) propyl]-3-ethylcarbodiimide*HCl (0.84 g, 4.39

WO 02/069937

PCT/US02/06610

mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.59 g, 4.38 mmol).
4-(3-Aminopropyl)morpholine (506 μ l, 3.47 mmol) was added by
autopipet. THF (10 mL) was added, the vial was capped, and
placed on an orbital shaker overnight at 60° C. The heat was
5 turned off and the vial was allowed to cool back to room
temperature. Trisamine resin (200 mg, 0.85 mmol) was added
and the vial placed back on the orbital shaker for 4 hours.
Amberlyst-15 (2 g, 9.4 mmol) and Amberlyst-21 (2 g, 9.4 mmol)
ion-exchange resins were added to the vial along with DCM (5
10 mL) to suspend the resins. The vial was placed back on the
orbital shaker overnight. The reaction mixture was filtered
and the resins were rinsed with DCM (2 x 5 mL). The combined
filtrates were placed under a nitrogen stream overnight.
2.103 g of material was recovered.
15 LC-MS: rt = 2.36 min, 74%, M + H = 423

1k: Preparation of Compound 16

A 20 mL scintillation vial was charged with 3,5-
dichlorosalicylic acid (0.786 g, 3.8 mmol), 1-[3-
20 (dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide*HCl (0.84 g, 4.39
mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.59 g, 4.38 mmol).
4-(3-Aminopropyl)morpholine (506 μ l, 3.47 mmol) was added by
autopipet. THF (10 mL) was added, the vial was capped, and
placed on an orbital shaker overnight at 60° C. The heat was
25 turned off and the vial was allowed to cool back to room
temperature. Trisamine resin (200 mg, 0.85 mmol) was added
and the vial placed back on the orbital shaker for 4 hours.
Amberlyst-15 (2 g, 9.4 mmol) and Amberlyst-21 (2 g, 9.4 mmol)
ion-exchange resins were added to the vial along with DCM (5
30 mL) to suspend the resins. The vial was placed back on the
orbital shaker overnight. The reaction mixture was filtered
and the resins were rinsed with DCM (2 x 5 mL). The combined
filtrates were placed under a nitrogen stream overnight.

WO 02/069937

PCT/US02/06610

1.648 g of material was recovered.
LC-MS: rt = 2.23 min, 75%, M + H = 334

1k: Alternate preparations of Compounds 12,13,14,15,16

5 Compounds 12, 13, 14, 15, and 16 are synthesized by the same procedure described to make compound 7 using the appropriate starting materials.

10

Example 2

2A: Insulin - Oral Delivery

Oral dosing (PO) compositions of delivery agent compound
15 and human zinc insulin (minimum 26 IU/mg available from Calbiochem - Novabiochem Corp, La Jolla, CA) were prepared in deionized water. Typically, 500 mg of delivery agent compound was added to 1.5 ml of water. The solution was vortexed, then heated (about 37°C) and sonicated. The pH was adjusted to
20 about 7 to 8.5 with NaOH or HCl. Additional NaOH was added, if necessary, to achieve uniform solubility, and the pH re-adjusted to about 7 to 8.5. Water was then added to bring the total volume to about 2.4 ml and vortexed. About 1.25 mg
25 insulin from an insulin stock solution (15 mg/ml made from 0.5409 g insulin and 18 ml deionized water, adjusting with HCl and NaOH to pH 8.15 and to obtain a clear solution using 40 ml concentrated HCl, 25 ml 10N NaOH and 50 ml 1N NaOH) was added to the solution and mixed by inverting. The solution may be used in the dosing protocol immediately, or alternatively, the
30 solution may be placed into a 37°C water bath for one hour prior to dosing. The final delivery agent compound dose, insulin dose and dose volume amounts are listed below in Table 1.

WO 02/069937

PCT/US02/06610

The typical dosing and sampling protocols were as follows. Male Sprague-Dawley rats weighing between about 200-250g were fasted for 24 hours and administered ketamine (44 mg/kg) and chlorpromazine (1.5 mg/kg) 15 minutes prior to dosing and again as needed to maintain anesthesia. A dosing group of five animals was administered one of the dosing solutions. For oral dosing, an 11 cm Rusch 8 French catheter was adapted to a 1 ml syringe with a pipette tip. The syringe was filled with dosing solution by drawing the solution through the catheter, which was then wiped dry. The catheter was placed down the esophagus leaving 1 cm of tubing past the incisors. The dosing solution was administered by pressing the syringe plunger.

Blood samples were collected serially from the tail artery, typically at time = 15, 30, 60, 120 and 180 minutes. Serum insulin levels were determined with an Insulin ELISA Test Kit (Kit # DSL-10-1600 from Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX), modifying the standard protocol in order to optimize the sensitivity and linear range of the standard curve for the volumes and concentrations of the samples used in the present protocol. Serum human insulin concentrations ($\mu\text{U}/\text{ml}$) were measured for each time point for each of the five animals in each dosing group. The five values for each time point were averaged and the results plotted as serum insulin concentration versus time. (Previous experiments revealed no measurable levels of human insulin following oral dosing with human insulin alone.) The maximum (peak) and the area under the curve (AUC) are reported below in Table 1.

30

Table 1. Insulin - Oral Delivery

WO 02/069937

PCT/US02/06610

Delivery Agent Compound	Delivery Agent Compound Dose (mg/kg)	Insulin Dose (mg/kg)	Volume dose (ml/kg)	Mean Peak Serum [INS] \pm SD
15	200	0.25	1	60.42 \pm 117.16
16	200	0.25	1	61.27 \pm 116.59
12	200	0.25	1	83.4 \pm 14.69
13	200	0.25	1	76.8 \pm 6.80

2B: Biotinylated Ribonuclease A (bRNase A) Oral Delivery

Oral gavage (PO) dosing solutions of delivery agent compound and bRNase A (Sigma (Milwaukee, WI): Ribonuclease A Type XII-A from bovine pancreas) in deionized water were prepared by mixing. The delivery agent compound solution was prepared in phosphate buffer and stirred. If necessary, the pH of the mixture was adjusted upwards by the addition of aliquots of NaOH of an appropriate normality until the delivery agent compound was completely dissolved. The final pH of the dissolved delivery agent compound was between 7.5 and 9.5. The final dosing solutions were prepared by mixing 9 volumes of the delivery agent compound solution with 1 volume of a bRNase A stock solution (20 mg bRNase A in phosphate buffered saline (PBS)). Final concentrations were 150 mg/ml delivery agent compound and 2 mg/ml bRNase A.

The dosing and sampling protocols were as follows. Male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g were fasted for 24 hours and administered ketamine (44 mg/kg) and chlorpromazine (1.5 mg/kg) 15 minutes prior to dosing and again as needed to maintain anesthesia. A dosing group of five animals was administered one of the dosing solutions in the following manner. An 11 cm Rusch 8 French catheter was adapted to a 1 ml syringe with a pipette tip. The syringe was filled with dosing solution by drawing the solution through the catheter, which was then wiped dry. The catheter was placed down the

WO 02/069937

PCT/US02/06610

esophagus leaving 1 cm of tubing past the incisors. The dosing solution was administered by pressing the syringe plunger. Blood samples were collected serially from the tail artery at 15, 30, 45, 60 and 90 minutes. Serum bRNase A concentrations were quantified by a modified immunoassay as described below.

Biotinylation of Ribonuclease A

To label each of the RNase A molecules with one biotin molecule, the ratio of the activated biotin was maintained at 3 moles biotin/ 1 mole RNase A. In a representative biotinylation reaction 500 mg of RNase A was dissolved in 20 ml of 50 mM NaHCO₃, pH 7.6. 57.08 mg of EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC Biotin (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) was added to the solution, dissolved and allowed to stand on ice for 2 hours. The reaction mix was then dialyzed (10,000 MW cutoff dialysis membrane (Pierce, Rockford, Illinois)) against 4 liters of PBS at 4^o C. overnight. The reaction mix was placed in 4 liters of fresh PBS and dialyzed for an additional 4 hours. The dialyzed bRNase A was removed from the dialysis membrane, diluted to a final volume of 25 ml with PBS (final concentration of bRNase A = 20 mg/ml), and stored at 4^o C.

Assay of Serum Levels of Orally Administered bRNase A

In general 100 µl aliquots of the rat sera collected at the various time points were placed in the appropriate wells of a 96 well Reacti-Bind Streptavidin Coated Polystyrene Plates (Pierce). After a 2 hour incubation period the plates were washed and then incubated with a polyclonal rabbit anti-RNase A (Chemicon, Pittsburgh, PA). After washing, the plates were incubated for 2 hours with a polyclonal goat anti-rabbit IgG (Chemicon, Pittsburgh, PA) conjugated to alkaline phosphatase. The plates were washed after the incubation and

WO 02/069937

PCT/US02/06610

the amount of initially captured bRNase A is detected by the addition of para-nitrophenyl phosphate (a substrate for alkaline phosphatase) (Pierce, Rockford, Illinois). The amount of bRNase A circulating in the original rat sera is

5 quantitated by comparison with a standard curve of bRNase A which extends from 1000 - 0.1 ng/mL in fifteen two-fold dilutions. The maximum \pm standard deviation is given in Table 2 below.

10

Table 2 - Oral Delivery of RNAase

Delivery Agent Compound	Delivery Agent Compound Dose (mg/kg)	bRNAase Dose (mg/kg)	Volume dose (ml/kg)	Mean Peak Serum ng/ml
1	150	1	1	2.38 \pm 2.2
3	150	1	1	2.98 \pm 1.66

15

2c: Oral Delivery of BIBN4096BS**Oral gavage (PO) dosing solutions of delivery agent**

compound and the Calcitonin gene-related peptide antagonist,

20 1-Piperidinecarboxamide, N-[2-[[5-amino-1-[[4-(4-pyridinyl)-1-piperazinyl]carbonyl]pentyl]amino]-1-[(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxoethyl]-4(1,4-dihydro-2-oxo-3(2H0-quinazolinyl)-[R-(R*,S*)]- (BIBN4096BS) in water were prepared. Typically, a solution of the delivery agent

25 compound was prepared in water and stirred. The final dosing solutions were prepared by mixing the delivery agent compound with a BIBN4096BS stock solution and diluting to the desired volume (usually 1.0 mL). If necessary, the pH of the mixture

WO 02/069937

PCT/US02/06610

was adjusted by the addition of aliquots of aqueous hydrochloric acid solution of an appropriate normality until the final pH of the dosing solution was below 7.0. The final compound amounts per dose were 25 mg/kg of BIBN4096BS, 200
5 mg/kg of delivery agent compound, in a total volume of 1mL/kg.

The typical dosing and sampling protocols were as follows. Male Sprague-Dawley rats weighing between 200-250g were fasted for 24 hours and administered ketamine (44 mg/kg) and chlorpromazine (1.5 mg/kg) 15 minutes prior to dosing. A
10 dosing group of five rats was administered one of the dosing solutions. For oral gavage (PO) dosing, an 11 cm Rusch 8 French catheter was adapted to a 1 mL syringe with a pipette tip. The syringe was filled with dosing solution by drawing the solution through the catheter, which was then wiped dry.
15 The catheter was placed down the esophagus leaving 1 cm of tubing past the incisors. Solution was administered by pressing the syringe plunger. Blood samples were collected serially from the tail artery, typically at time = 0, 15, 30, 45, and 60 minutes for oral. Plasma BIBN4096BS concentrations
20 were quantified by using a liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry assay method using UV detection. The standard range for the assay was 5-2,000 ng/mL. Previous studies indicated baseline values of about 10 ng/mL. The maximum is reported below in Table 3.

25

Table 3. Oral BIBN4096BS Delivery

WO 02/069937

PCT/US02/06610

Delivery Agent Compound	Delivery Agent Compound Dose (mg/kg)	BTBN4096BS Dose (mg/kg)	Volume dose (ml/kg)	Mean Peak Serum ng/ml
1	200	25	1	28 ± 19
4	200	25	1	23 ± 14
2	200	25	1	453 ± 300*
5	200	25	1	402 ± 608*
13	200	25	1	12 ± 3.6
15	200	25	1	0
16	200	25	1	15 ± 8.1

* some dosing solutions were at a pH=8.0

The above mentioned patents, applications, test methods, and publications are hereby incorporated by reference in their entirety.

Many variations of the present invention will suggest themselves to those skilled in the art in light of the above detailed description. All such obvious variations are within the fully intended scope of the appended claims.

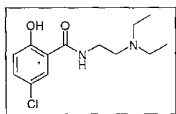
WO 02/069937

PCT/US02/06610

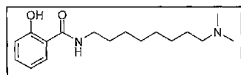
WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound selected from the group consisting of compounds 1-18:

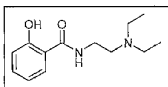
5



Compound 1

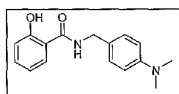


Compound 2



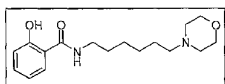
Compound 3

10



Compound 4

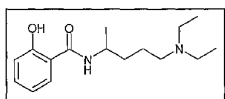
15



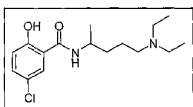
Compound 5

WO 02/069937

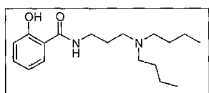
PCT/US02/06610



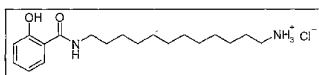
Compound 6



Compound 7

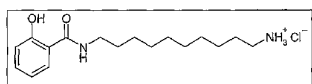


Compound 8



Compound 9

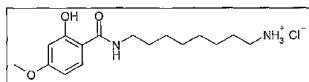
5



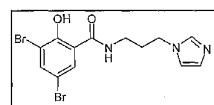
Compound 10

WO 02/069937

PCT/US02/06610

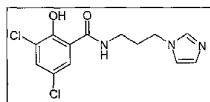


Compound 11

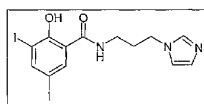


Compound 12

5

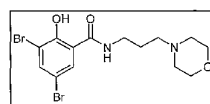


Compound 13



Compound 14

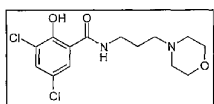
10



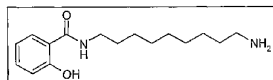
Compound 15

WO 02/069937

PCT/US02/06610

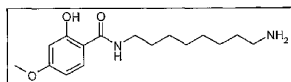


Compound 16



Compound 17

5



Compound 18

and salts thereof.

- 10 2. A composition comprising:
 (A) an active agent; and
 (B) at least one compound of claim 1.
- 15 3. The composition of claim 2, wherein the active agent is selected from the group consisting of a biologically active agent, a chemically active agent, and a combination thereof.
- 20 4. The composition of claim 3, wherein the biologically active agent comprises at least one protein, polypeptide, peptide, hormone, polysaccharide, mucopolysaccharide, carbohydrate, or lipid.

WO 02/069937

PCT/US02/06610

5. The composition of claim 3, wherein the biologically active agent is selected from the group consisting of:
BIBN-4096BS, growth hormones, human growth hormones
5 recombinant human growth hormones (rhGH), bovine growth hormones, porcine growth hormones, growth hormone releasing hormones, growth hormone releasing factor, interferons, α -interferon, β -interferon, γ -interferon, interleukin-1, interleukin-2, insulin, porcine insulin,
10 bovine insulin, human insulin, human recombinant insulin, insulin-like growth factor (IGF), IGF-1, heparin, unfractionated heparin, heparinoids, dermatans, chondroitins, low molecular weight heparin, very low molecular weight heparin, ultra low molecular weight
15 heparin, calcitonin, salmon calcitonin, eel calcitonin, human calcitonin; erythropoietin (EPO), atrial natriuretic factor, antigens, monoclonal antibodies, somatostatin, protease inhibitors, adrenocorticotropin, gonadotropin releasing hormone, oxytocin, luteinizing-hormone-releasing-hormone, follicle stimulating hormone,
20 glucocerebrosidase, thrombopoietin, filgrastim. postaglandins, cyclosporin, vasopressin, cromolyn sodium, sodium chromoglycate, disodium chromoglycate, vancomycin, desferrioxamine (DFO), parathyroid hormone (PTH),
25 fragments of PTH, antimicrobials, anti-fungal agents, vitamins; analogs, fragments, mimetics and polyethylene glycol (PEG)-modified derivatives of these compounds; and any combination thereof.

30

6. The composition of claim 3, wherein the biologically active agent comprises insulin, BIBN-4096BS, calcitonin, parathyroid hormone, erythropoietin, growth hormones or

WO 02/069937

PCT/US02/06610

combinations thereof.

7. The composition of claim 3, wherein the biologically active agent comprises BIBN-4096BS.

5

8. The composition of claim 3, wherein the biologically active agent comprises insulin.

9. A dosage unit form comprising:

10

(A) the composition of claim 2; and

(B) (a) an excipient

(b) a diluent

(c) a disintegrant,

(d) a lubricant,

15

(e) a plasticizer,

(f) a colorant,

(g) a dosing vehicle, or

(h) any combination thereof.

20

10. The dosage unit form of claim 9, wherein the active agent is selected from the group consisting of a biologically active agent, a chemically active agent, and a combination thereof.

25

11. The dosage unit form of claim 10, wherein the biologically active agent comprises at least one protein, polypeptide, peptide, hormone, polysaccharide, mucopolysaccharide, carbohydrate, or lipid.

30

12. The dosage unit form of Claim 10, wherein the biologically active agent is selected from the group consisting of: BIBN-4096BS, growth hormones, human growth hormones (hGH), recombinant human growth hormones (rhGH),

WO 02/069937

PCT/US02/06610

- bovine growth hormones, porcine growth hormones, growth hormone releasing hormones, growth hormone releasing factor, interferons, α -interferon, β -interferon, γ -interferon, interleukin-1, interleukin-2, insulin, porcine insulin, bovine insulin, human insulin, human recombinant insulin, insulin-like growth factor, insulin-like growth factor-1, heparin, unfractionated heparin, heparinoids, dermatans, chondroitins, low molecular weight heparin, very low molecular weight heparin, ultra low molecular weight heparin, calcitonin, salmon calcitonin, eel calcitonin, human calcitonin; erythropoietin, atrial natriuretic factor, antigens, monoclonal antibodies, somatostatin, protease inhibitors, adrenocorticotropin, gonadotropin releasing hormone, oxytocin, leutinizing-hormone-releasing-hormone, follicle stimulating hormone, glucocerebrosidase, thrombopoietin, filgrastim, prostaglandins, cyclosporin, vasopressin, cromolyn sodium, sodium chromoglycate, disodium chromoglycate, vancomycin, desferrioxamine, parathyroid hormone, fragments of PTH, antimicrobials, anti-fungal agents, vitamins; analogs, fragments, mimetics and polyethylene glycol-modified derivatives of these compounds; and any combination thereof.
13. The dosage unit form of claim 10, wherein the biologically active agent comprises insulin, BIEN-4096BS, calcitonin, parathyroid hormone, erythropoietin, human growth hormones or combinations thereof.
14. The dosage unit form of claim 9, wherein the active agent comprises recombinant BIEN-4096BS.
15. The dosage unit form of claim 9, wherein the active

WO 02/069937

PCT/US02/06610

agent comprises insulin.

5 16. The dosage unit form of claim 9, wherein the dosage unit form comprises a dosing vehicle comprising a tablet, a capsule, a powder, or a liquid.

10 17. The dosage unit form of claim 9, wherein the dosing vehicle is liquid selected from the group consisting of water, 1,2-propane diol, ethanol, and any combination

15 18. A method for administering a biologically-active agent to an animal in need of the agent, the method comprising administering orally to the animal the composition of claim 3.

19. A method for preparing a composition comprising mixing:

- 20 (A) at least one active agent;
(B) the compound of claim 1; and
(C) optionally, a dosing vehicle.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/06610
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Y) : A61K 9/48, 9/20, 9/14, 39/00, 39/28; A01N 57/15 US CL : 424/451,454,489; 514/2, 3 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) U.S. : 424/451,454,489; 514/2, 3 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) EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,470,980 (HIGUCHI et al.) 11 September 1984(11.09.84). See entire document.	1-19
Y	US 4,464,363 (HIGUCHI et al.) 07 August 1984(07.08.84). See entire document.	1-19
<input 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 "B" earlier document published on or after the international filing date "I" 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 MAY 2002		Date of mailing of the international search report 05 JUN 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 805-2930		Authorized officer: <i>Liliana D. Roberts</i> LILIANA DI NOLA-BARON Telephone No. (703) 806-1284

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/04	A 6 1 K 47/04	
A 6 1 K 47/10	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/18	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/22	A 6 1 K 47/22	
C 0 7 D 233/61	C 0 7 D 233/61	1 0 2
C 0 7 D 295/12	C 0 7 D 295/12	Z

(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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,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,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,R U,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 ジュン・リアオ

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10591・タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロ
ード・765・エミスフェア・テクノロジーズ・インク内

(72)発明者 デヴィッド・グシュナイダー

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10591・タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロ
ード・765・エミスフェア・テクノロジーズ・インク内

(72)発明者 ジョン・ジェイ・ウェイドナー

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10591・タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロ
ード・765・エミスフェア・テクノロジーズ・インク内

(72)発明者 ナイ・ファン・ワン

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10591・タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロ
ード・765・エミスフェア・テクノロジーズ・インク内

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA37 AA53 BB01 BB13 BB15 BB16 BB22 BB24 BB25
BB27 BB29 BB30 BB31 DD21A DD37A DD38A DD52N DD60N FF12
FF34 FF65 FF66
4C084 AA02 AA03 AA27 BA01 BA44 DA12 DA13 DA14 DA21 DA22
DA23 DA24 DB02 DB09 DB10 DB11 DB14 DB22 DB26 DB28
DB29 DB31 DB32 DB34 DB56 DB58 DC10 DC32 MA05 MA13
MA17 MA22 MA23 MA35 MA37 MA52 MA56 MA57 MA58 MA59
MA60 MA63 MA66 NAO5 NA11
4H006 AA01 AB20 BJ50 BM30 BM72 BN30 BU50 BV73