

(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2005-517739

(P2005-517739A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07C 229/24</b>	C O 7 C 229/24 C S P	4 C O 7 6
<b>A61K 9/127</b>	A 6 1 K 9/127	4 H O O 6
<b>A61K 9/51</b>	A 6 1 K 9/51	4 H O 5 0
<b>C07D 233/60</b>	C O 7 D 233/60 I O 4	
<b>C07F 9/10</b>	C O 7 F 9/10 B	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)	

(21) 出願番号	特願2003-569642 (P2003-569642)	(71) 出願人	503300306 ノヴォソム アクチェンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国 06120 ハレ ヴ アインベルクヴェーク 22
(86) (22) 出願日	平成15年2月19日 (2003. 2. 19)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月18日 (2004. 10. 18)	(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/001662	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 国際公開番号	W02003/070735	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(87) 国際公開日	平成15年8月28日 (2003. 8. 28)	(74) 代理人	100114007 弁理士 平山 孝二
(31) 優先権主張番号	102 07 178.0		
(32) 優先日	平成14年2月19日 (2002. 2. 19)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 両性リポソームを製造するための成分

## (57) 【要約】

本発明は両性脂質に関する。本発明によれば、等電点が4～9の両性基1個以上が膜性両親媒性物質又は膜形成両親媒性物質で置換されている。本発明はまた、その化合物を含有するリポソームに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

下記一般式(I):

(I) 両性物質 - Y - スペーサー - 両親媒性物質

を有する脂質の等電点が4.5~8.5である両性脂質であって、

(a)両性物質が、pK<sub>a</sub>値が4~8のカチオン電荷の少なくとも一部及び/又はpK<sub>a</sub>値が3~7のアニオン電荷の少なくとも一部及び任意により追加の電荷担体を有し、

aa)前記カチオン電荷の一部はイミダゾール、モルホリン、ピペラジン、プリン、ピリジン及び/又はピリミジン又はその誘導体を含む群より選ばれ、

bb)前記アニオン電荷の一部は、脂肪族鎖に結合した、酢酸、プロモ酢酸、クロロ酢酸、アセト酢酸、プロピオン酸、アクリル酸、酪酸、クロトン酸、又はカルボン酸を含むカルボキシル基；モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合したジカルボン酸を含むカルボキシル基；モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合したオリゴカルボン酸を含むカルボキシル基である、

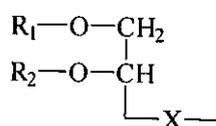
(b)スペーサーがエチレン系不飽和結合0、1又は2個と、ヒドロキシル基0~4個を含む直鎖、分枝鎖又は環状構造をもつC原子8個までを有する低級アルキル残基であり、

(c)Yが-(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -NH-(C=O)-O-; -O-; -NH-; -CH=N-; -O-(O=C)-; -S-; -(O=C)-; -NH-(O=C)-; -O-(O=C)-NH-, -N=CH- 及び/又は -S-S-を含み、

(d)両親媒性物質が下記一般式(II)又は(III)又は(IV):

## 【化1】

(II)

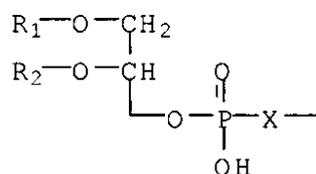


(式中、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有するC<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>アルキル鎖又はアシル鎖であり、

Xは-O-(C=O); -NH-(C=O)-; -S-(C=O)-; -O-; -NH-; -S-; -N=CH-; -(O=C)-O-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -N=CH-及び/又は-S-S-を含む群より選ばれる。); 又は

## 【化2】

(III)

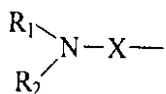


(式中、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有するC<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>アシル鎖であり、

Xは-O-である。); 又は

## 【化3】

(IV)



(式中、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有するC<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>アルキル鎖であり、

Xは存在しないか又は-(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -(C=O)-S-; -NH-; -CH=N-; 及び/又は-S-(O=C)-からなる群より選ばれる。)

を有する構造であり、

10

20

30

40

50

(e)両親媒性物質が $C_8$ - $C_{30}$ 直鎖アルコールでエステル化したアスパラギン酸、グルタミン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アコニチン酸、シトラコン酸及び/又はマレイン酸のような1,4-又は1,5-ジカルボン酸であり、及び/又は

(f)両親媒性物質が $C_8$ - $C_{30}$ 直鎖脂肪酸でアミノ化した3-アミノアラニン、ジアミノ酪酸、オルニチン又はリシンの1,4-又は1,5-ジアミンであることを特徴とする、前記脂質。

【請求項2】

ジカルボン酸がシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、グルタル酸、アジピン酸、カプリル酸、ピメリン酸、スベリン酸、シクロヘキサンジカルボン酸及び/又はシクロペンタンジカルボン酸を含む群より選ばれ、及び/又はオリゴカルボン酸がクエン酸、イソクエン酸及び/又はエチレンジアミン四酢酸を含む群より選ばれることを特徴とする、請求項1記載の脂質。

10

【請求項3】

両性脂質の等電点が5~7であることを特徴とする、請求項1又は2記載の脂質。

【請求項4】

両性物質におけるカチオン電荷とアニオン電荷の部分の $pK_a$ 値が最大で2 pH単位離れていることを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に記載の脂質。

【請求項5】

両性物質のカチオン電荷の部分がイミダゾール、ピペラジン、モルホリンを含み、アニオン電荷部分がカルボキシル基を含んでいることを特徴とする、請求項1~4のいずれか1

20

【請求項6】

両性物質がヒスチジン、アルギニン、リシン、グルタミン酸及び/又はアスパラギン酸からなる群より選ばれる2~6個のアミノ酸を有するペプチドであり、ここで、

i)HisとAsp/Gluの%は66%を超えない、

ii)Arg/Lysの%は50%より少なく、Asp/Gluの%は50%より多い、又は

iii)HisとArg/Lysの%は33%以下であり、Asp/Gluの%はArg/Lysの%より多い

ことを特徴とする、請求項1~5のいずれか1項に記載の脂質。

【請求項7】

両親媒性物質がジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、ホスホグリセロール、アシル化又はアルキル化3-アミノ-1,2-プロパンジオール及び/又はN,N-ジアルキルアミンからなる群より選ばれることを特徴とする、請求項1~6のいずれか1項に記載の脂質。

30

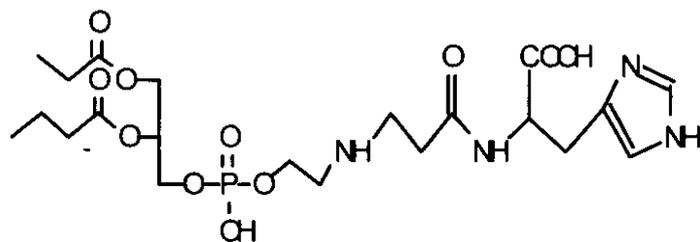
【請求項8】

スペーサーが糖又はモノマー単位20個までのポリエチレングリコールであることを特徴とする、請求項1~7のいずれか1項に記載の脂質。

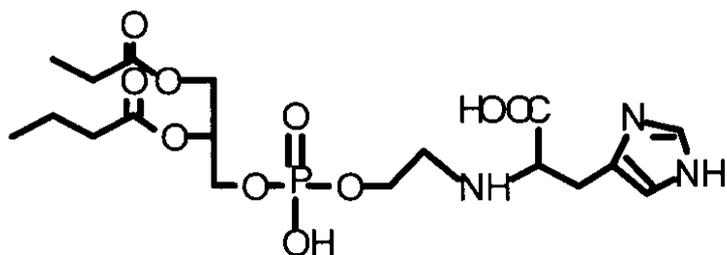
【請求項9】

両性脂質であって、脂質が下記構造

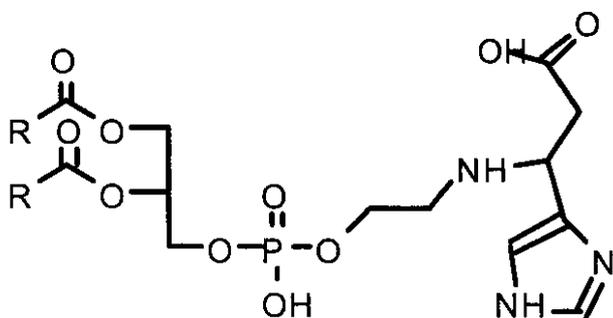
【化 4】



10

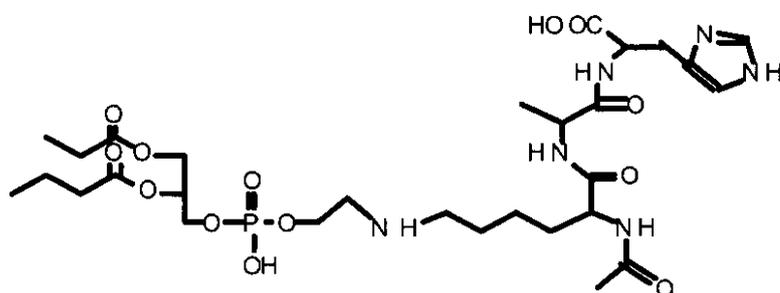


20



30

又は



40

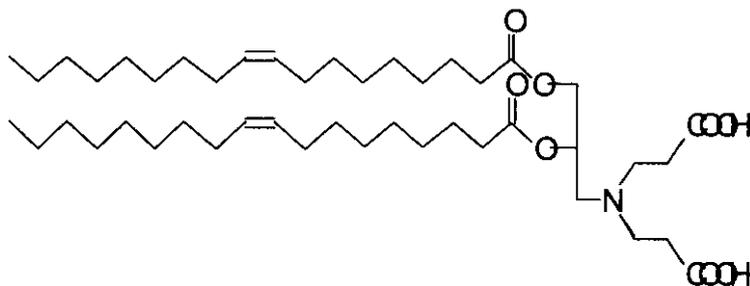
(式中、長鎖両親媒性物質は独立してラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル又はリノレオイルの残基を含んでいる。)

を有する、前記脂質。

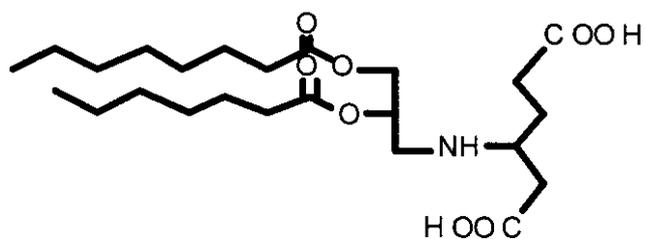
【請求項 10】

両性脂質であって、脂質が下記構造

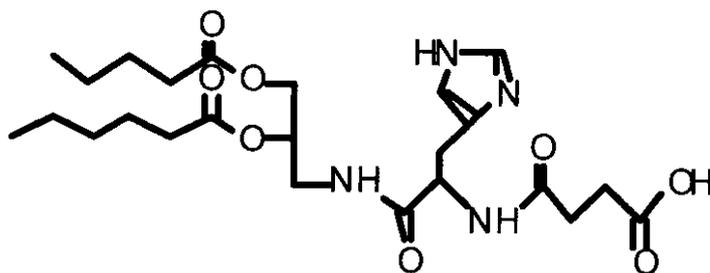
【化5】



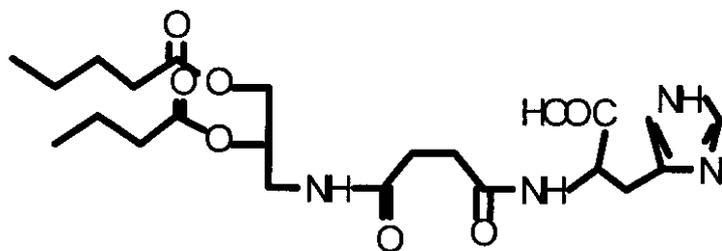
10



20

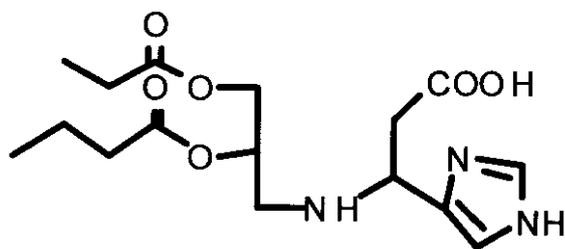


30



40

又は



50

(式中、長鎖両親媒性物質は独立して

a)ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル又はリノレオイ

ルの残基、又は

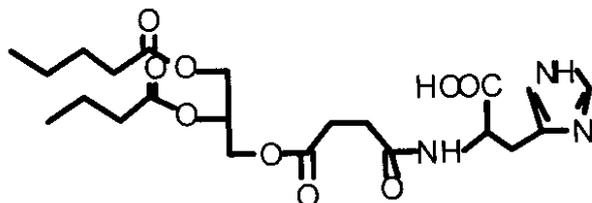
b)ラウリル、ミリスチル、パルミチル、ステアリル、オレイル又はリノレイルの残基を含んでいる。) )

を有する、前記脂質。

【請求項 1 1】

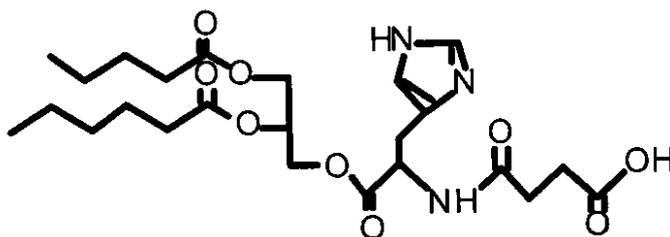
両性脂質であって、脂質が下記構造

【化 6】



10

又は



20

(式中、長鎖両親媒性物質は独立して

a)ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル又はリノレオイルの残基、又は

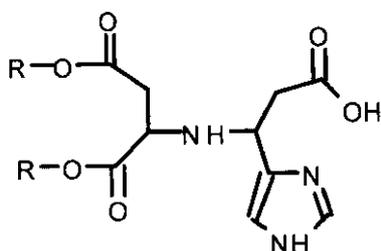
b)ラウリル、ミリスチル、パルミチル、ステアリル、オレイル又はリノレイルの残基を含んでいる。) )

を有する、前記脂質。

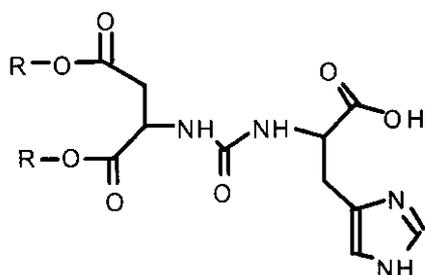
【請求項 1 2】

両性脂質であって、脂質が下記構造

【化 7】



又は



40

(式中、長鎖両親媒性物質は独立してラウリル、ミリスチル、パルミチル、ステアリル、オレイル又はリノレイルの残基を含んでいる。) )

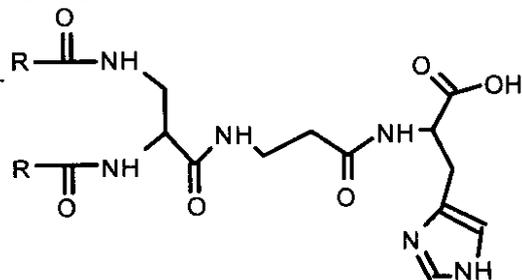
を有する、前記脂質。

50

## 【請求項 13】

両性脂質であって、脂質が下記構造

## 【化 8】



10

(式中、長鎖両親媒性物質は独立してラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル又はリノレオイルの残基を含んでいる。)

を有する、前記脂質。

## 【請求項 14】

請求項1～13のいずれか1項に記載の両性脂質を含むリポソーム。

## 【請求項 15】

リポソームが最高で50モル%の両性脂質、好ましくは2～50モル%、更に好ましくは10～40モル%を含むことを特徴とする、請求項1～14のいずれか1項に記載のリポソーム。

## 【請求項 16】

リポソームがホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジアシルグリセロール、テトラエーテル脂質及び/又はPEG脂質を含むことを特徴とする、請求項14又は15記載のリポソーム。

20

## 【請求項 17】

リポソームの平均サイズが50～1000 nm、好ましくは50～300 nm、更に好ましくは60～130 nmであることを特徴とする、請求項14～16のいずれか1項に記載のリポソーム。

## 【請求項 18】

リポソームが活性物質を含んでいることを特徴とする、請求項14～17のいずれか1項に記載のリポソーム。

## 【請求項 19】

活性物質がタンパク質、ペプチド、DNA、RNA、アンチセンスヌクレオチド及び/又はデオキシヌクレオチドであることを特徴とする、請求項14～18のいずれか1項に記載のリポソーム。

30

## 【請求項 20】

脂質1 mgに対して少なくとも50 μg、好ましくは90 μgを超える、更に好ましくは150 μgを超える活性物質がリポソームの内部に入り込んでいることを特徴とする、請求項18又は19記載のリポソーム。

## 【請求項 21】

請求項14～20記載のリポソームを活性物質で充填する方法であって、

活性物質を封入するための結合pH値と非結合活性物質を除去するための第二pH値が用いられることを特徴とする、前記方法。

40

## 【請求項 22】

請求項21の方法に従って製造される、リポソーム。

## 【請求項 23】

請求項14～20のいずれか1項に記載のリポソームを活性物質で充填する方法であって、該リポソームを特定のpH値で透過性にし、その後密封されることを特徴とする、前記方法。

## 【請求項 24】

ナノカプセルを製造するための請求項14～20のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

50

## 【請求項 25】

診断において用いられる放出システムを製造するための請求項14～20のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

## 【請求項 26】

活性物質を輸送及び放出するための請求項14～20のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

## 【請求項 27】

デポ製剤及び/又は循環デポとして請求項14～20のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

## 【請求項 28】

生体内、試験管内及び/又は生体外で細胞をトランスフェクトするベクターとしての請求項14～20のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

## 【請求項 29】

生体内トランスフェクションシステムであって、  
遺伝物質で充填した請求項14～20のいずれか1項に記載のリポソームを含んでいることを特徴とする、前記システム。

## 【請求項 30】

生体内トランスフェクションシステムであって、  
遺伝物質で重点したリポソームを含み、前記リポソームが下記式

(I) 両性物質 - Y - スペーサー - 両親媒性物質

[ 式中、(a)両性物質は、 $pK_a$  値が4～8のカチオン電荷の少なくとも一部及び/又は $pK_a$  値が3～7のアニオン電荷の少なくとも一部及び任意により追加の電荷担体を有し、

aa)前記カチオン電荷の一部はイミダゾール、モルホリン、ピペラジン、プリン、ピリジン及び/又はピリミジン又はその誘導体を含む群より選ばれ、

bb)前記アニオン電荷の一部は、脂肪族鎖に結合した、酢酸、プロモ酢酸、クロロ酢酸、アセト酢酸、プロピオン酸、アクリル酸、酪酸、クロトン酸、又はカルボン酸を含むカルボキシル基；モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合した、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、グルタル酸、アジピン酸、カプ릴酸、ピメリン酸、スベリン酸、シクロヘキサジカルボン酸又はシクロペンタンジカルボン酸のようなジカルボン酸を含むカルボキシル基；モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合した、クエン酸、イソクエン酸又はエチレンジアミン四酢酸のようなオリゴカルボン酸を含むカルボキシル基である、

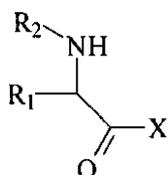
(b)スペーサーはエチレン系不飽和結合0、1又は2個と、ヒドロキシル基0～4個を含む直鎖、分枝鎖又は環状構造をもつC原子8個までを有する低級アルキル残基であり、

(c)Yは-(C=O)-O-； -(C=O)-NH-； -NH-(C=O)-O-； -O-； -NH-； -CH=N-； -O-(O=C)-； -S-； -(O=C)-； -NH-(O=C)-； -O-(O=C)-NH-； -N=CH-及び/又は-S-S-を含み、

(d)両親媒性物質は下記一般式(V)

## 【化 9】

(V)



( 式中、 $R_1$  及び  $R_2$  は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有する  $C_8$  -  $C_{30}$  アルキルであり、

Xは-O-； -NH-； -S-の群より選ばれる。 )

を有する構造である。 ]

を有する両性脂質を含んでいることを特徴とする、前記システム。

## 【請求項 31】

10

20

30

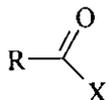
40

50

両親媒性物質が下記式(VI):

【化10】

(VI)



(式中、Rはエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有するC<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>アルキルであり、Xは-O-; -NH-; -S-の群より選ばれる。)

を有する構造であることを特徴とする、請求項30記載の生体内トランスフェクションシステム。 10

【請求項32】

生体内、試験管内及び/又は生体外で細胞をトランスフェクトするベクターとしての請求項29記載の生体内トランスフェクションシステムの使用。

【請求項33】

生体内、試験管内及び/又は生体外で細胞をトランスフェクトするベクターとしての請求項30又は31記載の生体内トランスフェクションシステムの使用。

【請求項34】

静脈内適用及び/又は腹腔内適用における請求項14~20のいずれか1項に記載のリポソームの使用。 20

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、等電点が4~9の両性基の1個以上で頭の基が置換されている両親媒性分子に基づく両性化合物、その化合物を含有するリポソーム、及びその使用に関する。

“脂質”という言葉は、生体膜から単離することができる3種類の天然物質：リン脂質、スフィンゴ脂質、及びコレステロール、その誘導体を含むものを纏めたものである。同様の性質を有する工業的に製造される化合物は、ジアシルグリセロール又はN,N-ジアルキルアミンである。

これらの物質は、リポソームの製造において技術的に興味深いものである。特に、そのようなリポソームは医薬製剤において活性物質の容器として使用し得る。そのような使用においては、カーゴの効率の良い安定な包装や制御可能な放出が望ましい。これらの要求はいずれも組み合わせることが容易でない。包装が安定でコンパクトになるほど、入り込んだ活性物質を放出させることが難しくなる。このため、外部刺激にตอบสนองして性質を変化させるリポソームが開発された。温度感受性リポソームやpH感受性リポソームが周知である。pH感受性リポソームは、このパラメータが生理的条件下でさえ、例えば、細胞内でのリポソームのエンドサイトーシスの受容中、又は胃腸管の通過中に変化を受けることから、特に興味深いものである。 30

【0002】

従来技術によれば、pH感受性リポソームは、特にコレステロール半コハク酸塩(CHEMS)を含んでいる。コレステロール半コハク酸塩はホスファチジルエタノールアミンと混合してpH感受性リポソームを製造するために用いられる(Tachibana et al. (1998); BBRC 251, 538-544, 米国特許第4,891,208号)。そのようなリポソームは、エンドサイトーシスによって細胞に入ることができ、細胞膜の多能性を損なうことなくカーゴ分子をこの経路で細胞の内部へ輸送することができる。 40

CHEMSの一つの重要な欠点はそのアニオン性である。それを用いて製造されたリポソームは、全体の電荷が負であり、低効率で細胞により吸収される。上記の運搬機序にもかかわらず、巨大分子の細胞への輸送にほとんど適しない。更に、そのようなリポソームにDNAのような巨大分子の活性物質を包装することは不可能である。

【0003】

活性物質を細胞へ輸送するために(トランスフェクション)、当該技術は表面電荷が好ましくは高く一定であるカチオンリポソームを用いている。そのような粒子の全体の電荷が正であることにより、細胞に対して静電付着が生じ、続いて細胞へ効率良く輸送されることになる。これらの化合物の使用やその化合物を用いて製造されたりリポソームの使用は、そのような正に荷電されたりリポソームによって血清成分との凝集体の制御されない形成が生じることから、試験管内又は生体外適用に依然として制限されている。

国際出願第00/59474号において、従来技術には膜アンカーと、同一分子上にカチオン基と頭のアニオン基を有する化合物が記載されており、アニオン基はジスルフィド架橋によって塩基性構造に結合されている。ジスルフィド架橋は、生理条件下、例えば、サイトゾルとの接触によって還元することができ、次に頭のアニオン基が遊離され、分子全体が正電荷をとり、よって細胞膜との融合を可能にする。国際出願第00/59474号に開示された化合物の毒性プロファイルと貯蔵安定性は、ジスルフィド架橋の切断により遊離カチオン脂質が生じることから不利である。不利なことに、これらの化合物は細胞毒性作用を有することが既知である。

#### 【0004】

更に、それを含む周知の脂質やリポソームは結合することができる又は入り込むことができるタンパク質、DNA及び/又はRNAの量が平均より少ない点で不利である。多量のカーゴを結合又は入り込むようにリポソームを修飾する場合には、細胞毒性になり、血清又は血液との適合性も低く、又は補体又はパーフォリンのような血液又は血清の具体的な成分によって攻撃されることから血液又は血清中で不安定である。それ故、周知のリポソームや脂質は生物に用いられる適性がわずかに制限され、更に、成分及び/又は結合物質を運搬するのに効率が悪い。上記欠点の少なくとも一部を欠いている周知の化合物の一部は、製造が非常に複雑であり、コスト的には成分の一部が臨床規模での利用又は実験ルーチンでの使用が可能でないような程度までである。

#### 【0005】

それ故、本発明の目的は、上記欠点を示さず、

- i)特に活性物質、特にプラスミドをリポソーム内に入り込ませることができ;
  - ii)入り込んだ活性物質を細胞の内部へ運搬することができるリポソームを製造することができ;
  - iii)存在によって生理的条件下で血清と混合し得るリポソームの製造を凝集を引き起こさずに達成することが援助され;
  - iv)リポソーム膜内に多量に取り込むことができ;
  - v)簡単に低コストで製造することができる
- 新規化合物を製造することであった。

#### 【0006】

本発明は、化合物の等電点が4.5~8.5であり且つpH範囲が1~2単位内でカチオンからアニオンへ電荷の状態を可逆的に変化することができる、下記一般式(1)を有する両親媒性化合物を含むリポソームによって上記の技術的課題を解決する。

(1) 両性物質 - Y - スペーサー - 両親媒性物質

[式中、(a)該両性物質は $pK_a$ 値が4~8のカチオン電荷の少なくとも一部及び/又は $pK_a$ 値が3~7のアニオン電荷の少なくとも一部及び任意により追加の電荷担体を有し、

aa)前記カチオン電荷の一部はイミダゾール、モルホリン、ピペラジン、プリン、ピリジン及び/又はピリミジン又はその誘導体を含む群より選ばれ、

bb)前記アニオン電荷の一部は、脂肪族鎖に結合した、酢酸、プロモ酢酸、クロロ酢酸、アセト酢酸、プロピオン酸、アクリル酸、酪酸、クロトン酸、又はカルボン酸を含むカルボキシル基;モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合した、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、グルタル酸、アジピン酸、カプリル酸、ピメリン酸、スベリン酸、シクロヘキサジカルボン酸のようなジカルボン酸を含むカルボキシル基;モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合したクエン酸、イソクエン酸又はエチレンジアミン四酢酸のようなオリゴカルボン酸を含むカルボキシル基

である、

(b) 該スパーサーはエチレン系不飽和結合0、1又は2個と、ヒドロキシル基0～4個を含む直鎖、分枝鎖又は環状構造をもつC原子8個までを有する低級アルキル残基であり、

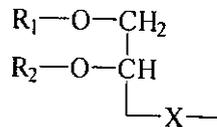
(c) Yは-(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -NH-(C=O)-O-; -O-; -NH-; -CH=N-; -O-(O=C)-; -S-; -(O=C)-; -NH-(O=C)-; -O-(O=C)-NH-、-N=CH-及び/又は-S-S-を含み、

(d) 該両親媒性物質は下記一般式(II)又は(III)又は(IV):

【0007】

【化1】

(II)



10

【0008】

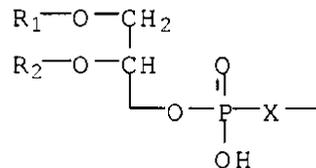
(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有する $C_8$ - $C_{30}$ アルキル鎖又はアシル鎖であり、

Xは-O-(C=O); -NH-(C=O)-; -S-(C=O)-; -O-; -NH-; -S-; -N=CH-; -(O=C)-O-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -N=CH-及び/又は-S-S-を含む群より選ばれる。); 又は

【0009】

【化2】

(III)



20

【0010】

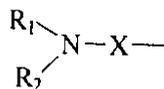
(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有する $C_8$ - $C_{30}$ アシル鎖であり、

Xは-O-である。); 又は

【0011】

【化3】

(IV)



30

【0012】

(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有する $C_8$ - $C_{30}$ アルキル鎖であり、

Xは存在しないか又は-(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -(C=O)-S-; -NH-; -CH=N-; 及び/又は-S-(O=C)-からなる群より選ばれる。)

を有する構造であり、

(e) 該両親媒性物質は $C_8$ - $C_{30}$ 直鎖アルコールでエステル化したアスパラギン酸、グルタミン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アコニチン酸、シトラコン酸及び/又はマレイン酸のような1,4-又は1,5-ジカルボン酸であり、及び/又は

(f) 該両親媒性物質は $C_8$ - $C_{30}$ 直鎖脂肪酸でアミノ化した3-アミノアラニン、ジアミノ酪酸、オルニチン又はリシンの1,4-又は1,5-ジアミンである。]

【0013】

50

それ故、本発明は、特に、リポソーム膜内に取込まれ得る両性基をスペーサーを介して両親媒性物質へ結合することが生物内での使用に適し且つ多量のタンパク質、ペプチド、炭水化物、DNA及び/又はRNAを結合及び/又は運搬することができるリポソームの製造に使用し得る構造を与えることを可能にする教示に関する。驚くべきことに、新規な化合物は、血液又は血清中で凝集せず、補体成分によって攻撃されず、細胞毒性でなく、血液又は血清中で数時間安定である小胞又はリポソームの製造に適し、リポソームの透過性はpH値、よって化合物の電荷状態に左右される。即ち、これらの凝集していない安定な非細胞毒性リポソームによる活性物質の放出は媒体のpH値に左右される。

用いられる両性物質と両親媒性物質によっては、pH値4~9で電荷を変え、驚くべきことに、リポソーム膜内に多量に取込むことができる化合物が得られる。

10

本発明に関連して、次の略号が用いられる。

CHEMS	コレステロール半コハク酸塩
PC	ホスファチジルコリン
PE	ホスファチジルエタノールアミン
PS	ホスファチジルセリン

#### 【0014】

##### 両親媒性物質

この分子成分に存在する1つ又は2つの前記長鎖アルキル又はアシルは、C原子8~30個を含んでいる。好ましくは直鎖又はわずかに分枝鎖であり、エチレン系不飽和結合0、1、又は2個を有することができる。天然脂質に見られる置換基、即ち、不飽和結合0、1又は2個を含むC原子12~20個を有する直鎖脂肪酸又はアルコールが特に好ましい。ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル、又はリノレオイルの残基又はその対応する脂肪アルコールが更に好ましい。

20

ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、ホスホグリセロール、アシル化又はアルキル化3-アミノ-1,2-プロパンジオール、N,N-ジアルキルアミンは、これらの化合物が特に低コストで利用でき、通常の化学を含み、透過性を高めずに又は膜特性を完全には破壊させることなく多量に膜内に取り込むことができることから、両親媒性物質として用いられることが好ましい。

#### 【0015】

本発明の有利な実施態様においては、両親媒性物質の頭の極性基としてジカルボン酸が用いられ、便利には追加の官能基によって実際に電荷をもつ置換基をカップリングすることができる。それから誘導される代表的な両親媒性物質は、アスパラギン酸、グルタミン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アコニチン酸、シトラコン酸、マレイン酸又は脂肪アルコールと同様の化合物のような1,4-又は1,5-ジカルボン酸であることが好ましい。上記ジカルボン酸のラウリル、ミリスチル、パルミチル、ステアリル、オレイル、リノレイルのエステルが特に好ましい。追加の分子成分(スペーサー、両性物質)は残存するアミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、又は二重結合によってカップリングされる。

30

他の有利な両親媒性物質は、官能基が追加されたジアミンから、例えば、3-アミノアラニン、ジアミノ酪酸、オルニチン、又はリシンのジアミドと長鎖脂肪酸との形で得られる。これらの中でラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル、又はリノレオイルの残基が特に好ましい。

40

最後には、本発明の化合物はスフィンゴシン又はセラミドの誘導体の形で製造することもできる。また、長鎖ビニルエーテル又はプラスマロゲンの誘導体として調製することができる。

出発物質として有利に用いられる両親媒性物質は、便利には安定で、しかし、生物学的に分解可能なカップリングを可能にするか又は場合によってはスペーサーの機能をとる様々な方法で頭の親水性基において官能基化し得る。存在しているヒドロキシル基、又はアミノ基が直接カップリングに特に適している。カルボキシル基も適している。

#### 【0016】

##### 両性物質

50

分子全体は、“両性物質”分子部分においてカチオン基とアニオン基が同時に存在することによりpH依存性電荷特性をとる。更に詳しくは、両性物質はその電荷成分の合計が具体的なpH値で正確にゼロになる事実を特徴とする。この点を等電点 (IP)と呼ぶ。IPより高い化合物は負の電荷を有し、IPより低い化合物は正カチオンとみなされ、本発明の化合物のIPは4.5~8.5の範囲にある。

媒体の具体的なpH値における分子の荷電全体は次のように計算し得る。

$$z = \sum n_i \times ((q_i - 1) + (10^{(pK - pH)}) / (1 + 10^{(pK - pH)}))$$

qi: そのpKより低いイオン基の絶対電荷(例えば、カルボキシル = 0、1つの窒素塩基 = 1、ジエステル化ホスフェート基 = -1)

ni: その基の分子内での数

10

例えば、本発明の化合物はヒスチジンのアミノ基のジパルミトイルグリセロール半コハク酸塩へのカップリングにより形成される。7の中性pH値において、生成物の電荷は、その中に存在するカルボキシル官能が完全に解離された形にあり、イミダゾール官能の電荷だけが低いことから負である。約4の酸性pH値において、状態は逆転する。ここでのカルボキシル官能は主に放電し、イミダゾール基は本質的に完全にプロトン化され、それ故分子の電荷全体は正である。

#### 【0017】

両親媒性物質としてリン脂質を用いた場合、その中に存在するホスフェートの一定の負電荷は、本発明の化合物を形成するために更に正電荷によって補償されなければならない。本発明の教示を示すものである一化合物はヒスチジンをホスファチジルセリンにカップリングすることにより形成される。この場合、カップリングがヒスチジンのカルボキシル基とPSのアミノ基との間で起こるにしも、ヒスチジンのアミノ基とPSのカルボキシル官能との間で起こるにしても不相当である。いずれの場合にも、遊離アミノ基がホスフェート基の一定の負の電荷を中和する分子が形成される。残存するカルボキシル基とイミダゾール官能は上記のように反応し、本発明の構造の企図された特性を生じる。

20

#### 【0018】

本発明の好適実施態様においては、分子の等電点は4~8、好ましくは5~7である。

本発明の他の好適実施態様においては、両性物質はpKa値が4~8のカチオン1種以上と、同時にpKa値が3~7のアニオン1種以上を有する。特に、両性物質は、4~9の上記pH範囲の電荷をいずれも変える2つの電荷担体から構成し得る。アニオン電荷の喪失とカチオン電荷の獲得を同時に生じることにより分子全体の荷電の変化が生じる。

30

特に好ましい実施態様は、カチオンとアニオンのpKa値が最大で2 pH単位はなれている両性物質を含んでいる。このことは、IPの鋭さに特に有利である。2つのpKaが共に近いほど、分子の電荷がカチオンからアニオンへ変化するpH範囲が狭くなる。カチオンとアニオンの種類と数に関して有利な選択は、上記式について当業者により行うことができる。

電荷担体として、pH範囲4~9において解離した形である官能基又は分子断片を用いることは便利なものである。更に詳しくは、これらはリン酸基、スルホン酸基又は強アニオンを含んでいる。ほとんどの第一級、第二級又は第三級アミノ基が好ましく、第四級アンモニウム基、アミジニウム基、ピリジニウム基、又はグアニジノ基が含まれる。上記分子成分の特に有利な例はリン脂質のリン酸基である。

40

#### 【0019】

本発明によれば、これらの両性物質の一定の電荷は、上記可変電荷によって過補償されなければならない。過剰の可変電荷担体を用いた場合にのみこのことが可能である。カチオンとして第三アミンを用いた場合、例えば、本発明の意味での両性物質を得るために少なくとも2つのカルボキシル基が必要である。カルボキシル基が1つだけの場合、アミンの正電荷だけを補償することが可能であり、分子は完全に再電荷され得ない。完全に解離した基を用いた場合の一つの利点は極性が大きいことである。

特に好ましい方法においては、両性物質は完全な構造部分の形であり得る。例えば、これはo-, m-又はp-アミノ安息香酸、イミダゾールカルボン酸、イミダゾール二酢酸、また、ニコチン酸又はピコリン酸における例である。

50

例えば、他の有利な化合物は、-(1-ピペラジノ)アルキルカルボン酸、ウロカニン酸、4-(2-アミノエチル)イミダゾール-マレイン酸モノアミド、4-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾール-マレイン酸モノエステル、(2-アミノエチル)モルホリン-マレイン酸モノアミド又は類似化合物である。

【0020】

pK<sub>a</sub>が4~8のpH感受性カチオン：

好ましいカチオンは、イミダゾール、ピペラジン、モルホリン、プリン、又はピリミジンである。本質的にこの特性を有する他の有利なカチオンは、窒素塩基が含まれる。特に窒素塩基が環システムの形である場合、結合スパーサーが有機カチオンの種々の位置に置換されている有利な位置異性体が存在する。便利には、有機カチオンのpK<sub>a</sub>値は前記位置異性によって影響され得る。関連した基本的法則が当業者に周知である。或いは、これらの作用は表の編集から測ることができる (Handbook of Chemistry and Physics, Vol. 73, pp. 8-37ff.)。 10

更に詳しくは、有利な有機カチオンは次の種類の物質：

o-, m-, p-アニリン； 2-, 3-又は4-置換アニシジン、トルイジン又はフェネチジン； 2-, 3-, 5-, 6-, 7-又は8-置換ベンズイミダゾール、2-, 3-, 4-又は5-置換イミダゾール、1-又は5-置換イソキノリン、2-, 3-又は4-置換モルホリン、2-, 3-又は4-置換ピコリン、1-, 2-又は3-置換ピペラジン、2-, 5-又は6-修飾プテリン、3-, 4-, 5-, 6-又は9-置換プリン、2-又は3-置換ピラジン、3-又は4-置換ピリダジン、2-, 3-又は4-修飾ピリジン、2-, 4-, 5-又は6-置換ピリミジン、1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-又は8-置換キノリン、2-, 4-又は5-置換チアゾール、2-, 4-又は6-置換トリアジン、又はチロシン誘導体 20  
によって表される。

【0021】

上記ピペラジン、イミダゾールやモルホリン、プリン又はピリミジンが特に好ましい。生物系において存在するような分子断片、即ち、例えば：4-イミダゾール(ヒスタミン、ヒスチジン自体)、2-, 6-又は9-プリン(アデニン、グアニン、アデノシン、又はグアノシン)、1-, 2-又は4-ピリミジン(ウラシル、チミン、シトシン、ウリジン、チミジン、シチジン)、又はピリジン-3-カルボン酸が非常に好ましい。上記構造上の断片は置換基が追加されてもよい。例えば、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピルの残基、更に好ましくは1つ又は2つのヒドロキシル基を含むヒドロキシル化の形であり得る。また、環系内のヒドロキシル官能又はケト官能であり得る。 30

例えば、好ましいpK<sub>a</sub>値を有する窒素塩基は、ヒドロキシメチル基又はヒドロキシエチル基のような低級アルカンヒドロキシルを有するアミンの1つ又は複数の置換によって形成される。この基から適切な有機塩基は、例えば、アミノプロパンジオール、トリエタノールアミン、トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン、ビス(ヒドロキシメチル)メチルアミン、トリス(ヒドロキシエチル)メチルアミン、ビス(ヒドロキシエチル)メチルアミン、又は適切に置換されたエチルアミンである。

好ましいpK<sub>a</sub>値を有する窒素塩基は、アミノ糖又はアミノ糖アルコールの中に見出すことができる。

【0022】

pK<sub>a</sub>値が3~7の両性物質のpH感受性アニオン：

好ましい方法においては、アニオン電荷担体はカルボキシル基である。あらゆるカルボン酸が電荷担体として使用し得ることは明らかである。特に、これらはC原子8個までとエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有する脂肪族直鎖又は分枝鎖カルボン酸が含まれる。化合物の具体的な成分は、カルボキシル基自体、脂肪族鎖に結合した、酢酸、プロモ酢酸、クロロ酢酸、アセト酢酸、プロピオン酸、アルリル酸、酪酸、クロトン酸、又は高級カルボン酸、モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合した、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、グルタル酸、アジピン酸、カプリル酸、ピメリン酸、スペリン酸、シクロヘキサンジカルボン酸又はシクロペンタンジカルボン酸のようなジカルボン酸、モノエステル化又はアミノ化又は脂肪族鎖に結合した、ク 50

エン酸、イソクエン酸又はエチレンジアミン四酢酸のようなオリゴカルボン酸である。

【0023】

化合物の他の有利な成分は、ヘテロ原子を介して側鎖に結合した、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸、リンゴ酸、酒石酸、アスパラギン酸又はグルタミン酸、アラニン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、プロリン、チロシン又はシステイン、又は他のアミノ酸又はヒドロキシ酸である。

適切な特性を有するカルボン酸は、また、芳香族系の置換基として、例えば、安息香酸、アニス酸、o-、m-又はp-ヒドロキシ安息香酸として、ジヒドロキシ安息香酸、没食子酸、ケイ皮酸、フェニル酢酸、馬尿酸、フタル酸、テレフタル酸、2-、3-又は4-ピリジンカルボン酸、フランカルボン酸として見出すことができる。他のアニオン基は、解離可能なヒドロキシル又はチオール、例えば、アスコルビン酸、N-置換アロキサン、N-置換バルビツール酸、ペロナール、フェノールに存在するもの、又はチオール基である。

【0024】

両性物質としてのペプチド：

本発明の好適実施態様においては、両性物質は2~6個のアミノ酸を含むペプチドである。他の実施態様においては、両性物質を形成し且つその電荷特性を求める特に好ましい方法で、特にアミノ酸のヒスチジン、アルギニン、リシン、グルタミン酸、又はアスパラギン酸が用いられる。他の好ましいアミノ酸は、グリセリン、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、また、システインであり、極性を増大するので両性物質の溶解度を上げるように寄与する。そのようなペプチドの特に好ましい組成を、アミノ酸全体の%として下記表1に示す。

【表1】

アミノ酸	His	Arg/Lys	Asp/Glu	条件
i	66%まで	---	66%まで	His, Asp/Glu ≠ 0
ii	---	< 50%	> Arg/Lys	Arg/Lys, Asp/Glu ≠ 0
iii	≤ 33%	≤ 33%	> Arg/Lys	すべて≠ 0

表中、i)は2つのpH感受性成分、ii)1つの一定の成分と1つのpH感受性成分、iii) i)とii)の混合物の場合を示す。個々のアミノ酸の配列は任意であり、組成全体が主として電荷特性を決定する。ペプチドの末端基は、C末端の場合にはアミドの形で、N末端の場合にはアセチルで遮断される。

【0025】

スペーサー：

分子断片：- Y - スペーサー - Xは両性物質と両親媒性物質との間に位置する。スペーサーは、スペーサーC原子0~8個を有し、エチレン系不飽和結合0、1又は2個を含む直鎖、分枝鎖又は環状構造の低級アルキル残基である。スペーサーは、分子の極性を高めるようにヒドロキシル基を有してもよい。特に、スペーサーは糖、有利には、モノマー単位を20個まで含むことができるポリエチレングリコールであり得る。

【0026】

X及びY：

好適方法においては、結合基Xは、構造-(C=O)-O-；-(C=O)-NH-；-NH-(C=O)-O-；-O-；-NH-；-CH=N-又は-S-S-を含んでいる。有利には、結合基Yはその構造が基Xに対応し、更に構造-O-(O=C)-；-S-(O=C)-；-NH-(O=C)-；-O-(O=C)-NH-；又は-N=CH-を含むことができる。X及び/又はYは欠除部分であり得る。即ち、それらの存在を必要としない。例えば、Y基は両性物質が直接両親媒性物質にカップリングすることができる場合には、例えば、イミダゾール-4,5-ジカルボン酸のジパルミトイルグリセロールによるエステル化においては省くことができる。

【0027】

合成法

個々の分子成分の化学カップリングを行う方法は当業者に周知であり、用いられる開始物質やカップリング成分によって変えることができる。典型的な反応は、エステル化、アミノ化、二重結合へのアミンの付加、エーテル化、又は還元的アミノ化である。

特に好ましい分子は

- i) ジアシルグリセロールのエステル化、
  - ii) ジアシルグリセロール半コハク酸塩のエステル化又はアミノ化、
  - iii) ジアシルグリセロール半リンゴ酸塩の二重結合へのアミンの付加、
  - iv) ホスファチジルエタノールアミン又はホスファチジルセリンのアミノ化、
  - v) 3-アミノ-1,2-プロパンジオールジエステルのアミノ化又はアルキル化、
  - vi) ホスファチジルグリセロールの酸化と続いての還元的アミノ化、
  - vii) グリセルアルデヒドの還元的アミノ化と続いてのアシル化
- により調製し得る。

10

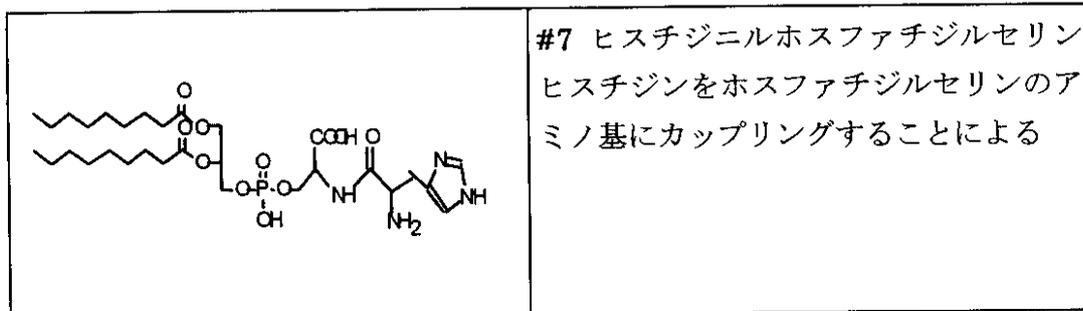
特に好ましい化合物としては、次の実施態様が含まれる(両親媒性物質の長鎖炭化水素鎖は、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル、リノレオイルの残基に対応する略号で表される)。

20

リン脂質

【0028】

【化4】



30

40

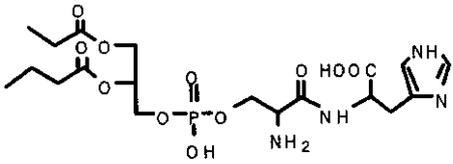
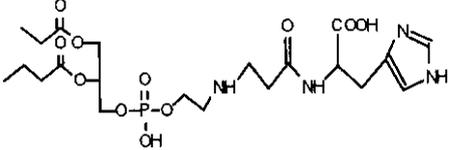
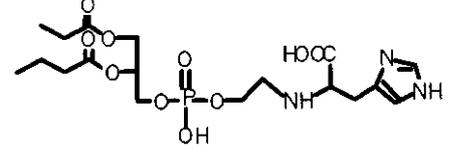
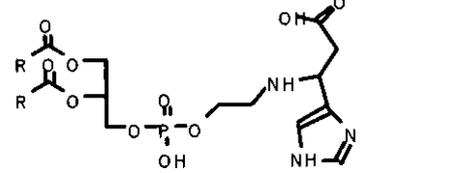
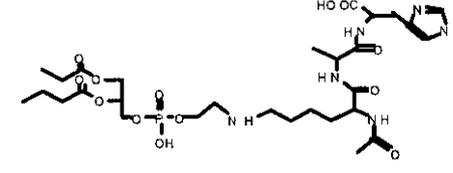
50

10

20

【 0 0 2 9 】

## 【化5】

	<p><b>#26</b> ホスファチジルセリルヒスチジン ヒスチジンをホスファチジルセリンのカルボキシル基にカップリングすることによる</p>
	<p><b>#25</b> ホスファチジルグリセロール誘導体 カルノシンのカップリングは反応vi)に従って行われる</p>
	<p><b>#29</b> ホスファチジルグリセロール誘導体 カップリングはヒスチジンと反応vi)に従って行われる</p>
	<p><b>#28</b> N-ホスファチジルエチル-3-アミノ-5-イミダゾイルカルボン酸: a) iii)によるホスファチジルエタノールアミンのウロカニン酸への付加又はb)β-ヒスチジンとホスファチジルグリセロールとのvi)による</p>
	<p><b>#31</b> アセチル-Lys-Ala-His vi)に従ってLysのアミノ基側鎖を介してDPPGにカップリングする</p>

10

20

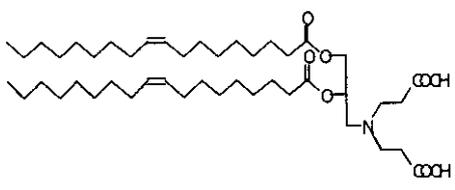
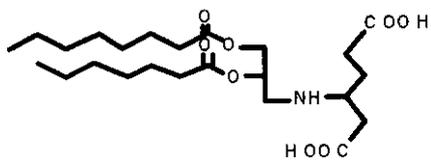
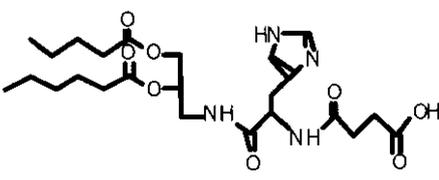
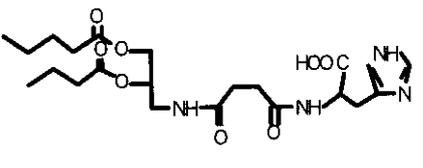
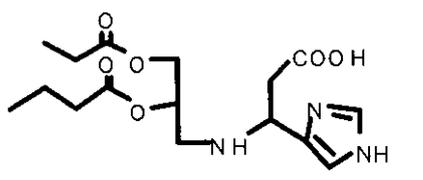
30

40

## 1-アミノ-2,3-プロパンジオール

【 0 0 3 1 】

【 化 6 】

	<p><b>#8</b> アクリル酸を1-アミノ-2,3-プロパンジオールへ付加した後、アシル化</p>	10
	<p><b>#32</b> ホモグルタミン酸とジアシル化1-ヨード-2,3-プロパンジオールの縮合生成物</p>	20
	<p><b>#36</b> CBZ-ヒスチジンのジアシル化 1-アミノ-2,3-プロパンジオールへのカップリング; 脱保護; コハク酸無水物によるカップリング</p>	30
	<p><b>#37</b> コハク酸無水物のジアシル化1-アミノ-2,3-プロパンジオール; ベンジル保護ヒスチジンのカップリング; 脱保護</p>	40
	<p><b>#38</b> β-ヒスチジンのジアシル化1-ヨード-2,3-プロパンジオールへの結合</p>	50

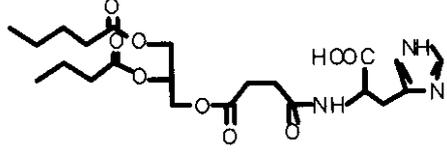
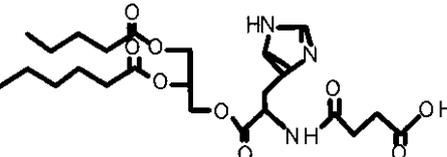
【 0 0 3 2 】

50

## ジアシルグリセロール

【 0 0 3 3 】

【 化 7 】

	<p><b>#34</b> ヒスチジンのジアシルグリセロール半コハク酸塩への結合</p>
	<p><b>#35</b> ヒスチジンのジアシルグリセロールへの結合後、コハク酸無水物によるカップリング</p>

10

20

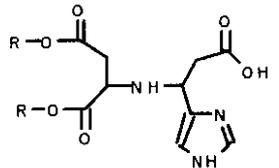
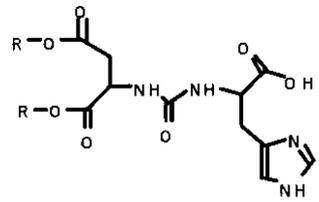
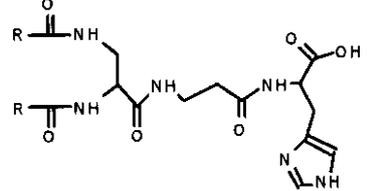
【 0 0 3 4 】

## ジカルボン酸とジアミン

長鎖両親媒性物質は、ラウリル、ミリスチル、パルミチル、ステアリル、オレイル、リノレイルの残基に対応する略号で表される。

【 0 0 3 5 】

【 化 8 】

	<p><b>#50</b> N-(アスパラギン酸ジヒドロキシアルキル)-3-アミノ-5-イミダゾールカルボン酸、アスパラギン酸ジエステルウロカニン酸への付加により調製し得る</p>
	<p><b>#51</b> N-(アスパルチルジヒドロキシアルキル)-N'-ヒスチジニルウレア</p>
	<p><b>#52</b> 2,3-ジアミノプロピオン酸のジアシル化トリペプチド、<math>\beta</math>-アラニンとヒスチジン</p>

30

40

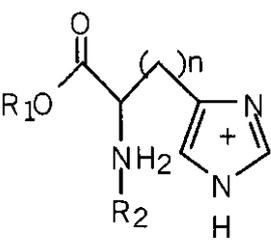
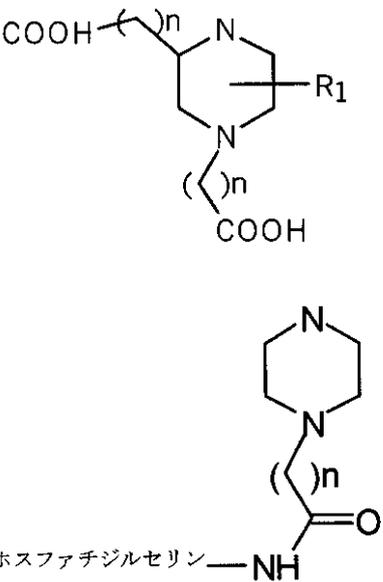
【 0 0 3 6 】

特に好ましい両性成分としては、例えば、下記化合物が含まれ、ここで、 $R_1$  及び  $R_2$  は両親媒性物質であり、( ) $n$  は上で定義したスペーサーの追加の分子部分である。

【 0 0 3 7 】

50

## 【化9】

	<p>ヒスチジン誘導体</p> <p>両親媒性物質のカップリングはアミノ基を介した<math>R_2</math>として進行することが好ましい。</p> <p>この場合、<math>R_1</math>はアニオンであり、例えば、H又はヒドロキシカルボン酸又は1種以上のアミノ酸であり得る。カップリングが<math>R_1</math>を介して進行する場合、<math>R_2</math>はアニオン残基、例えば、カルボン酸又はジカルボン酸である。</p>
 <p>ホスファチジルセリン—NH</p>	<p>ピペラジン誘導体</p> <p>両親媒性物質のカップリングは環原子の1つを介して進行することができる。側鎖がヒドロキシカルボン酸又はアミノ酸である場合には、カップリングはこれらのヘテロ原子を介して有利に進行することができる。</p> <p>左の好ましい誘導体はピペラジンのホスファチジルセリンの<math>N\alpha</math>へのカップリングを示している。</p>

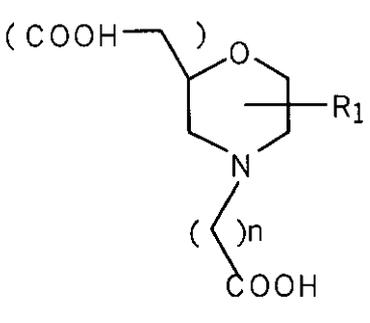
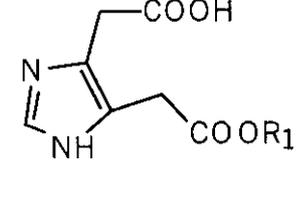
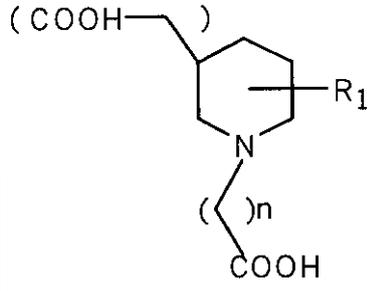
10

20

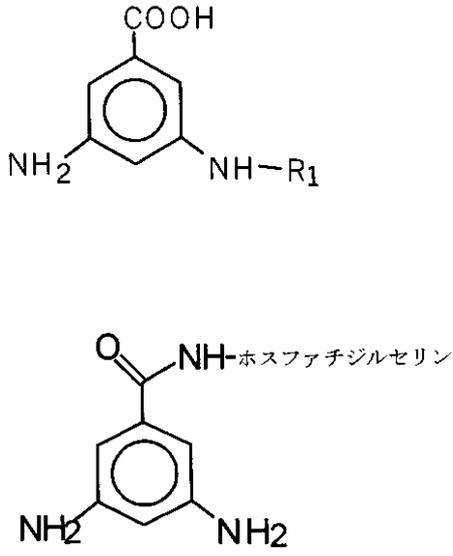
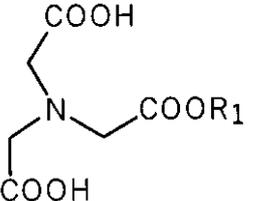
30

40

## 【化10】

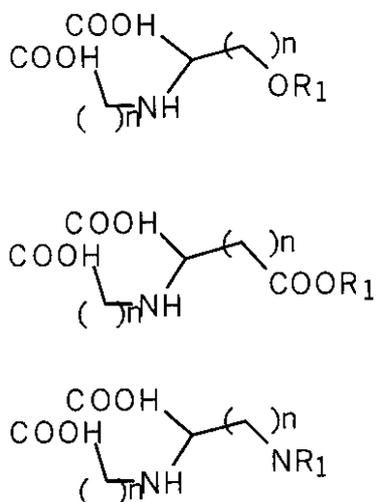
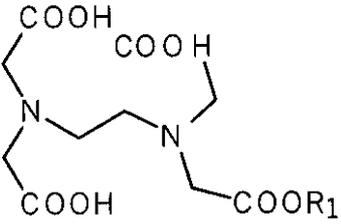
	<p>モルホリン誘導体</p> <p>両親媒性物質のカップリングは環原子の1つを介して進行することができる。側鎖がヒドロキシカルボン酸又はアミノ酸である場合には、カップリングはこれらのヘテロ原子を介して有利に進行することができる。</p>	10
	<p>イミダゾール-4,5-二酢酸の誘導体</p> <p>両親媒性物質のカップリングは2つの酢酸官能のいずれかを介したエステルとして進行することが好ましい。両親媒性物質は3-アミノ官能を介して結合することもできる。</p>	20
	<p>ピペリジン誘導体</p> <p>両親媒性物質のカップリングは環原子のいずれかを介して進行することができる。側鎖がヒドロキシカルボン酸又はアミノ酸である場合にはカップリングはそれらのヘテロ原子を介して有利に進行することができる。</p>	30

## 【化11】

	<p>ジアミノ安息香酸誘導体</p> <p>両親媒性物質のカップリングは2つのアミノ基のいずれかを介して進行することが好ましい。第2アミノ基は、例えば、高いpK<sub>a</sub>値を得るようにアルキル化し得る。</p> <p>ホスファチジルセリンのアミドとしてのカップリングは本発明の他の好適実施態様である。</p>	10
	<p>ニトリロ三酢酸誘導体</p> <p>両性基はニトリロ三酢酸のエステル化によって形成される。更に、そのような化合物の電荷特性は金属イオンの錯体形成により修飾し得る。</p>	20

## 【0040】

## 【化12】

	<p>N-アルキルカルボキシアミノ酸誘導体</p> <p>両性化合物はステロールをN-アシルアミノ酸の末端基へのカップリングによって形成される。有利には、セリン、アスパラギン酸又はグルタミン酸、又はリシン又はオルニチンから構造が誘導し得る。アミノジカルボン酸のカップリングは末端だけでなく他の酸基でもあり得る。更に、そのような化合物の電荷特性は金属イオンの錯体形成によって修飾し得る。</p>	30
	<p>EDTA誘導体</p> <p>両性基はエチレンジアミン四酢酸のエステル化によって形成される。更に、そのような化合物の電荷特性は金属イオンの錯体形成によって修飾し得る。</p>	40

## 【0041】

本発明は、また、本発明の化合物を含むリポソームに関する。本発明の化合物は、電荷状態が周囲の媒体のpHを変化させる場合に可逆的な変化を受けることを特徴とする両性リポソームを形成するためにリポソーム膜内に多量に取り込み得る。リポソームは等電点より低いカチオンであり、アニオンは前記点より高い。

本発明の成分を含むリポソームは、そのような物質を表面上に1回又は複数回付着させることが可能である適切な条件下にポリマーで被覆し得る。複数回の付着においては、場合によっては架橋剤の存在下にリポソームナノカプセルが形成される、前記リポソームを製造する方法は、例えば、国際出願第00/28972号又は同第01/64330号から当業者に既知であり、これらの明細書の記載は本願明細書に含まれるものとするので、開示の一部と判断される。本発明の物質を用いた場合に特に有利な一つの実体は、ポリマーとの静電相互作用が高分子電解質である場合には中断され得ることである。周知のように、高分子電解質とリポソーム膜の電荷担体との相互作用は、膜成分のデミキシングや脂質クラスタの形成を生じることがある。多くの場合、そのようなデミキシングはリポソームの透過化に随伴する。本発明の物質は、コーティング工程後のこの相互作用の脱離を可能にする。この時点でpH値を上げた場合、リポソームは立体方法で単にナノカプセルに入り込み、膜と高分子電解質間の相互作用は存在しなくなる。有利には、脂質のクラスタ形成と関連のある膜の透過化はこのように回避することができる。

## 【0042】

驚くべきことに、本発明の物質をその膜内に含むリポソームは物質の等電点より低い他の膜、特に細胞膜との融合を容易に受けることがわかった。一般に、このステップには膜内に多量のPEの存在が必要である。六方晶系の相を形成する傾向の結果として、前記PEにはヘルパー脂質の機能が考えられる。しかしながら、そのような劣った膜の安定性は不利であり、入り込んだ活性物質が漸次放出することがしばしば見出される。

有利には、本発明の物質を用いて製造されるリポソームはヘルパー脂質の存在しないうちでさえ有効な融合を受け得る。従って、本発明の物質を用いた場合、活性物質を安定に封入することができるリポソームを製造するが、低pH値の条件下で細胞膜との融合を受けてその場所で活性物質を放出することが可能である。

## 【0043】

本発明の好適な実施態様においては、両性脂質の割合は最大で全脂質の30モル%、40モル%、50モル%を含んでいる。少なくとも2モル%の両性脂質、最大で50モル%を含む組成物が特に有利である。少なくとも5モル%の両性脂質、好ましくは10モル%で最大で50モル%を含む組成物が特に好ましい。本発明の物質を含むリポソームの製造は、当業者に周知の手法に従って進行する。

本発明の他の好ましい実施態様においては、リポソームは、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジアシルグリセロール、セラミド、スフィンゴ脂質、テトラエテル脂質及び/又はPEG脂質を含んでいる。本発明の化合物は、それ自体でリポソームを常に形成せず、それ故上記脂質を添加することが有利であってもよい。

本発明の他の実施態様においては、リポソームの平均粒径は50~1000 nm、好ましくは50~500 nm、更に好ましくは50~300 nm、特に好ましくは60~130 nmである。

## 【0044】

便利には、リポソームはがんの治療や重篤な感染症の治療に使用し得る、特に水溶性の活性物質が封入される。このために、リポソーム分散液が注射、注入又は植込まれ得る。その後、血液又はリンパ液に配分されるかデポとして制御された方法で活性物質を放出する。後者は、ゲルの形で非常に濃縮された分散液により達成し得る。リポソームは、また、皮膚に局所適用として使用し得る。特に、様々な活性物質を皮膚へ又は皮膚を通過して体内へさえも浸透改善に寄与することができる。更に、リポソームは遺伝子移入に使用し得る。そのサイズと電荷のために、遺伝物質は助剤なしで細胞に入ることができない。このため、リポソーム又は脂質複合体のような適切な担体が必要であり、DNAと共に各々の細胞によって効率良く、好ましくは十分に特定された方法で吸収されなければならない。

10

20

30

40

50

更に有利には、活性物質は、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、アンチセンスヌクレオチド、及び/又はデコイヌクレオチドである。それらの主な構造においては、リポソームは細胞膜と非常に類似している。それ故、膜を通る活性物質の透過率又は活性物質の膜結合を定量するために膜モデルとして使用し得る。

#### 【0045】

本発明の特に好ましい実施態様においては、脂質1 mgに対して少なくとも50  $\mu$ g、更に有利には100  $\mu$ g、好ましくは150  $\mu$ gの活性物質がリポソーム内に入り込んでいる。必要な場合には、外部に付着している取込まれていないカーゴ分子を、簡単にpH値を上げることにより除去し得る。このステップは、取込まれていないカーゴ分子がリポソームの凝集を生じるすべての場合に必要である。本発明の成分を用いた場合に有利な一実体は、入り込んだ活性物質が実際の封入物の期間だけ脂質層と相互作用を可能にする条件下で維持されなければならないことである。脂質層がそれ自体に密封されたままであると、他の条件に変化させることが可能である。よって、特にタンパク質の活性物質の起こりうる不活性化を最小限にすることができる。

10

#### 【0046】

本発明は、また、封入のための結合pH値と非結合活性物質を除去する第二pH値を用いて、リポソームを活性物質で充填する方法に関する。

更に、本発明は、リポソームを活性物質で充填する方法であって、リポソームを特定のpH値で透過性にし、続いて密封する、前記方法に関する。特に、透過性の変化はリポソームを充填する際に十分に特定された方法で使用し得る。このために、封入される活性物質は高透過性の条件下で媒体に添加することができ、続いて低透過性の条件を調整することができる。このように、活性物質はリポソームの内部に保たれる。その後、必要な場合には、入り込んでいない活性物質を除去することができる。そのような透過性の変化はリポソーム又はリポソームナノカプセルに対して誘導することができる。

20

本発明は、また、診断や放出システムにおけるリポソームの使用に関する。リポソームが検出システムで使用し得ることも明らかである。特に、リポソームは、蛍光がキレート形成によって増強される金属イオン、例えば、テルビウムイオン又はユーロピウムイオンで充填し得る。そのような使用のリポソームは、特異性を求める成分、即ち、抗体、レクチン、セレクチン、受容体、又はホルモン、又はRNAアプタマーを含むことができることは当然のことである。本発明の使用の特に好ましい実施態様においては、これらの金属イオンの存在は外部に付着している徐々に放出された金属イオンから非特異的シグナルを避けるようにリポソームの体積に制限される。また、ナノカプセルの製造にリポソームを用いることも便利である。リポソームは、診断において放出システムの製造に有利に使用し得る。

30

#### 【0047】

活性物質の輸送及び/又は放出のための使用も便利である。有利には、リポソームはデポ製剤及び/又は循環デポとして使用し得る。細胞を生体内、試験管内又は生体外でトランスフェクトするベクターとしてのリポソームの使用も有利である。例えば、リポソームは静脈内適用及び/又は腹腔内適用において使用し得る。

本発明の化合物とリポソームはいくつかの利点を含んでいる。驚くべきことに、本発明のリポソームの透過性はpH値、従って、前記化合物の電荷状態に左右することが求められた。

40

それ故、本発明の構造を用いて製造されたリポソームは、活性物質の放出が媒体のpH値に依存して進行するはずである放出システムを構築するのに特に適している。

驚くべきことに、平均より多いタンパク質又はDNAの量、脂質1 mg当たり少なくとも50  $\mu$ g、好ましくは100  $\mu$ g、更に好ましくは150  $\mu$ gを本発明の化合物を膜内に含むリポソームに封入し得ることがわかった。そのような取込みの効率は、用いられる溶液のpH値に左右される。それ故、リポソーム内のタンパク質又はDNAの効率の良い封入方法は、はじめにカーゴ分子の脂質層への結合が良好になるpH値を調整することにより行うことができる。ポリアニオンとしてのDNAにおいては、約4~5の低pH値が用いられる。タンパク質にお

50

いては、有効なpH値はタンパク質の等電点に左右され、本発明の物質の等電点より低くなければならない。媒体のpH値がタンパク質の等電点と本発明の化合物の等電点との間の範囲にあるように選ばれる場合、封入が特に効果的である。そのとき、タンパク質の電荷は負であり、脂質層の電荷は正である。

驚くべきことに、例えば、ヒスチジニル-PS又はヒスチジニルジアシルグリセロール半コハク酸塩をその膜内に含むリポソームは金属イオンをキレート化することができることがわかった。この特性によってリポソームの正電荷が増大する。化合物の固有の電荷がこの場合には小さいことから、この作用は中性pH値で特に強い。キレート化特性のために、そのようなリポソームは生化学診断や薬剤治療に使用し得る。

#### 【0048】

実験のため又は治療のためのリポソームの使用に対して不可欠な一必須条件は、細胞や組織との適合性である。細胞内にDNA又はタンパク質を取込むために用いられる多くの周知の化合物(例えば、カチオン脂質DOTAP)は細胞毒性である。驚くべきことに、本発明の化合物の一部は低細胞毒性であることがわかった。特に、このことは両性物質がアミノ酸又はペプチドであるそのグループの化合物に当てはまる。それ故、これらの化合物は、トランスフェクションシステムの必須条件の一つを満たしている。

細胞への遺伝子又はタンパク質輸送において用いられるベクターの構築に対する他の必須条件は、血清又は血液との適合性である。カチオン電荷が強いために、現在知られるベクターは制御できない大きな凝集体を形成し、結果として生物体内で血栓が形成される。それ故、生体内使用は実際には不可能であり、試験管内又は生体外適用に制限される。驚くべきことに、本発明の成分を用いて作られたリポソームは血清又は血液中で少しの凝集体も形成しない。特に、これらは等電点が7.5より低いリポソームである。

タンパク質又は遺伝子移入に用いられるベクターの構築に対する他の必須条件は、生理的条件下で安定性があることである。血液循環に適用する際、リポソームは、補体系の成分によって攻撃され、急速な溶解を受ける。この反応は数秒以内に進行する。結果として、膜内に細孔が形成され、タンパク質のような大きな分子がそれを通して拡散することができる。現在、この機構についてリポソームの安定化は脂質層内にコレステロールを取込むことによってのみ可能である。そのようなリポソームは非常に安定であるが、細胞と相互作用すること又は活性物質を容易に放出させることはできなくなる。驚くべきことに、本発明の成分を用いて作られたリポソームは血清又は血液中数時間安定であることがわかった。そのような条件下でさえ、活性物質の放出は少量である。活性物質を輸送するためのリポソームベクターは、少なくとも3種の必須条件：毒性が低くなければならないこと、活性物質をしっかりと安定に入り込ませなければならないこと、及び血清又は血液と適合しなければならないことを満たさなければならない。

#### 【0049】

有利には、これらの3種の必須条件はすべて本発明の選ばれた物質を用いて製造されたリポソームによって満たされる。それ故、リポソームは治療使用によく適している。そのような使用を支持する他の特性は、活性物質による良好な充填性やpH値の変化又は膜の透過化によるこれらの物質の十分に特定された除去である。本発明の物質を用いて製造したリポソームは、細胞表面に対する非特異的結合が低い。この非特異的結合が低いことは標的細胞に対して特異結合を達成するための重要な必須条件である。伝達体の標的制御は、リガンドを添加した上記リポソームを提供する場合に得られる。結果として、活性物質は病状を示す細胞又は組織において特異的に蓄積し得る。

それ故、本発明の物質の重要な一使用は、生物において活性物質の伝達用ベクターの構築のためである。ベクターは、タンパク質又はDNAのようなそれ自体は細胞膜を透過することができず、血流においても急速な分解を受ける治療巨大分子の輸送に特に適している。

驚くべきことに、米国第6,255,344号に開示されるような炭化水素鎖が1つだけの両性両親媒性物質は炭化水素鎖が12個を超えるCH<sub>2</sub>基であれば本発明の両性リポソームの製造に適していることがわかった。有利には、上記リポソームは、上記方法に従って活性物質、

10

20

30

40

50

特にDNA又はオリゴヌクレオチドで充填することができ、細胞のトランスフェクションや遺伝子治療における使用は本発明の開示に含まれるものとする。

驚くべきことに、長鎖  $\alpha$ -アミノカルボン酸による長鎖脂肪酸のアミノ化によって形成され且つヒスチジンのような両性基を備えた二重鎖両親媒性物質が両性リポソームの製造に適していることがわかった。有利には、そのようなリポソームは上記方法に従って活性物質、特にDNA又はオリゴヌクレオチドで充填することができ、細胞のトランスフェクションや遺伝子治療における使用は本発明の開示に含まれるものとする。

#### 【実施例】

#### 【0050】

次の実施例によって本発明を制限することなく更に詳細に説明する。

10

#### 実施例 1

L-ヒスチジニル-ジパルミトイルグリセロールコハク酸塩 (DG-Succ-Hist、#34)の合成

DG-Succ-Histを合成するために、3ミリモル(2 g)のジアシルグリセロールコハク酸塩(Avanti)を3.3ミリモル(0.81 g)のベンジル保護ヒスチジン、3.45ミリモル(0.71 g) DCC、3.45ミリモル(0.42 g)のDMAPと溶媒として50 mlのジクロロメタン中で反応させる。反応バッチを室温で一晩攪拌する。アミドカップリングに続いて、ヒスチジンのカルボニル基を10%パラジウム/炭素による接触水素化分解と水素雰囲気下で攪拌することによって脱保護する。反応バッチを減圧下で濃縮し、シリカゲル60によるカラムクロマトグラフィーを用いて精製する。クロロホルム/メタノール/アンモニア(25%溶液) 60:40:2を溶離剤として用いる。

20

#### 【0051】

#### 実施例 2

化合物#35 (DG-Hist-Succ)の合成

DG-Hist-Succの合成を3段階で行う。まず、3.7ミリモル(2 g)のジパルミトイルグリセロールを4.1ミリモルのアミノ保護CBZ-ヒスチジンでエステル化する。4.3ミリモル(0.67 g)のEDCと4.3ミリモル(0.53 g)のDMAPを60 mlのジクロロメタン中で添加してエステルを形成する。バッチを4時間攪拌する。ヒスチジンアミノ官能を脱保護して中間体DG-Histを得る。10%パラジウム/炭素による接触水素化分解と水素雰囲気下で一晩攪拌することによってアミノ基を脱保護する。第二段階でコハク酸無水物をベンジルアルコールで開鎖してベンジルコハク酸塩を形成する。10ミリモル(1 g)のコハク酸無水物と9.5ミリモル(1 g)のベンジルアルコールを50 mlのトルエンに溶解する。1ミリモル(190 mg)のp-トルエンサルホン酸1水和物を添加した後、2時間加熱還流する。最終段階で、2ミリモル(0.42 g)のベンジル保護コハク酸塩をアミド結合によって1.6ミリモル(1.13 g)のDG-Histにカップリングする。2.5ミリモル(0.39 g)のEDCと2.5ミリモル(0.3 g)のDMAPを50 mlのジクロロメタン中で添加して室温で4時間攪拌しながら反応させる。最後に、コハク酸塩を10%パラジウム/炭素による接触水素化分解を用いてベンジル残基を切断するとともに水素雰囲気下で一晩攪拌することにより脱保護する。反応バッチを減圧下で濃縮し、シリカゲル60によるカラムクロマトグラフィーを用いて精製する。溶離剤としてクロロホルム/メタノール/アンモニア(25%溶液) 60:40:2を用いる。

30

#### 【0052】

40

#### 実施例 3

化合物#8、N,N-ビス(プロパン酸-3-イル)-N-(2,3-ジオレオイルオキシプロピル)アミンの合成

所望の化合物の合成は3段階によって進行する。

第一段階では3-アミノ-1,2-プロパンジオールのアミノ基をtert-ブチルアクリレートで保護する。111ミリモル(10 g)の3-アミノ-1,2-プロパンジオールを100 mlのアセトニトリルに入れる。222ミリモル(28.5 g)のtert-ブチルアクリレートを保護ガスの下で添加し、バッチを2日間加熱還流する。反応混合液を回転蒸発器で濃縮し、シリカゲルによるカラムクロマトグラフィーを用いて精製する。溶離剤として酢酸エチル/メタノール9:1を用いる。

50

次の段階でステップ1からの17.7ミリモル(6.15 g)の中間体と35.4ミリモル(10 g)のオレイン酸を100 mlのジクロロメタンに入れる。保護ガスの下で氷浴中で冷却しながら反応を行う。35.4ミリモル(7.3 g)のジシクロヘキシルカルボジイミドを添加した後、氷浴を取り除き、バッチを室温で1日間攪拌する。沈殿したウレアをろ別し、その溶液を回転蒸発器で濃縮する。生成物を未精製状態で用いる。その後、保護基を除去する。このために、ステップ2からの11.5ミリモルの中間体を25 mlのジクロロメタンに入れる。25 mlのトリフルオロ酢酸を氷水で冷却しながら徐々に添加する。これを40 で1日間攪拌する。溶媒を除去した後、シリカゲルによるカラムクロマトグラフィーを用いて残留物を精製する。溶媒とし酢酸エチル/石油エーテル1:1を用いる。得られた油状物を約50 mlのアセトンに溶解し、1 N 炭酸水素ナトリウム溶液を用いてわずかにアルカリ性に調整する。これを遠心分離し、上澄みを捨てる。残留物を少量のアセトンで超音波浴中で処理し、遠心分離し、上澄みを捨てる。残留物を30 mlのクロロホルムに溶解し、その上に層として30 mlの水を入れる。これを1 N HClで激しく攪拌しながらpH 5に調整する。有機相を取り除き、硫酸ナトリウムで乾燥し、回転蒸発器で濃縮する。

10

【0053】

## 実施例 4

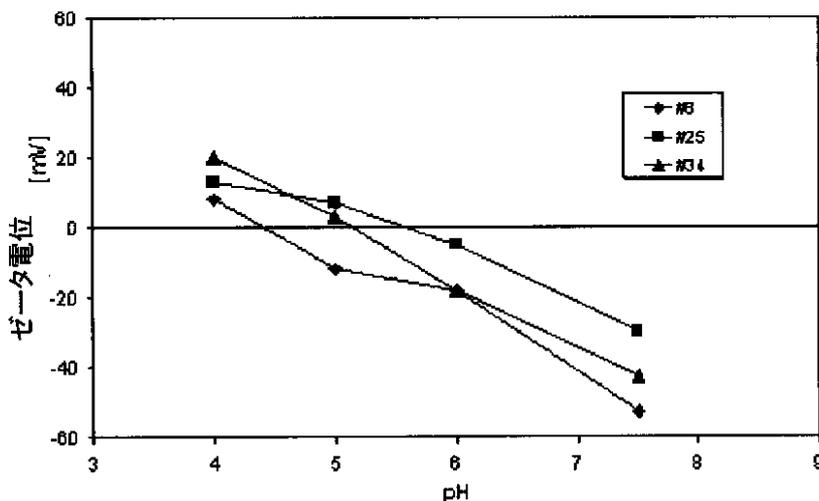
## 両性リポソームの調製

2 mgの対応する脂質と10 mgのDMPCを4 mlのクロロホルム/メタノール(1:1 v/v)に溶解し、回転蒸発器で完全に乾燥する。脂質膜を4.3 mlの緩衝液(10 mM Kac、10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.5)で5 mMの脂質濃度に超音波処理を用いて5分間水和する。最後に、懸濁液を凍結し、解凍後、複数回押し出しに供する(Avestine LiposoFast、ポリカーボネートフィルター、孔幅200 nm)。種々のpH値におけるゼータ電位/mVのプロファイルを図1に示す。ゼロ点はリポソームが放電したpH値を意味する。このpHは脂質の等電点に対応し、#8については4.5、#34については5.2、#25については5.7である。

20

【0054】

【化13】



30

図 1

40

【0055】

## 実施例 5

## 化合物#25 (ホスファチジルグリセリルカルノシン)のその場合成

単層リポソーム(DPPC/DPPG/コレステロール40:20:40モル%)をホウ酸緩衝液(20 mMホウ酸ナトリウム、120 mM塩化ナトリウム、pH 8.4)中20 mM脂質の濃度で懸濁する。2 mlのこの溶液に400  $\mu$ lの0.6 M過ヨウ素酸ナトリウム溶液を添加し、その混合液を30分間暗所でインキュベートする。1 mlのこの懸濁液を上記で用いたホウ酸緩衝液中Sephadex G25によりクロマトグラフィー処理する。リポソーム懸濁液の溶離液を充填して4 mlにする。

50

このように酸化したりポソームにカルノシンを20 mMの最終濃度で添加し、2時間インキュベートする。最後に、これを20 mM水素化ホウ素ナトリウムで4 において一晚還元する。過剰量のカルノシンを上記のようにSephadex G25によるクロマトグラフィーで除去し得る。

【0056】

#### 実施例 6

##### リポソームの血清凝集の測定

140  $\mu$ lのヒト血清に10  $\mu$ lの25 mMリポソーム懸濁液をピペットを用いて添加し、十分に混合する。65  $\mu$ lのこの混合液を取り出し、1.5 mlの緩衝液(HEPES 10 mM、NaCl 150 mM、pH 7.5)で希釈する。残りを37 で2時間インキュベートし、続いて他の65  $\mu$ lを取り出し、1.5 mlの緩衝液で希釈する。Malvern Zetasizer 3000を用いて両試料の粒径を求める。同時に、37 で2時間同様にインキュベートした対照試料をブランク緩衝液中で記録する。粒径の変わらないことは、血清適合性の良好を意味する。

10

【0057】

#### 実施例 7

##### DNAプラスミドで充填した両性リポソームの調製

1.43 mMの両性脂質をクロロホルムに、脂質膜の脂質組成によっては他の脂質と共に溶解する。溶媒を除去した後、脂質膜を減圧下で一晩乾燥する。1 ml DNA含有(100  $\mu$ g DNA/ml) NaAc緩衝液(10 mM NaAc、150 mM NaCl、pH 4; わずかに超音波をかけた後、相転移温度より高い温度で30分間回転)で直接水和する。これに続いて凍結/解凍ステップが行われる。

20

その混合液を相転移温度より高い10 の温度で400 nm膜に15回押出す。

入り込んでいないDNAをスクロース勾配(pH 7.5で; 0.8 Mスクロース、0.5 Mスクロース、緩衝液)においてフロテーションにより除去し得る。

インターカレーション色素ヨウ化プロピジウムを用いてDNA含量を求め、DNAへのインターカレーションの場合には蛍光強度の増加が生じる。このために、20  $\mu$ lのヨウ化プロピジウムと6  $\mu$ lのTriton X-100 (10%/水)に試料を充填して300  $\mu$ lにし、蛍光プレートリーダーを用いて測定する。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 03/01662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07F9/6506 C07D233/64	C07K5/062 A61K9/127
	C07K5/078 C12N15/88	C07K5/09 C07C229/16
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)		
IPC 7	C07F C07K C07C C07D A61K C12N	
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 practical, search terms used)		
CHEM ABS Data, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEYES J A ET AL: "Synthesis of novel cationic lipids: Effect of structural modification on the efficiency of gene transfer" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 45, no. 1, 3 January 2002 (2002-01-03), pages 99-114, XP002219198 ISSN: 0022-2623 the whole document	1,14
X	EP 0 169 812 A (CIBA-GEIGY AG) 29 January 1986 (1986-01-29) the whole document	1
	--- -/-- ---	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 October 2003		22/10/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bestier, L

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No. ....  
 PCT/EP 03/01662

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 58849 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS ) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document ---	1
A	US 6 090 800 A (EVAN C. UNGER) 18 July 2000 (2000-07-18) the whole document ---	1-34
A	WO 00 59474 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 12 October 2000 (2000-10-12) cited in the application the whole document ---	1-34
A	WO 95 35301 A (MEGABIOS CORPORATION) 28 December 1995 (1995-12-28) the whole document ---	1-34
P,X	WO 02 072068 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LTD.) 19 September 2002 (2002-09-19) the whole document -----	1,14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 03/01662

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 169812	A	29-01-1986	AT 45744 T AU 582772 B2 AU 4537885 A DD 247680 A5 DE 3572491 D1 DK 337485 A EP 0169812 A1 ES 8701186 A1 FI 852841 A ,B, GR 851825 A1 HU 38360 A2 IL 75886 A JP 61043193 A NO 852953 A NZ 212860 A PT 80851 A ,B US 4788182 A ZA 8505580 A	15-09-1989 13-04-1989 30-01-1986 15-07-1987 28-09-1989 26-01-1986 29-01-1986 16-02-1987 26-01-1986 26-11-1985 28-05-1986 31-10-1989 01-03-1986 27-01-1986 27-03-1990 01-08-1985 29-11-1988 26-03-1986
WO 0158849	A	16-08-2001	ES 1045340 U1 WO 0158849 A1	16-08-2000 16-08-2001
US 6090800	A	18-07-2000	AU 6185398 A AU 6971998 A AU 6974798 A EP 1037673 A1 US 2003054027 A1 US 2002159951 A1 WO 9842383 A1 WO 9850040 A1 WO 9850041 A1 US 6444660 B1 US 6403056 B1 US 6028066 A US 6120751 A	20-10-1998 27-11-1998 27-11-1998 27-09-2000 20-03-2003 31-10-2002 01-10-1998 12-11-1998 12-11-1998 03-09-2002 11-06-2002 22-02-2000 19-09-2000
WO 0059474	A	12-10-2000	US 6379698 B1 AU 4221400 A EP 1165047 A1 JP 2002541089 T WO 0059474 A1 US 2003082154 A1	30-04-2002 23-10-2000 02-01-2002 03-12-2002 12-10-2000 01-05-2003
WO 9535301	A	28-12-1995	WO 9535301 A1 AU 696881 B2 AU 7471194 A CA 2194221 A1 EP 0807116 A1 JP 10506093 T NO 920172 A NZ 271165 A	28-12-1995 24-09-1998 15-01-1996 28-12-1995 19-11-1997 16-06-1998 15-01-1997 28-10-1998
WO 02072068	A	19-09-2002	WO 02072068 A2	19-09-2002

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen  
 PCT/EP 03/01662

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C07F9/6506 C07K5/062 C07K5/078 C07K5/09 C07C229/16 C07D233/64 A61K9/127 C12N15/88		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte der Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07F C07K C07C C07D A61K C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) CHEM ABS Data, EPD-Internal		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HEYES J A ET AL: "Synthesis of novel cationic lipids: Effect of structural modification on the efficiency of gene transfer" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, Bd. 45, Nr. 1, 3. Januar 2002 (2002-01-03), Seiten 99-114, XP002219198 ISSN: 0022-2623 das ganze Dokument	1,14
X	EP 0 169 812 A (CIBA-GEIGY AG) 29. Januar 1986 (1986-01-29) das ganze Dokument	1
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
14. Oktober 2003		22/10/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Beslier, L

## INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen  
 PCT/EP 03/01662

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	WO 01 58849 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS ) 16. August 2001 (2001-08-16) das ganze Dokument ---	1
A	US 6 090 800 A (EVAN C. UNGER) 18. Juli 2000 (2000-07-18) das ganze Dokument ---	1-34
A	WO 00 59474 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 12. Oktober 2000 (2000-10-12) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-34
A	WO 95 35301 A (MEGABIOS CORPORATION) 28. Dezember 1995 (1995-12-28) das ganze Dokument ---	1-34
P, X	WO 02 072068 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LTD.) 19. September 2002 (2002-09-19) das ganze Dokument -----	1,14

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/01662

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung			
EP 169812	A	29-01-1986	AT 45744 T	15-09-1989			
			AU 582772 B2	13-04-1989			
			AU 4537885 A	30-01-1986			
			DD 247680 A5	15-07-1987			
			DE 3572491 D1	28-09-1989			
			DK 337485 A	26-01-1986			
			EP 0169812 A1	29-01-1986			
			ES 8701186 A1	16-02-1987			
			FI 852841 A ,B,	26-01-1986			
			GR 851825 A1	26-11-1985			
			HU 38360 A2	28-05-1986			
			IL 75886 A	31-10-1989			
			JP 61043193 A	01-03-1986			
			NO 852953 A	27-01-1986			
			NZ 212860 A	27-03-1990			
			PT 80851 A ,B	01-08-1985			
			US 4788182 A	29-11-1988			
			ZA 8505580 A	26-03-1986			
			WO 0158849	A	16-08-2001	ES 1045340 U1	16-08-2000
						WO 0158849 A1	16-08-2001
US 6090800	A	18-07-2000	AU 6185398 A	20-10-1998			
			AU 6971998 A	27-11-1998			
			AU 6974798 A	27-11-1998			
			EP 1037673 A1	27-09-2000			
			US 2003054027 A1	20-03-2003			
			US 2002159951 A1	31-10-2002			
			WO 9842383 A1	01-10-1998			
			WO 9850040 A1	12-11-1998			
			WO 9850041 A1	12-11-1998			
			US 6444660 B1	03-09-2002			
			US 6403056 B1	11-06-2002			
			US 6028066 A	22-02-2000			
			US 6120751 A	19-09-2000			
			WO 0059474	A	12-10-2000	US 6379698 B1	30-04-2002
AU 4221400 A	23-10-2000						
EP 1165047 A1	02-01-2002						
JP 2002541089 T	03-12-2002						
WO 0059474 A1	12-10-2000						
US 2003082154 A1	01-05-2003						
WO 9535301	A	28-12-1995	WO 9535301 A1	28-12-1995			
			AU 696881 B2	24-09-1998			
			AU 7471194 A	15-01-1996			
			CA 2194221 A1	28-12-1995			
			EP 0807116 A1	19-11-1997			
			JP 10506093 T	16-06-1998			
			NO 970172 A	15-01-1997			
			NZ 271165 A	28-10-1998			
WO 02072068	A	19-09-2002	WO 02072068 A2	19-09-2002			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AU,BA,BB,BR,BZ,CA,CN,CO,CR,CU,DM,DZ,EC,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP, KP,KR,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OM,PH,PL,RO,SC,SG,TN,TT,UA,US,UZ,VC,VN,YU,ZA

(72)発明者 エスラー フランク

ドイツ連邦共和国 06108 ハレ アウグスト ベーベル シュトラーセ 41

(72)発明者 パンツナー シュテッフェン

ドイツ連邦共和国 06108 ハレ ブルメンシュトラーセ 9

(72)発明者 エンデルト ゲロルト

ドイツ連邦共和国 06114 ハレ ジーベナー シュトラーセ 20

Fターム(参考) 4C076 AA19 AA65 CC26 DD39 DD46 DD60 DD63 EE51 FF43

4H006 AA01 AA03 AB84 BS10 BT12 BU32

4H050 AA01 AA03 AB84