

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年3月2日 (02.03.2006)

PCT

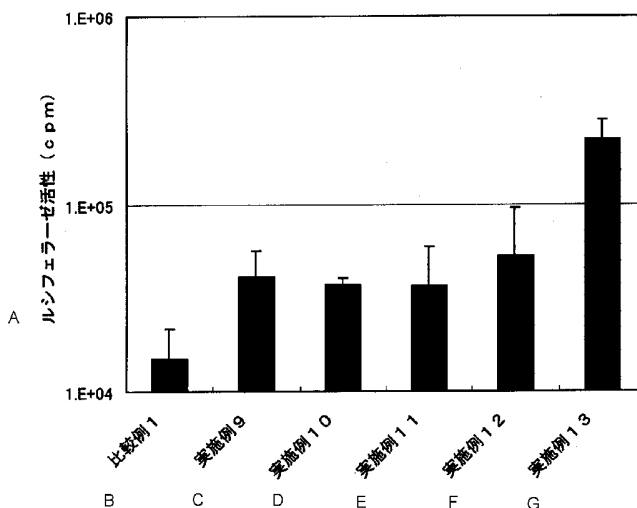
(10) 国際公開番号
WO 2006/022325 A1

- (51) 国際特許分類:
C07H 15/04 (2006.01) *C07H 3/04* (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01) *C07H 15/08* (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/015424
- (22) 国際出願日: 2005年8月25日 (25.08.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願2004-246190 2004年8月26日 (26.08.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本新薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6018550 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大木 忠明
- (52) (OHGI, Tadaaki) [JP/JP]; 〒3000013 茨城県土浦市神立町3628-80 Ibaraki (JP). 上田 稔浩 (UEDA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒3050003 茨城県つくば市桜一丁目21-3 ルヴィオ I I 5 0 1 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 清水 尚人 (SHIMIZU, Naoto); 〒6018550 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 日本新薬株式会社 知的財産部 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

[続葉有]

(54) Title: GALACTOSE DERIVATIVE, DRUG CARRIER AND MEDICINAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: ガラクトース誘導體、薬物担体及び医薬組成物



A	LUCIFERASE ACTIVITY (cpm)	E	EXAMPLE 11
B	COMPARATIVE EXAMPLE 1	F	EXAMPLE 12
C	EXAMPLE 9	G	EXAMPLE 13
D	EXAMPLE 10		

(57) Abstract: It is intended to provide a novel and useful galactose derivative constituting a drug carrier by which a drug can be efficiently transported into the liver, a drug carrier containing this derivative and a medicinal composition containing this carrier together with a drug. Namely, a galactose derivative comprising galactose, an appropriate spacer and a definite lipid; a drug carrier containing this derivative and a cationic lipid; and a medicinal composition containing this carrier together with a drug (preferably a double-stranded RNA, a double-stranded DNA or an oligonucleic acid).

[続葉有]

WO 2006/022325 A1



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明の目的は、医薬を効率よく肝臓へ移行させることが可能な薬物担体を構成する新規有用なガラクトース誘導体、当該誘導体を含有する薬物担体及び当該担体と医薬とを含有する医薬組成物を提供することにある。本発明は、ガラクトース、適当なスペーサー及び一定の脂質からなるガラクトース誘導体、当該誘導体とカチオン性脂質とを含有する薬物担体及び当該担体と医薬（好ましくは、二本鎖RNA、二本鎖DNA、オリゴ核酸）とを含有する医薬組成物に関するものである。

明 細 書

ガラクトース誘導体、薬物担体及び医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、ガラクトース誘導体、肝臓への指向性を有する薬物担体及び医薬組成物に関するものである。

背景技術

[0002] 肝細胞の膜表面上には、アシアロ糖タンパク質を認識するレセプターが存在する。かかるレセプターは、アシアロ糖タンパク質中のガラクトース残基を認識し、アシアロ糖タンパク質を肝細胞に取り込む機能を有している(例えば、非特許文献1を参照)。

[0003] このような基質特異性を利用して、リポソームを構成する脂質にガラクトースを付加させることにより、リポソームの肝臓への指向性の向上が検討されているが、いずれも充分満足できる結果は得られていない(例えば、特許文献1を参照)。

[0004] 一方、近年、RNA干渉[RNA interference (以下、「RNAi」という)]を利用したshort interfering RNA (以下、「siRNA」という)といわれる核酸医薬が注目され、盛んに研究されている(例えば、特許文献2ないし3を参照)。siRNAは、単独で人体に投与しても細胞内に移行し難いため、適当な担体に包含して投与する必要がある。

[0005] 特許文献1:特開平6-271597号

特許文献2:国際公開第02/055692号パンフレット

特許文献3:国際公開第02/055693号パンフレット

非特許文献1:M. Spiess、“Biochemistry”、1990年、29巻、p. 10009-10018

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、主として、新規有用なガラクトース誘導体、それを必須構成成分として含有する薬物担体及び医薬を包含する当該薬物担体を含有する医薬組成物を提供することにある。

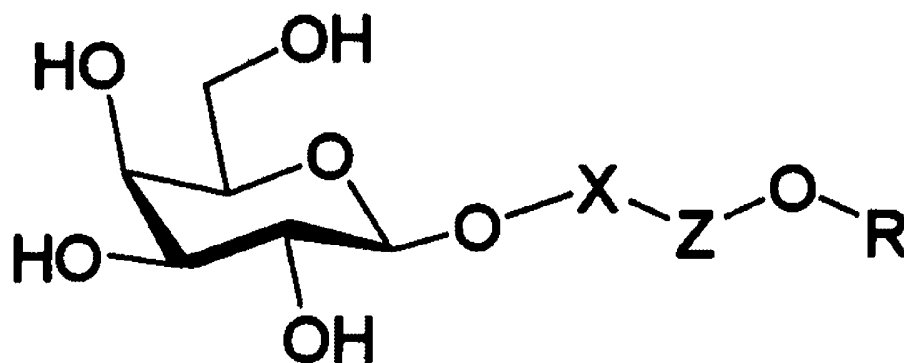
課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、ガラクトース、適当なスペーサー及び一定の脂質からなるガラクトース誘導体を、薬物担体の構成成分として用いることにより、当該担体の肝臓への指向性が有意に向上することを見出し、本発明を完成した。

[0008] 本発明としては、例えば、下記1.～3.を挙げることができる。

1. 次の一般式(I)で表されるガラクトース誘導体(以下、「本発明誘導体」という)。

[化1]

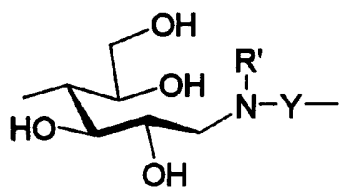


(I)

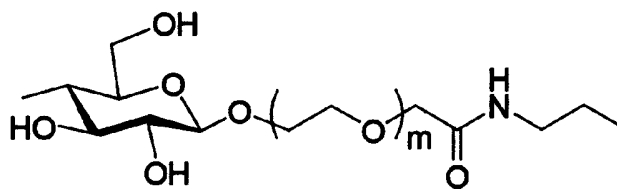
式(I)中、Xは次の式(II)又は(III)を表し、Zは次の式(IV)又は(V)を表し、Rは次の式(VI)又は(VII)を表す。

X:

[化2]



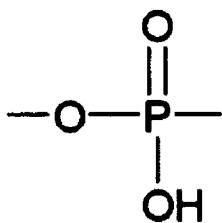
(II)



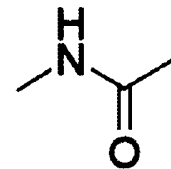
(III)

Z:

[化3]



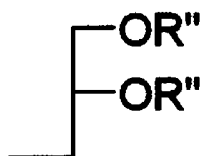
(IV)



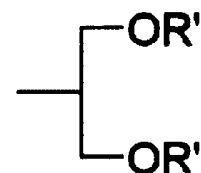
(V)

R:

[化4]



(VI)

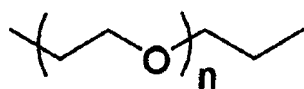


(VII)

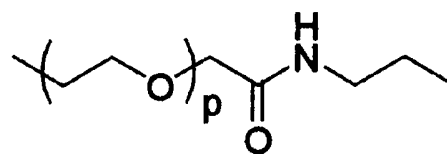
式(II)中、Yは次の式(VIII)又は(IX)を表し、R'は水素又は置換されていてもよい炭素数1~10のアルキルを表す。式(VI)、(VII)中、R''は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪族炭化水素基、又は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪酸残基を表す。

Y:

[化5]



(VIII)



(IX)

式(III)、(VIII)、(IX)中、m、n、pはそれぞれ独立して0～50の整数を表す。

但し、次のガラクトース誘導体を除く。

(1) 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-N-(1-デオキシラクチド-1-イル)エタノールアミン、

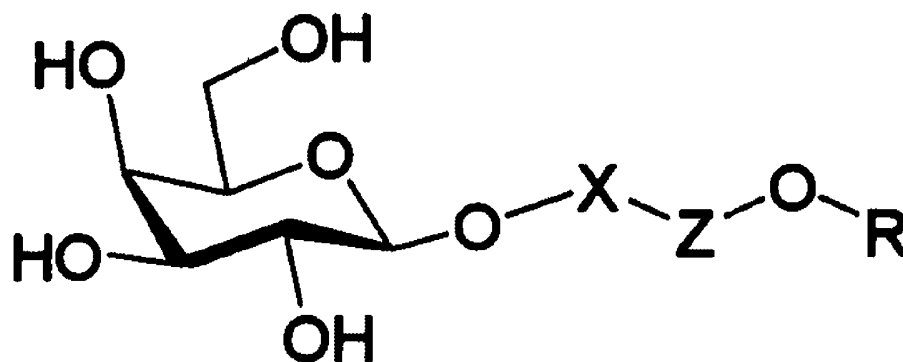
(2) 一般式(I)中、Xが式(II)であって、Yが式(VIII)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体、

(3) 一般式(I)中、Xが式(II)であって、Yが式(IX)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体、及び

(4) 一般式(I)中、Xが式(III)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体。

2. 次の一般式(I)で表されるガラクトース誘導体とカチオン性脂質とを含有する薬物担体(以下、「本発明担体」という)。

[化6]

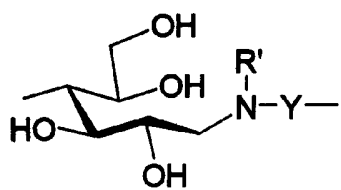


(I)

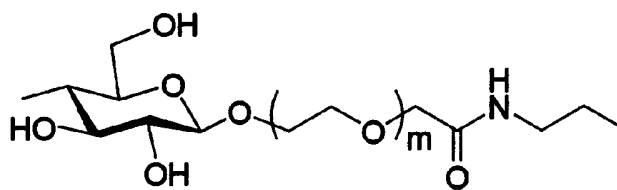
式(I)中、Xは次の式(II)又は(III)を表し、Zは次の式(IV)又は(V)を表し、Rは次の式(VI)又は(VII)を表す。

X:

[化7]



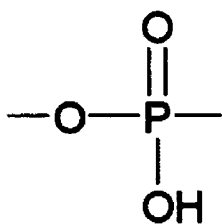
(II)



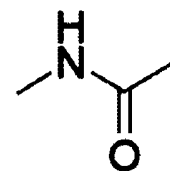
(III)

Z:

[化8]



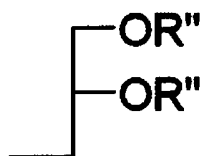
(IV)



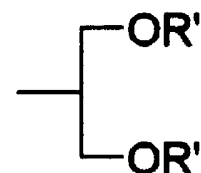
(V)

R:

[化9]



(VI)

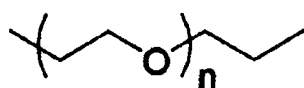


(VII)

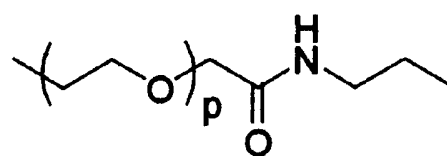
式(II)中、Yは次の式(VIII)又は(IX)を表し、R'は水素又は置換されていてもよい炭素数1~10のアルキルを表す。式(VI)、(VII)中、R''は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪族炭化水素基、又は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪酸残基を表す。

Y:

[化10]



(VIII)



(IX)

式(III)、(VIII)、(IX)中、m、n、pはそれぞれ独立して0~50の整数を表す。

但し、次のガラクトース誘導体を除く。

(1)一般式(I)中、Xが式(II)であって、Yが式(VIII)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体、

(2)一般式(I)中、Xが式(II)であって、Yが式(IX)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体、及び

(3)一般式(I)中、Xが式(III)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体。

3. 医薬を包含する上記2. の薬物担体を含有する医薬組成物(以下、「本発明組成物」という)。

[0009] 本発明において、R'に係る炭素数1~10のアルキルとしては、直鎖状か分枝鎖状か特に制限されず、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、イソブチルを挙げることができる。それらの中で、炭素数1~4のアルキルが好ましく、特にメチル、エチルがより好ましい。置換されている当該アルキルとしては、例えば、アルコキシ、ハロゲン化アルキルを挙げることができる。かかるアルコキシの具体例としては、メトキシ、エトキシを挙げることができる。ハロゲン化アルキルのアルキル部分は、上記アル

キルと同義である。また、ハロゲン化アルキルのハロゲンとしては、例えば、フッ素、塩素、臭素を挙げることができる。具体的には、塩化メチル、塩化エチル、フッ化メチルを挙げることができる。

R' に係る炭素数10~30の飽和の脂肪族炭化水素基としては、例えば、カプリル、ラウリル、ミリスチル、パルミチル、ステアリルを挙げることができる。それらの中で、炭素数10~20の飽和の脂肪族炭化水素基が好ましく、特にステアリルがより好ましい。また、炭素数10~30の不飽和の脂肪族炭化水素基としては、例えば、オレイル、リノイル、アラキドニルを挙げることができる。それらの中で、炭素数10~20の不飽和の脂肪族炭化水素基が好ましく、特にオレイルがより好ましい。炭素数10~30の飽和の脂肪酸残基としては、例えば、カプロイル、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイルを挙げることができる。それらの中で、炭素数10~20の飽和の脂肪酸残基が好ましく、特にステアロイルがより好ましい。炭素数10~30の不飽和の脂肪酸残基としては、例えば、オレオイル、リノオイル、アラキドノイルを挙げることができる。それらの中で、特にオレオイルが好ましい。

m、n、pとしては、それぞれ独立した0~50の整数であることが適当であり、0~20の整数であることが好ましく、0~10の整数であることがより好ましい。

[0010] 好ましい本発明誘導体としては、例えば、

- (1) 2-O-(2-N-(1-デオキシラクチド-1-イル)アミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、
- (2) L- α -ジオレオイルホスファチジル{14-N-(1-デオキシラクチド-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサ}テトラデカノール、
- (3) L- α -ジオレオイルホスファチジル-N-{14-(β -1-ラクチシロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシアセチル}エタノールアミン、
- (4) 2-O-[2-N-{14-(β -1-ラクチシロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシアセチル}アミノエチル]カルバモイル-1, 3-ジオレオイルグリセロール、
- (5) L- α -ジオレオイルホスファチジル{11-N-(1-デオキシラクチド-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサ}ウンデカノール、

- (6) L- α -ジオレオイルホスファチジル{29-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサ}ノナコサノール、
- (7) 2-O-[2-{N-(1-デオキシラクチト-1-イル)-N-エチル}アミノエチル]カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、及び
- (8) 2-O-{11-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデシル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを挙げることができる。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]図1は、ルシフェラーゼの発現効率を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性を示し、横軸は検討を行った組成物例を示す。
- [0012] [図2]図2は、蛍光強度分布を示す。縦軸は細胞数を示し、横軸は蛍光強度を示す。破線は比較対照の組成物、太実線は実施例13に係る本発明担体を含む組成物を用いた場合の蛍光強度分布を示す。また、細実線は陰性対照の蛍光強度分布を示す。
- [0013] [図3]図3は、蛍光強度分布を示す。縦軸は細胞数を示し、横軸は蛍光強度を示す。破線は比較対照の組成物、太実線は実施例14に係る本発明担体を含む組成物を用いた場合の蛍光強度分布を示す。また、細実線は陰性対照の蛍光強度分布を示す。
- [0014] [図4]図4は、C型肝炎ウイルス(以下、「HCV」という)のレプリコン複製抑制活性を示す。縦軸はネオマイシンホスホトランスフェラーゼII(以下、「NPTII」という)の発現率を示し、横軸は検討を行った組成物例及び組成物中に含まれるオリゴRNAの濃度を示す。

発明を実施するための最良の形態

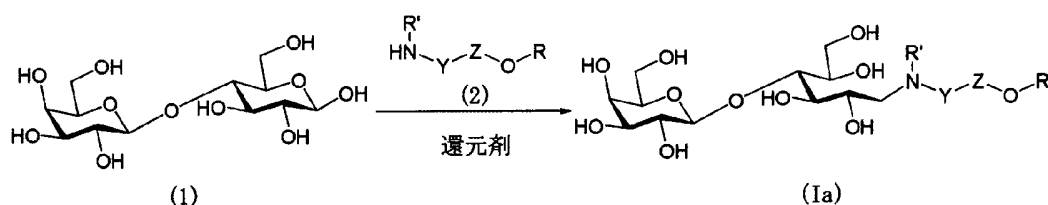
[0015] I. 本発明誘導体の製造方法

[0016] 1. Xが前記式(II)に係る本発明誘導体(Ia)の製造方法

(a) Xが前記式(II)に係る本発明誘導体(Ia)は、D-(+)-ラクトース(1)と下記一般式(2)で表されるアミン誘導体を適当な溶媒に溶解し、酸性条件下、還元剤を作用させることにより製造することができる。使用し得る溶媒としては、反応に関与しなけれ

ば特に限定されないが、例えば、水、アルコール類(例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール)、ハロゲン化炭化水素(例えば、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム)及びこれらの混合溶媒を挙げることができる。酸性条件下にするために用い得る酸としては、例えば、酢酸や塩酸を挙げることができる。還元剤としては、例えば、水素化ほう素ナトリウム、シアノリヒドロほう酸ナトリウムを挙げることができる。反応温度は、0～80℃の範囲内が適当である。また、反応時間は、使用する原料の種類、反応温度によって異なるが、通常1～100時間の範囲内が適当である。

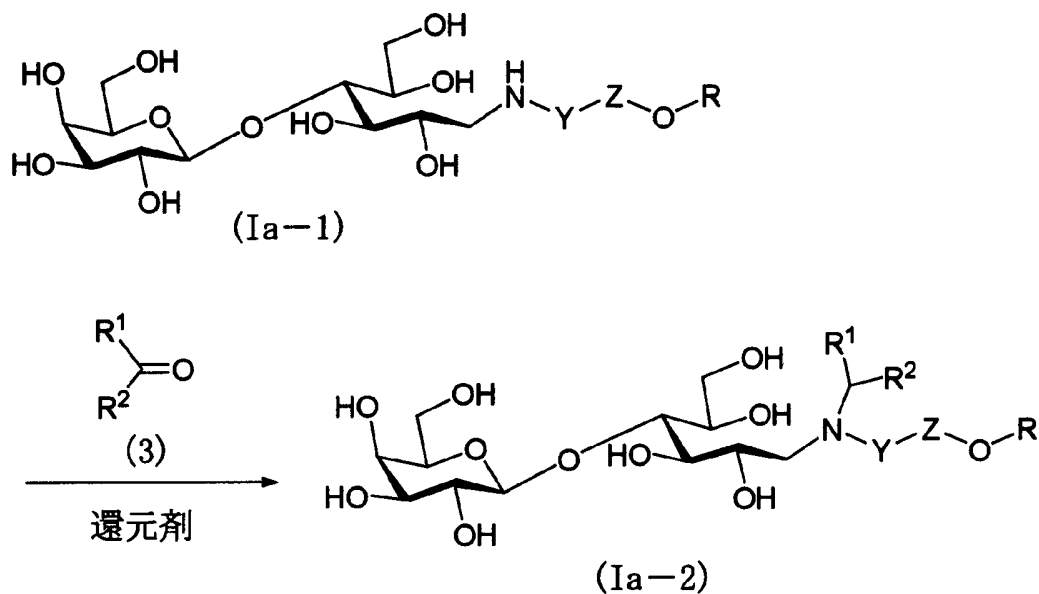
[0017] [化11]



(式中、Y、Z、R、R'は前記と同義である。)

[0018] (b) 上記一般式(Ia)中、R'が水素以外である本発明誘導体(Ia-2)は、上記方法(a)により製造される、R'が水素である本発明誘導体(Ia-1)と下記一般式(3)で表されるケトンあるいはアルデヒドを適当な溶媒に溶解し、酸性条件下、還元剤を作用させることによっても製造することができる。使用し得る溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、水、アルコール類(例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール)、ハロゲン化炭化水素(例えば、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム)又はこれらの混合溶媒を挙げることができる。酸性条件下にするために使用し得る酸としては、例えば、酢酸や塩酸を挙げることができる。還元剤としては、例えば、水素化ほう素ナトリウム、シアノリヒドロほう酸ナトリウムを挙げることができる。反応温度は、0～80℃の範囲内が適当である。また、反応時間は、使用する原料の種類、反応温度によって異なるが、通常1～100時間の範囲内が適当である。

[0019] [化12]



(式中、Y、Z、Rは前記と同義である。)

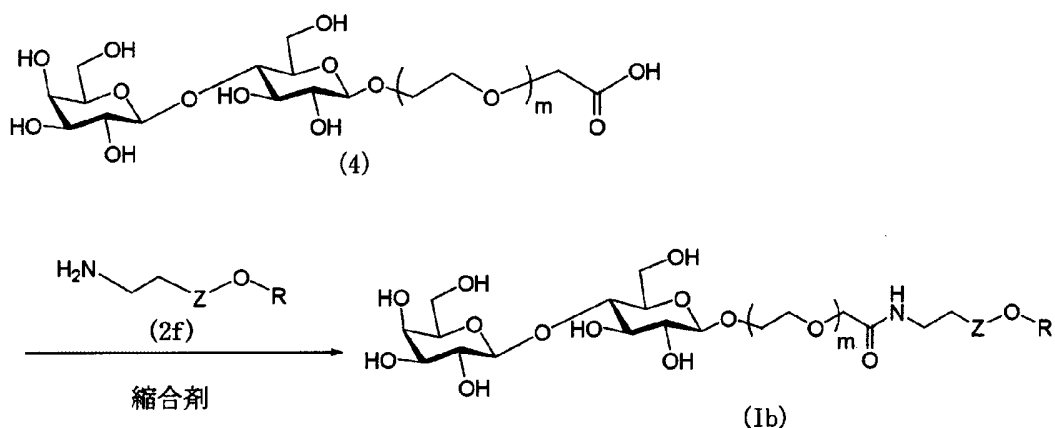
式中、 R^1 及び R^2 は、同一又は異なって、水素又は置換されていてもよい炭素数1～9のアルキルを表す。かかる炭素数1～9のアルキルとしては、直鎖状か分枝鎖状か特に制限されず、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、イソブチルを挙げることができる。それらの中で、炭素数1～3のアルキルが好ましく、特にメチル、エチルがより好ましい。また、当該アルキルの置換基としては、例えば、アルコキシ(例えば、メキシ、エトキシ)、ハロゲン(例えば、フッ素、塩素、臭素)を挙げることができる。

[0020] 2. Xが前記式(III)に係る本発明誘導体(Ib)の製造方法

(a) Xが前記式(III)に係る本発明誘導体(Ib)は、下記一般式(4)で表されるカルボン酸と前記一般式(2)中、Yが前記式(VIII)であって、前記一般式Y中のnが0であるアミン誘導体(2f)を適当な溶媒に溶解し、適当な縮合剤の存在下、反応させることにより製造することができる。使用し得る溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、ハロゲン化炭化水素(例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン)、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又はこれらの混合溶媒を挙げることができる。縮合剤としては、例えば、N,N'-ジシクロヘキシ

ルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを挙げることができる。反応温度は0~30℃の範囲内が適当である。また、反応時間は、使用する原料の種類、反応温度によって異なるが、通常1~30時間の範囲内が適当である。

[0021] [化13]

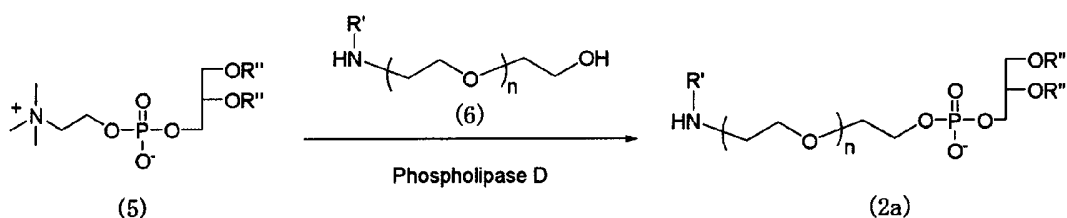


(式中、Z、R、mは前記と同義である。)

[0022] 3. 本発明誘導体(Ia)の原料化合物である、前記一般式(2)で表されるアミン誘導体の製造方法

(a) 前記一般式(2)中、Yが前記式(VIII)であって、Zが前記式(IV)であって、Rが前記式(VI)であるアミン誘導体(2a)は、ホスファチジルコリン(5)、下記一般式(6)で表されるアミノアルコール、ホスホリパーゼDを用い、文献記載の方法(J. Am. Chem. Soc.、1993年、115、p. 10487-10491)に従い製造することができる。

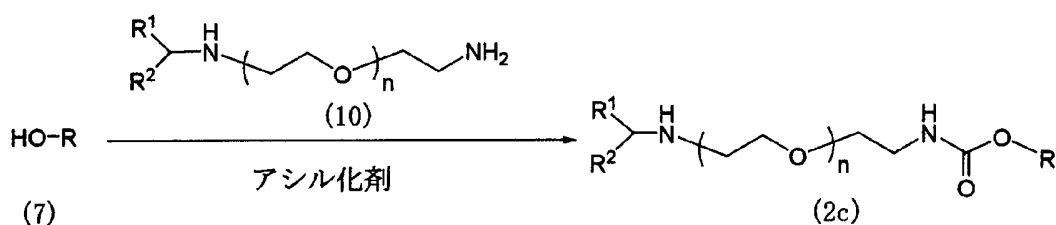
[0023] [化14]



(式中、R'、R''、nは前記と同義である。)

下、反応させることにより製造することができる。使用し得る溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、有機アミン類(例えば、ピリジン、ピコリン、コリジン)、ジメチルホルムアミド又はこれらの混合溶媒を挙げることができる。アシル化剤としては、例えば、N, N' -カルボニルジイミダゾール、クロロ炭酸フェニルを挙げることができる。反応温度は0~100°Cの範囲内が適当である。また、反応時間は、使用する原料の種類、反応温度によって異なるが、通常1~30時間の範囲内が適当である。

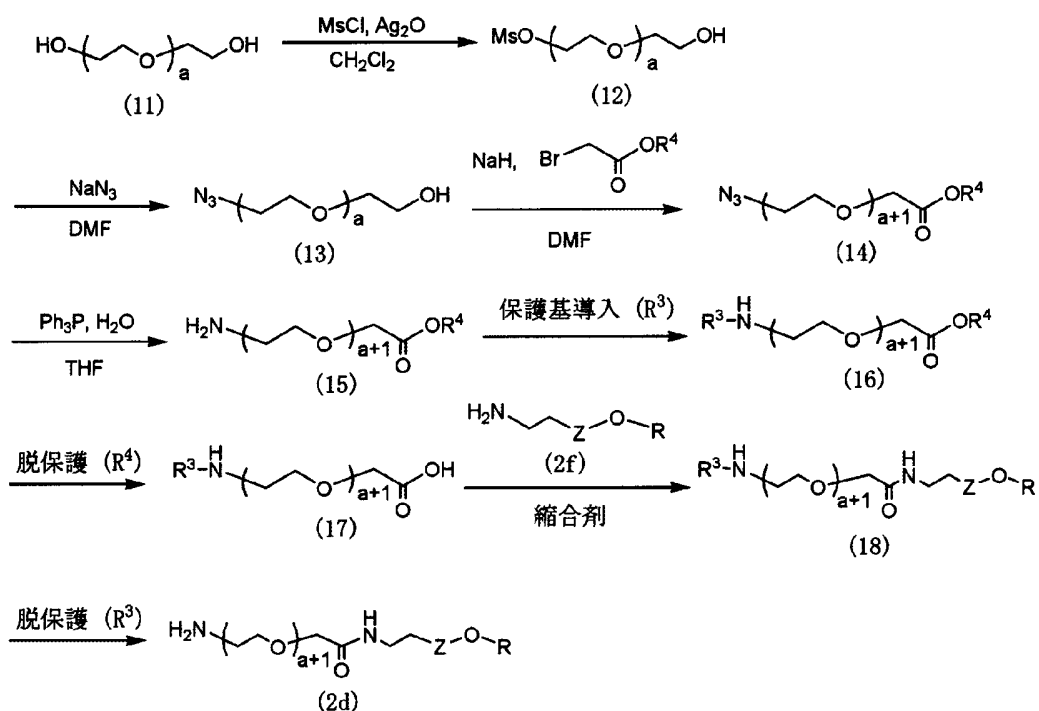
[0027] [化16]



(式中、R、R¹、R²、nは前記と同義である。)

[0028] (d) 前記一般式(2)中、R'が水素であって、Yが前記式(IX)であって、pが1以上であるアミン誘導体(2d)は、下記一般式(11)で表されるエチレングリコール誘導体を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem.、2001年、66、p. 4494-4503)に準じて下記一般式(16)の化合物を得た後、R⁴を除去し、その後、適当な縮合剤の存在下、前記一般式(2f)で表されるアミン誘導体と反応させた後、R³を常法により除去することにより製造することができる。縮合剤としては、例えば、N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを挙げることができる。保護基の導入は、常法に従い、例えば、テトラヒドロフラン等の溶媒中、二炭酸ジ-t-ブチル等と反応させることにより行うことができる。R⁴の除去は、常法に従い、メタノール等のアルコール中、水酸化ナトリウム水溶液、ナトリウムメチラート等を用いることにより、あるいは、接触還元により行うことができる。

[0029] [化17]

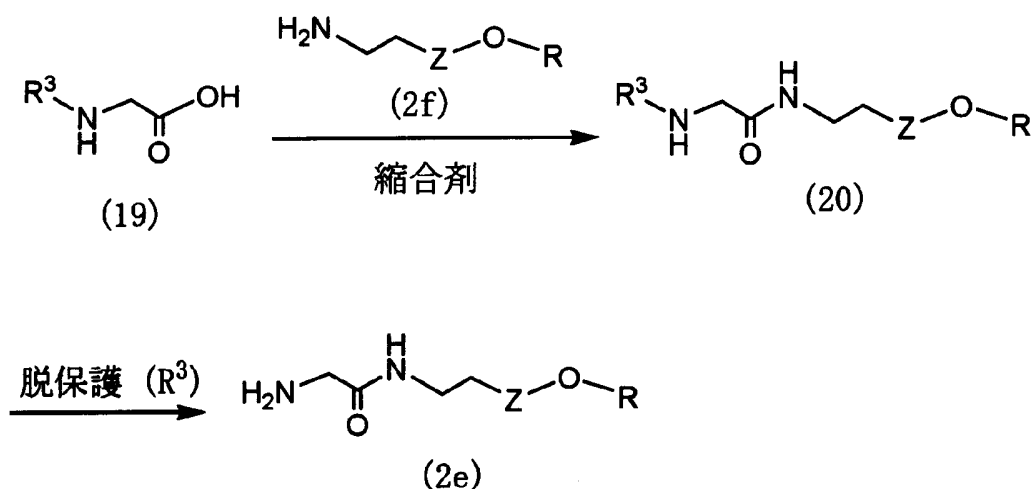


(式中、Z、R、R³は前記と同義である。)

式中、aは0～49の整数を表す。また、R⁴は置換されていてもよいアルキルを表す。R⁴のアルキルとしては、例えば、炭素数1～7の直鎖状又は分枝鎖状のアルキル、具体的には、メチル、エチル、tert-ブチル、イソプロピル、ヘプチルを挙げることができる。また、当該アルキルの置換基としては、例えば、アルコキシ(例えば、メキシ、エトキシ)、ニトリル(例えば、シアノ)を挙げることができる。更に、Msは、メタンサルホンイルを表す。

[0030] (e)前記一般式(2)中、R'が水素であって、Yが前記式(IX)であって、pが0であるアミン誘導体(2e)は、上述したアミン誘導体(2d)の製造方法において、上記一般式(17)で表される化合物の代わりに、下記一般式(19)で表されるグリシン誘導体を用い、適当な縮合剤の存在下、前記一般式(2f)で表されるアミン誘導体と反応させた後、R³を常法により除去することにより製造することができる。縮合剤としては、例えば、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを挙げることができる。

[0031] [化18]

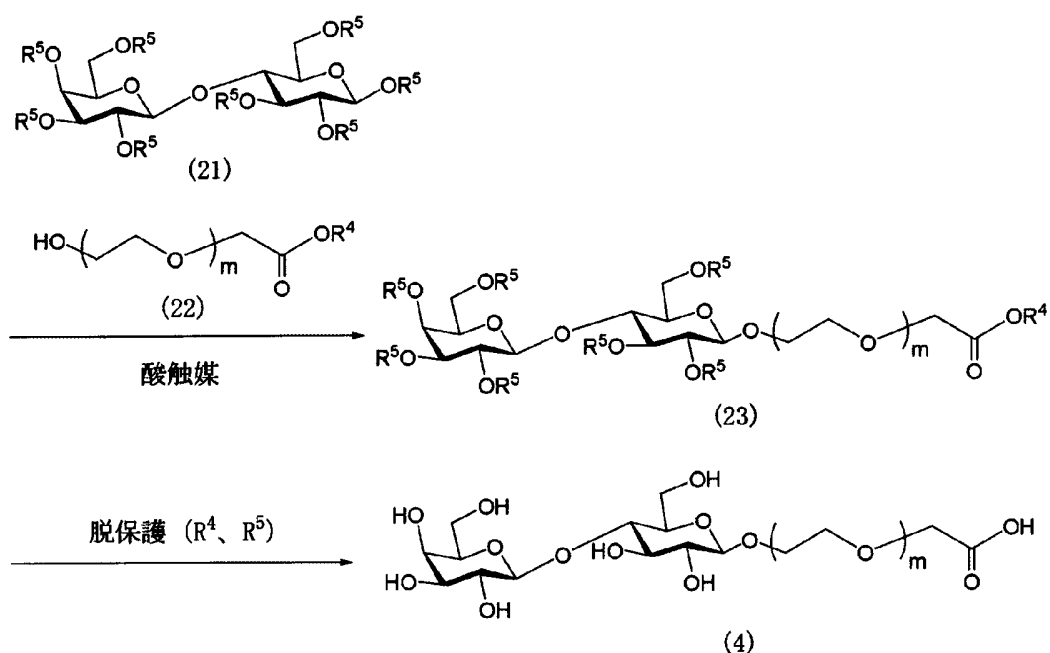


(式中、Z、R、R³は前記と同義である。)

[0032] 4. 本発明誘導体(Ib)の原料化合物である、前記一般式(4)で表されるカルボン酸の製造方法

前記一般式(4)で表されるカルボン酸は、下記一般式(21)で表される、水酸基がアシル化された糖と下記一般式(22)で表されるアルコール誘導体を適当な溶媒に溶解し、酸触媒の存在下、反応させ、その後、R⁴及びR⁵を除去することにより製造することができる。使用し得る溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、ハロゲン化炭化水素(例えば、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム)、エーテル類(例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、1,4-ジオキサン)又はこれらの混合溶媒を挙げることができる。酸触媒としては、例えば、三フッ化ほう素・ジエチルエーテル錯体、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネートを挙げることができる。反応温度は0~30℃の範囲内が適当である。また、反応時間は、使用する原料の種類、反応温度によって異なるが、通常1~30時間の範囲内が適当である。R⁴及びR⁵の除去は、常法に従い、メタノール中でナトリウムメチラートを加えて行えばよく、この条件でR⁴が除去されない場合には、続いて、酸(例えば、トリフルオロ酢酸、酢酸、塩酸)又は接触還元により行うことができる。

[0033] [化19]



(式中、R⁴、mは前記と同義である。)

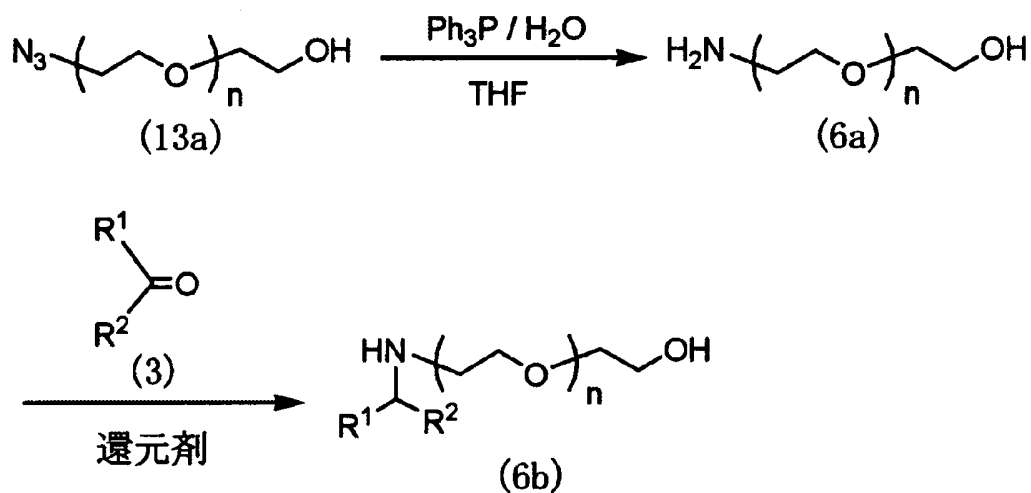
式中、R⁵は置換されていてもよいアシルを表す。R⁵のアシルとしては、特に制限されないが、例えば、炭素数1～6の直鎖状又は分枝鎖状のアルカノイル、具体的には、アセチル、イソブチリル、ピバロイルか、炭素数7～13のアロイル、具体的には、ベンゾイル、トルイル、2,4,6-トリメチルベンゾイルを挙げることができる。また、当該アシルの置換基としては、例えば、アルコキシ(例えば、メキシ)、ハロゲン(例えば、塩素、フッ素)を挙げることができる。

[0034] 5. アミン誘導体(2a)の原料化合物である、前記一般式(6)で表されるアミノアルコールの製造方法

前記一般式(6)中、R'が水素であるアミノアルコール(6a)は、前記一般式(13)中、aがnであるアジド誘導体(13a)を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem.、2001年、66、p. 4494-4503)に従い製造することができる。また、前記一般式(6)中、R'が水素以外であるアミノアルコール(6b)は、R'が水素である前記アミノアルコール(6a)と前記一般式(3)で表されるケトンあるいはアルデヒドを用い、上述した前記一般式(1a-2)で表される本発明誘導体を製造する際に用いた方法と同様にして製造することができる。還元剤としては、例えば、水素化ほう素ナトリウム、シアノリヒドロ

ほう酸ナトリウムを挙げることができる。

[0035] [化20]

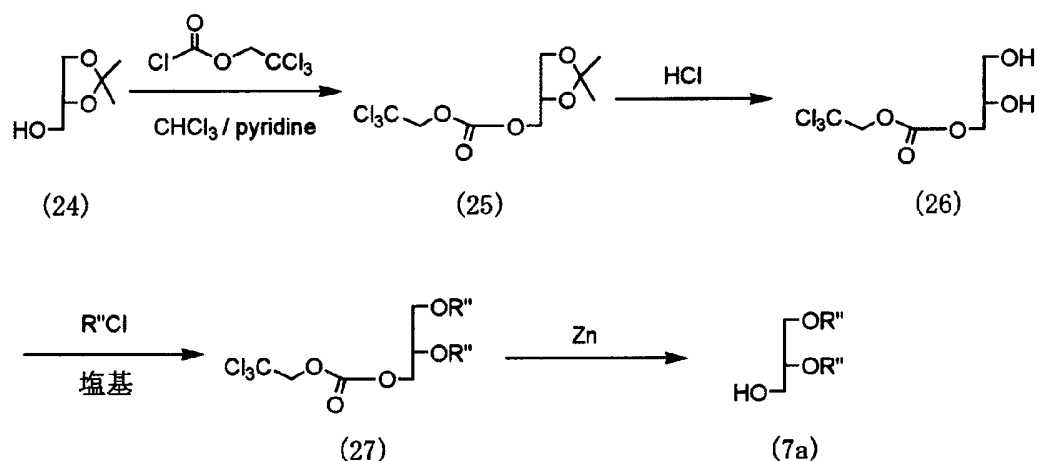


(式中、 R^1 、 R^2 、 n は前記と同義である。)

[0036] 6. アミン誘導体(2b)、(2c)の原料化合物である、前記一般式(7)で表されるアルコールの製造方法

(a)前記一般式(7)中、 R が前記式(VI)であるアルコール(7a)は、2, 2-ジメチルー1, 3-ジオキソラン-4-メタノール(24)を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem.、1970年、35、p. 221-224)に従い製造することができる。塩基としては、例えば、ピリジン、コリジン、トリエチルアミン等の有機アミン類を挙げることができる。

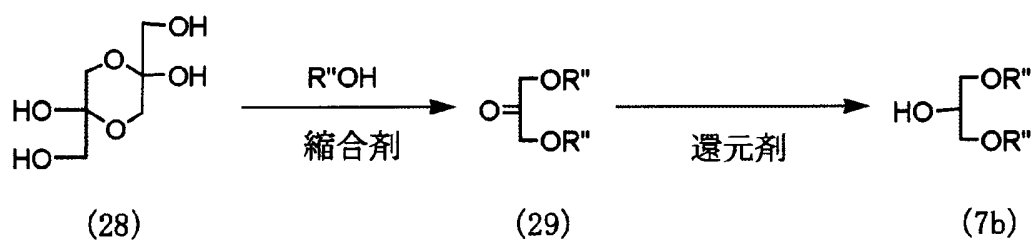
[0037] [化21]



(式中、 R'' は前記と同義である。)

[0038] (b) 前記一般式(7)中、 R が前記式(VII)であるアルコール(7b)は、二量体のジヒドロキシアセトン(28)を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem.、1970年、35、p. 2082-2083)に従い製造することができる。縮合剤としては、例えば、 $\text{N, N}'$ -ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを挙げることができる。還元剤としては、例えば、水素化ほう素ナトリウムを挙げることができる。

[0039] [化22]



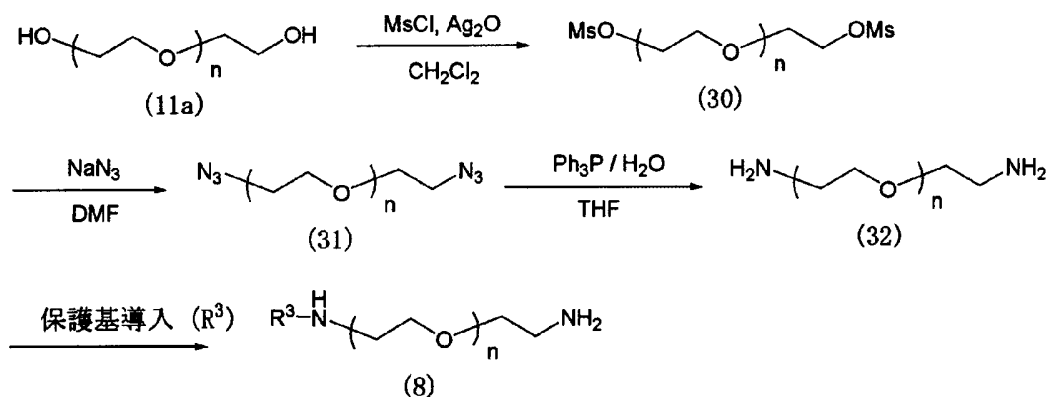
(式中、 R'' は前記と同義である。)

[0040] 7. アミン誘導体(2b)の原料化合物である、前記一般式(8)で表されるアミン誘導体の製造方法

前記一般式(8)で表されるアミン誘導体は、前記一般式(11)中、 a が n であるエチ

レングリコール誘導体(11a)を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem.、2001年、66、p. 4494-4503及びJ. Med. Chem.、1990年、33、p. 97-101)に準じて製造することができる。保護基の導入は、常法に従い、例えば、テトラヒドロフラン等の溶媒中、二炭酸ジ-*t*-ブチル等と反応させることにより行うことができる。

[0041] [化23]

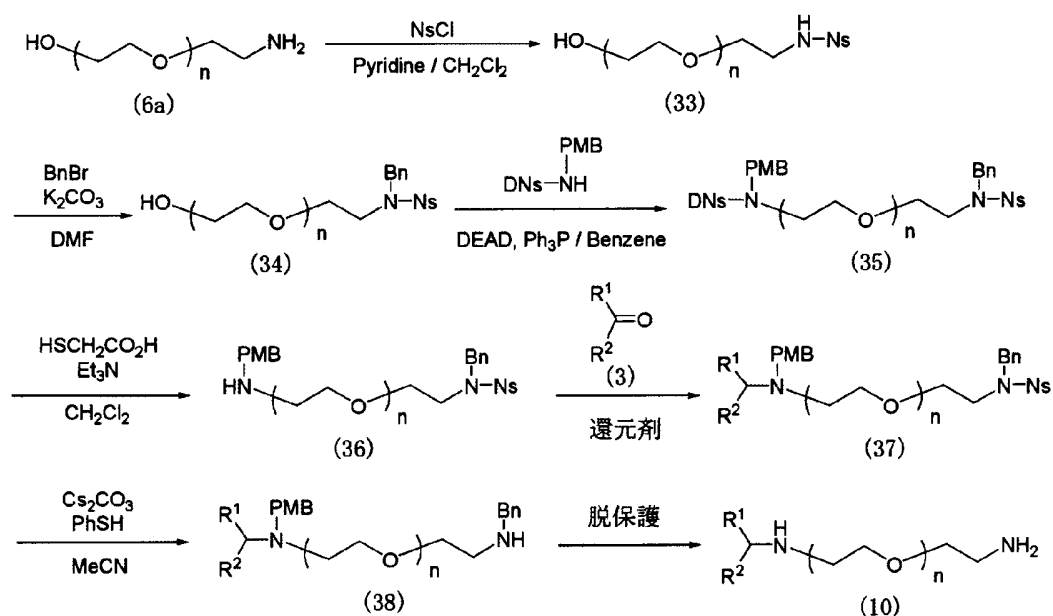


(式中、R³、n、Msは前記と同義である。)

[0042] 8. アミン誘導体(2c)の原料化合物である、前記一般式(10)で表されるアミン誘導体の製造方法

前記一般式(10)で表されるアミン誘導体は、前記一般式(6a)で表されるアミノアルコールを用い、文献記載の方法(Tetraedron Letters、1997年、38、p. 5831-5834)に従い製造することができる。還元剤としては、例えば、水素化ほう素ナトリウム、シアノトリヒドロほう酸ナトリウムを挙げることができる。脱保護は、常法に従い、例えば、接触還元により行うことができる。

[0043] [化24]



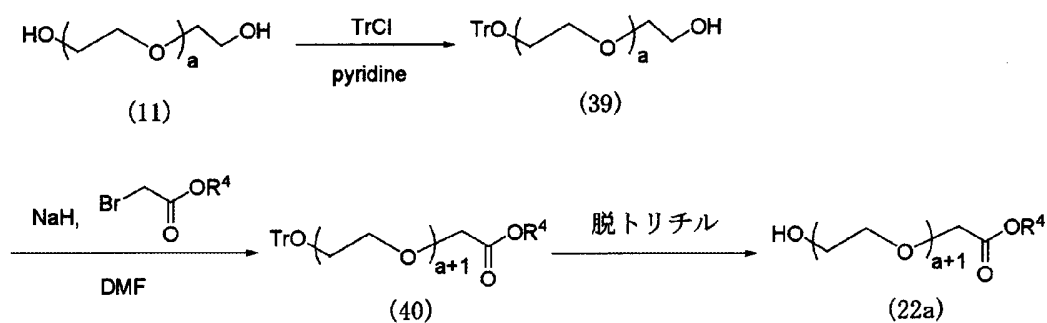
(式中、 R^1 、 R^2 、 n は前記と同義である。)

式中、Nsは2-ニトロベンゼンスルホニルを、Bnはベンジルを、DNsは2, 4-ジニトロベンゼンスルホニルを、PMBはp-メキシベンジルをそれぞれ表す。

[0044] 9. 前記一般式(4)で表されるカルボン酸の原料化合物である、前記一般式(22)で表されるアルコール誘導体の製造方法

前記一般式(22)中、 m が1以上であるアルコール誘導体(22a)は、前記一般式(1)で表されるエチレングリコール誘導体を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem.、2001年、66、p. 4494-4503)に準じて製造することができる。トリチルの除去は、常法に従い、例えば、酸(例えば、トリフルオロ酢酸、酢酸、塩酸)で処理することにより行うことができる。なお、前記一般式(22)中、 m が0であるアルコール誘導体(22b)は、市販されている。

[0045] [化25]



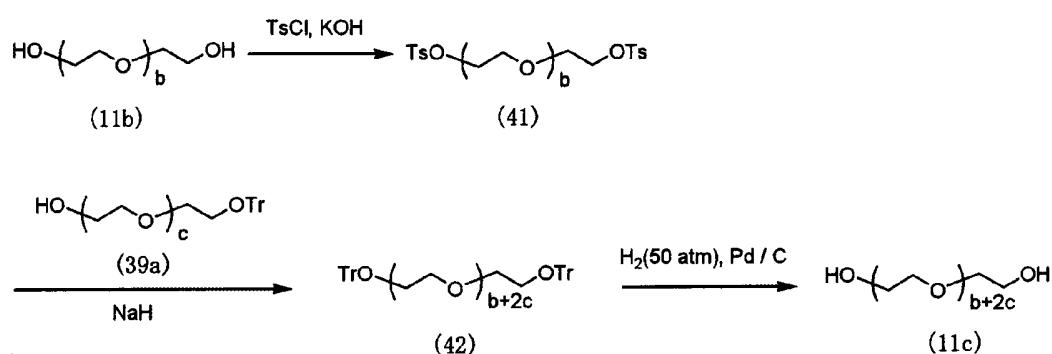
(式中、 R^4 、 a は前記と同義である。)

式中、Trはトリチルを表す。

[0046] 10. 前記一般式(11)中、 a が8以上であるエチレングリコール誘導体(11c)の製造方法

前記一般式(11)中、 a が8以上であるエチレングリコール誘導体(11c)は、前記一般式(11)中、 a が b であるエチレングリコール誘導体(11b)、前記一般式(39)中、 a が c であるエチレングリコール誘導体(39a)を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem. .、1999年、64、p. 6870-6873)に従い製造することができる。なお、前記一般式(11)中、 a が7以下であるエチレングリコール誘導体(11d)は、市販されている。

[0047] [化26]



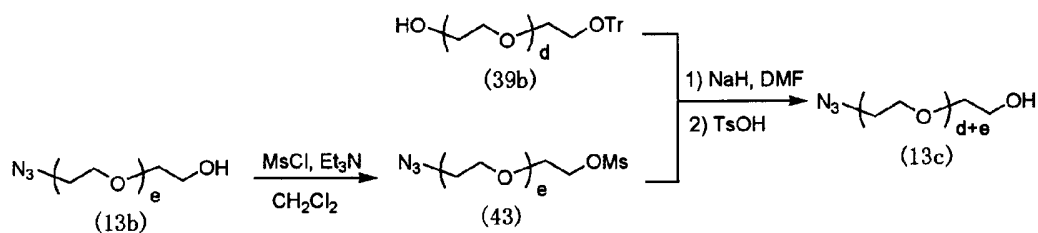
(式中、Trは前記と同義である。)

式中、 b は1~48の整数を、 c は1~24の整数をそれぞれ表す。なお、式中、「 $b+2c$ 」は、 a であって、8~50の整数を表す。また、Tsはp-トルエンスルホン基を表す。

[0048] 11. 前記一般式(13)中、aが8以上であるアジド誘導体(13c)の製造方法

前記一般式(13)中、aが8以上であるアジド誘導体(13c)は、前記一般式(39)中、mがdであるエチレングリコール誘導体(39b)、前記一般式(13)中、aがeであるアジド誘導体(13b)を用い、文献記載の方法(J. Org. Chem.、2001年、66、p. 44 94-4503)に従い製造することができる。

[0049] [化27]



(式中、Ms、Tr、Tsは前記と同義である。)

式中、d、eはそれぞれ独立して1~49の整数を表す。なお、式中、「d+e」は、aであって、8~50の整数を表す。

[0050] II. 本発明担体

[0051] 本発明担体は、本発明誘導体とカチオン性脂質とを必須の構成成分とするものであって、後述する医薬を細胞内に送達しうる性質を有するものである。具体的には、リポソームや脂肪乳剤等の形態をとることができる。

[0052] 本発明担体の必須の構成成分であるカチオン性脂質としては、医薬上許容されるカチオン性脂質であれば特に制限はされないが、例えば、2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、N-(1-(2, 3-ジオレイロキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロライド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、N, N^I, N^{II}, N^{III}-テトラメチル-N, N^I, N^{II}, N^{III}-テトラパルミチルスペルミン、2, 3-ジオレイロキシ-N-[2-(スペルミンカルボキシアミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテートを挙げることができる。これらを一種又は二種以上使用することができる。それ

らの中で、特に2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールが好ましい。

[0053] 本発明担体における本発明誘導体とカチオン性脂質との配合比率は、カチオン性脂質1重量部に対して、本発明誘導体0.01~10重量部の範囲内が適当であり、0.05~5重量部の範囲内が好ましく、0.5~3重量部の範囲内がより好ましい。

[0054] 本発明担体には、必須の構成成分である本発明誘導体及びカチオン性脂質以外にリン脂質を更に加えることができる。かかるリン脂質としては、医薬上許容されるリン脂質であれば特に制限されないが、例えば、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、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、レシチンを挙げることができる。これらを一種又は二種以上使用することができる。それらの中で、特に卵黄ホスファチジルコリン、卵黄レシチン、大豆レシチンが好ましい。

[0055] 更にリン脂質を加える場合、本発明担体における本発明誘導体とリン脂質との配合比率は、リン脂質1重量部に対して、本発明誘導体0.01~100重量部の範囲内が適当であり、0.1~10重量部の範囲内が好ましく、0.3~2重量部の範囲内がより好ましい。また、カチオン性脂質1重量部に対して、本発明誘導体とリン脂質との和が、0.01~10重量部の範囲内が適当であり、0.05~5重量部の範囲内が好ましく、0.5~3重量部の範囲内がより好ましい。

[0056] 本発明担体の分散液は、本発明誘導体とカチオン性脂質及び/又はリン脂質を混合し、常法により、水溶液中で分散させることにより調製することができる。分散には超音波分散装置、乳化分散装置等の装置を適宜用いることができる。

[0057] III. 本発明組成物

[0058] 本発明組成物に用い得る「医薬」としては、例えば、水溶性陰イオン性化合物、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗生物質を挙げることができる。具体的には、核酸化合物である二本鎖RNA、二本鎖DNAあるいはオリゴ核酸、酸性糖であるヘパラン硫酸やデキストラン硫酸等、サイトカイン類、サイクリックAMP、ATPやIP3等のセカンドメッセンジャー類、ペニシリン類やセファロスポリン類、ビタミンCやレチノール類のビタミン類、その他酸性基をもった既知の医薬、インターフェロン(α 、 β 、 γ)、インターロ

イキン(IL-1、IL-2)、コロニー刺激因子(CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)、レバミゾール、ペスタチン、レチノイックアシッド、5-フルオロウラシル(5-FU)、シトシンアラビノシド(Ara-C)、アデニンアラビノシド(Ara-A)、シスプラチン(CDDP)、シクロホスファミド、アジドチミジン(AZT)等を挙げることができる。

[0059] 二本鎖RNAとしては、例えば、以下のものを挙げることができる。

1. ホモポリマー・ホモポリマー複合体

(1) 塩基修飾

ポリイノシン酸・ポリシチジル酸、
ポリイノシン酸・ポリ(5-ブロモシチジル酸)、
ポリイノシン酸・ポリ(2-チオシチジル酸)、
ポリ(7-デアザイノシン酸)・ポリシチジル酸、
ポリ(7-デアザイノシン酸)・ポリ(5-ブロモシチジル酸)。

(2) 糖修飾

ポリ(2'-アジドイノシン酸)・ポリシチジル酸。

(3) リン酸修飾

ポリイノシン酸・ポリ(シチジン-5'-チオリン酸)。

2. ホモポリマー・コポリマー複合体

ポリイノシン酸・ポリ(シチジル酸、ウリジン酸)、
ポリイノシン酸・ポリ(シチジル酸、4-チオウリジン酸)。

3. 合成核酸とポリカチオンとの複合体

ポリイノシン酸・ポリシチジル酸・ポリ-L-リジン。

4. その他

ポリイノシン酸・ポリ(1-ビニルシチジル酸)。

[0060] オリゴ核酸としては、一分子内に10~50、好ましくは15~30、より好ましくは18~25の核酸塩基を有する、RNA、DNA及びそれらの誘導体を挙げることができる。例えば、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、DNAエンザイム、リボザイム、アプタマーを挙げることができる。

[0061] 上記オリゴ核酸は天然型に限定されるものではなく、ヌクレアーゼ耐性等、生体内

における安定性を高めるために、そのヌクレオチドを構成している糖又はリン酸バックボーン等の、少なくとも一部が修飾されていてもよい。修飾される場合、望ましい修飾は、糖の2'位の修飾、糖のその他の部分の修飾、オリゴ核酸のリン酸バックボーンの修飾等である。糖の2'位の修飾として、 OR^6 、 R^6 、 R^7OR^6 、 SH 、 SR^6 、 NH_2 、 NHR^6 、 $N(R^6)_2$ 、 N_3 、 CN 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 等の置換基が挙げられる。ここで、 R^6 はアルキル又はアリアル、好ましくは炭素数1~6のアルキルを、 R^7 はアルキレン、好ましくは炭素数1~6のアルキレンを表す。糖のその他の部分の修飾体としては、4'チオ体などが挙げられる。オリゴ核酸のリン酸バックボーンの修飾体としては、ホスホロチオエート体、ホスホロジチオエート体、アルキルホスホネート体、ホスホロアミデート体等が挙げられる。

[0062] 本発明組成物中に含まれる本発明担体と医薬との重量比(本発明担体/医薬)は、医薬の種類、本発明担体における本発明誘導體とカチオン性脂質との配合比率等によって異なるが、0.01~1000の範囲内が適当であり、10~300の範囲内が好ましく、100~200の範囲内がより好ましい。更に、含有医薬がオリゴ核酸である場合には、0.01~100の範囲内が適当であり、1~30の範囲内が好ましく、10~20の範囲内がより好ましい。

[0063] 本発明組成物には、上述した本発明担体と医薬以外に、任意に医薬上許容される添加剤を配合することができる。かかる添加剤として、例えば、乳化補助剤(例えば、炭素数6~22の脂肪酸やその医薬上許容される塩、アルブミン、デキストラン)、安定化剤(例えば、コレステロール、ホスファチジン酸)、等張化剤(例えば、塩化ナトリウム、グルコース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース)、pH調整剤(例えば、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエタノールアミン)を挙げることができる。これらを一種又は二種以上使用することができる。本発明組成物中の当該添加剤の含有量は、90重量%以下が適当であり、70重量%以下が好ましく、50重量%以下がより好ましい。

[0064] 本発明組成物は、本発明担体の分散液に医薬を加え、適当に攪拌することにより調製することができる。また、本発明担体の製造過程において、医薬を加えることによっても調製することができる。上述した添加剤は、分散前でも分散後でも適当な工程

で添加することができる。

[0065] 本発明組成物は、例えば、液剤やその凍結乾燥製剤とすることができる。液剤の場合、本発明組成物中に含まれる本発明担体の濃度は、0.001～25%w/vの範囲内が適当であり、0.01～5%w/vの範囲内が好ましく、0.1～2%w/vの範囲内がより好ましい。

[0066] 上記凍結乾燥製剤は、常法により、液剤の形態を有している本発明組成物を凍結乾燥処理することにより調製することができる。例えば、液剤の形態を有している本発明組成物を適当な滅菌を行った後、所定量をバイアル瓶に分注し、約-40～-20℃の条件で予備凍結を約2時間程度行い、約0～10℃で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約15～25℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥することができる。そして、一般的にはバイアル内部を窒素ガスで置換し、打栓して本発明組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。

[0067] 本発明組成物の凍結乾燥製剤は、一般には任意の適当な溶液(再溶解液)の添加によって再溶解し使用することができる。このような再溶解液としては、注射用水、生理食塩水、その他一般輸液を挙げることができる。この再溶解液の液量は、用途等によって異なり特に制限されないが、凍結乾燥前の液量の0.5～2倍量、又は500mL以下が適当である。

[0068] 本発明組成物は、投与単位形態で投与することが望ましく、ヒトを含む動物に対し、静脈内投与、動脈内投与、経口投与、組織内投与、経皮投与、経粘膜投与または経直腸投与することができる。特に静脈内投与、経皮投与、経粘膜投与が望ましい。これらの投与に適した剤型、例えば、各種の注射剤、経口剤、点滴剤、吸収剤、点眼剤、軟膏剤、ローション剤、座剤で投与されるのはもちろんである。

[0069] 例えば、本発明組成物の医薬としての用量は、医薬の種類、剤型、年齢や体重等の患者の状態、投与経路、疾患の性質と程度を考慮した上で調製することが望ましいが、成人に対して医薬量として、1日当たり0.01mg～10g/ヒトの範囲が、好ましくは0.1mgから数gの範囲が一般的である。更に、本発明組成物に含有されている医薬がオリゴ核酸である場合には、成人に対してオリゴ核酸量として、1日当たり0.1mg～10g/ヒトの範囲が、好ましくは1mgから数gの範囲が一般的である。この数値

は標的とする疾患の種類、投与形態、標的分子によっても異なる場合がある。従って、場合によってはこれ以下でも十分であるし、また逆にこれ以上の用量を必要とするときもある。また、1日1回から数回の投与または1日から数日間の間隔で投与することができる。

実施例

[0070] 以下に、参考例、実施例、比較例及び試験例を掲げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は実施例に示される範囲に限定されるものではない。

[0071] 参考例1 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)エタノールアミンの合成

460mgのL- α -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、223mgのラクトース1水和物をH₂O(2mL)、メタノール(8mL)、ジクロロメタン(2mL)の混合液に溶解し、次いで1mLの酢酸、78mgのシアノトリヒドロほう酸ナトリウムを加えて65°Cで終夜攪拌した。反応液を濃縮後、Bligh-Dyer法(Can. J. Biochem. Physiol.、1959年、37、p. 911。以下同じ。)で目的物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、目的物を267mg得た。

[0072] ESI-Mass (m/z) = 1093. 1 ([M+Na]⁺)

[0073] 実施例1 2-O-{2-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノエチル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールの合成

工程1 1, 3-ジオレオイルグリセロールの合成

3. 8gの二量体のジヒドロキシアセトン、25gのオレイン酸、20gの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、12. 9gの4-ジメチルアミノピリジンを150mLのジクロロメタン中、室温で4時間攪拌した。反応液を0. 5Mのリン酸二水素カリウム水溶液にあげ、ジクロロメタンで抽出し、水洗して乾燥後、減圧濃縮した。残渣に1Lのメタノールを加えて生じた粉末を集めて乾燥した。かかる粉末を、170mLのテトラヒドロフランと17mLの10%酢酸水溶液との混合液に溶解し、0°Cにて1. 7gの水素化ほう素ナトリウムを少しづつ加えた。室温で2時間攪拌後、反応液を飽和重曹水にあげ、酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を14. 5g得た。

工程2 2-O-(2-アミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールの合成

3. 4gの上記工程1で得られた1, 3-ジオレオイルグリセロールを30mLのピリジンに溶解し、1. 7gのN, N'-カルボニルジイミダゾールを加え、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧下濃縮後、ジクロロメタンに溶解し、5%リン酸二水素ナトリウム水溶液で洗浄、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。このもの800mgを3mLのジメチルホルムアミドに溶解し、358mgのN-(t-ブトキシカルボニル)-1, 2-エチレンジアミンを加えて室温で3時間攪拌した。その反応液を飽和食塩水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。残渣を8mLのジクロロメタンに溶解し、2mLのトリフルオロ酢酸を加えて室温で30分攪拌した。反応液を飽和重曹水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を600mg得た。

工程3 2-O-{2-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノエチル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールの合成

300mgの上記工程2で得られた2-O-(2-アミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、145mgのラクトース1水和物をH₂O(1mL)、メタノール(4mL)、ジクロロメタン(1mL)の混合液に溶解し、次いで0. 3mLの酢酸、53mgのシアノトリヒドロほう酸ナトリウムを加えて65°Cで終夜攪拌した。反応液を濃縮後、Bligh-Dyer法で目的物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、目的物(本発明誘導体)を247mg得た。

[0074] ESI-Mass (m/z) = 1034. 0 ([M+H]⁺)

[0075] 実施例2 L- α -ジオレオイルホスファチジル{14-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサ}テトラデカノールの合成

工程1 14-{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカノールの合成

10gのペンタエチレングリコール、10. 7gの酸化銀に80mLのジクロロメタンを加え、5. 8gのメタンスルホニルクロリドのジクロロメタン溶液(16mL)を滴下した。反応液を室温で2日間攪拌後、セライトでろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカ

ラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を7.8g得た。

工程2 14-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカノールの合成

7.4gの上記工程1で得られた14-{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカノールと2.28gのアジ化ナトリウムに25mLのジメチルホルムアミドを加え、110°Cで2.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、トルエンで共沸した。残渣を酢酸エチルに懸濁し、不溶物をろ過して除き、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を5.7g得た。

工程3 14-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカノールの合成

5.6gの上記工程2で得られた14-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカノールを60mLのメタノールに溶解し、800mgの10%パラジウム/炭素存在下、4時間水素添加した。反応液をろ過し、ろ液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を2g得た。

工程4 L- α -ジオレオイルホスファチジル(14-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサ)テトラデカノールの合成

1gのL- α -ジオレオイルホスファチジルコリン、1.9gの上記工程3で得られた14-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカノールに25mLのジクロロメタン、3.5mLの酢酸ナトリウム(100mM)-塩化カルシウム(50mM)緩衝液(pH6.5)、500UのホスホリパーゼDを加え、30°Cで終夜攪拌した。ジクロロメタン層を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を705mg得た。

工程5 L- α -ジオレオイルホスファチジル{14-N-(1-デオキシラクチオ-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサ}テトラデカノールの合成

400mgの上記工程4で得られたL- α -ジオレオイルホスファチジル(14-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサ)テトラデカノール、172mgのラクトース1水和物をH₂O(2mL)、メタノール(10mL)、ジクロロメタン(2mL)の混合液に溶解し、次いで0.4mLの酢酸、82mgのシアノリヒドロほう酸ナトリウムを加えて70°Cで終夜攪拌した。反応液を濃縮後、Bligh-Dyer法で目的物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、目的物(本発明誘導体)を248mg得た。

[0076] ESI-Mass (m/z) = 1247.0 ([M+H]⁺)

[0077] 実施例3 L- α -ジオレオイルホスファチジル-N-{14-(β -1-ラクトシロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシアセチル}エタノールアミンの合成

工程1 16, 16, 16-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘキサデカノールの合成

10gのペンタエチレングリコールを100mLのアセトニトリルと30mLのピリジンとの混合液に溶解し、0°Cにて11gの塩化トリチルを加え、室温で終夜攪拌した。反応液を氷水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を水洗後乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を6g得た。

工程2 16, 16, 16-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘキサデコキシ酢酸 ベンジルエステルの合成

5. 5gの上記工程1で得られた16, 16, 16-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘキサデカノールを30mLのジメチルホルムアミドに溶かし、この溶液を、2. 3gの水素化ナトリウムを100mLのテトラヒドロフランに懸濁させた液に、0°Cにて滴下した。室温で30分攪拌後、再び0°Cに冷却し、次いで、3. 5gのプロモ酢酸を加えた。室温で2時間攪拌後、反応液を10%硫酸水素カリウム水溶液にあけ、ジクロロメタンで抽出し、有機層を水洗後、乾燥し、減圧濃縮した。残渣に1. 7mLのベンジルアルコール、2. 4gの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、144mgの4-ジメチルアミノピリジンを加え50mLのジクロロメタン中、室温で終夜攪拌した。反応液を飽和重曹水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を5. 5g得た。

工程3 14-ヒドロキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシ酢酸 ベンジルエステルの合成

5. 3gの上記工程2で得られた16, 16, 16-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘキサデコキシ酢酸 ベンジルエステルを80mLのジクロロメタンに溶解し、4mLのトリフルオロ酢酸を加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を飽和重曹水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を2g得た。

工程4 14-(β -1-ヘプタアセチルラクチロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシ酢酸 ベンジルエステルの合成

1. 76gの β -ラクトース オクタアセタート、1. 5gの上記工程3で得られた14-ヒドロキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシ酢酸 ベンジルエステルを20mLのジクロロメタンに溶解し、0°Cにて2. 4mLの三フッ化ほう素ジエチルエーテル錯体を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を飽和重曹水にあけ、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を1. 1g得た。

工程5 14-(β -1-ラクチロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシ酢酸の合成

1gの上記工程4で得られた14-(β -1-ヘプタアセチルラクチロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシ酢酸 ベンジルエステルを18mLのメタノールに溶解し、2mLの28% ナトリウムメトキシド/メタノール溶液を加えて、室温で2時間攪拌した。反応液をAmberlite(登録商標)IRC-50で中和後、ろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣を水-酢酸エチルで分液し、水層を凍結乾燥して目的物を310mg得た。

工程6 L- α -ジオレオイルホスファチジル-N-{14-(β -1-ラクチロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシアセチル}エタノールアミンの合成

150mgの上記工程5で得られた14-(β -1-ラクチロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシ酢酸、360mgのL- α -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、139mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、33mgの1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを3mLのジクロロメタン中で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物(本発明誘導体)を44mg得た。

[0078] ESI-Mass (m/z) = 1269. 2 ([M+Na]⁺)

ESI-Mass (m/z) = 1291. 3 ([M+2Na]⁺)

ESI-Mass (m/z) = 1344. 9 ([M-H]⁻)

[0079] 実施例4 2-O-[2-N-{14-(β -1-ラクチロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオ

キサテトラデコキシアセチル}アミノエチル]カルバモイル-1, 3-ジオレオイルグリセロールの合成

228mgの実施例1・工程2で得られた2-O-(2-アミノエチル)カルバモイル-1, 3-ジオレオイルグリセロール、100mgの実施例3・工程5で得られた14-(β-1-ラクトシロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシ酢酸、46mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、33mgの1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを3mLのジクロロメタン中で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物(本発明誘導体)を65mg得た。

[0080] ESI-Mass (m/z) = 1232. 2 ([M+Na]⁺)

[0081] 実施例5 L-α-ジオレオイルホスファチジル{11-N-(1-デオキシラクチド-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサ}ウンデカノールの合成

工程1 11-{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールの合成

25gのテトラエチレングリコール、32. 8gの酸化銀に250mLのジクロロメタンを加え、17. 7gのメタンスルホニルクロリドのジクロロメタン溶液(50mL)を滴下した。反応液を室温で2日間攪拌後、セライトでろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を24g得た。

工程2 11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールの合成

23. 5gの上記工程1で得られた11-{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールと8. 4gのアジ化ナトリウムに100mLのジメチルホルムアミドを加え、110°Cで3時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、トルエンで共沸した。残渣を酢酸エチルに懸濁し、不溶物をろ過して除き、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を18. 5g得た。

工程3 11-アミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールの合成

3gの上記工程2で得られた11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールを35 mLのテトラヒドロフランに溶解し、3. 95mgのトリフェニルホスフィンを加え、室温で18時間攪拌した後、水10mLを加え、更に終夜攪拌した。反応液をトルエンと水で分

液し、水層を凍結乾燥して目的物を2.4g得た。

工程4 L- α -ジオレオイルホスファチジル(11-アミノ-3, 6, 9-トリオキサ)ウンデカノールの合成

1gのL- α -ジオレオイルホスファチジルコリン、1.5gの上記工程3で得られた11-アミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールに25mLのジクロロメタン、3.5mLの酢酸ナトリウム(100mM)-塩化カルシウム(50mM)緩衝液(pH6.5)、500UのホスホリパーゼDを加え、30°Cで終夜攪拌した。ジクロロメタン層を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を1.12g得た。

工程5 L- α -ジオレオイルホスファチジル{11-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサ}ウンデカノールの合成

600mgの上記工程4で得られたL- α -ジオレオイルホスファチジル(11-アミノ-3, 6, 9-トリオキサ)ウンデカノール、247mgのラクトース1水和物をH₂O(1mL)、メタノール(5mL)、ジクロロメタン(1mL)の混合液に溶解し、次いで0.6mLの酢酸、86mgのシアノトリヒドロほう酸ナトリウムを加え、70°Cで終夜攪拌した。反応液を濃縮後、Bligh-Dyer法で目的物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物(本発明誘導体)を423mg得た。

[0082] ESI-Mass (m/z) = 1200.9 ([M-H]⁻)

[0083] 実施例6 L- α -ジオレオイルホスファチジル{29-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサ}ノナコサノールの合成

工程1 11-アジド-1-{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールの合成

13.5gの実施例5・工程2で得られた11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカノールと12.5gのトリエチルアミンを200mLのジクロロメタンに溶解し、0°Cにて9.2gのメタンサルホニルクロリドを滴下後、室温で1時間攪拌した。その後、反応液を減圧濃縮し、酢酸エチル/ヘキサン(1/1)を加えて不溶物をろ過して除き、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を15.3g得た。

工程2 19, 19, 19-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサノデカノールの合成

25gのヘキサエチレングリコールを100mLのアセトニトリルと30mLのピリジンとの混合液に溶解し、0°Cにて12.5gの塩化トリチルを加え、室温で終夜攪拌した。反応液を氷水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を水洗後乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を15.7g得た。

工程3 1-アジド-31, 31, 31-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサヘントリアコンタノールの合成

15gの上記工程2で得られた19, 19, 19-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサノデカノールを100mLのジメチルホルムアミドに溶解させた。かかる溶液を、1.3gの水素化ナトリウムを50mLのジメチルホルムアミドに懸濁させた液に、0°Cにて滴下した。室温で1時間攪拌後、再び0°Cに冷却し、次いで、7gの上記工程1で得られた11-アジド-1-{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9-トリオキサウンデカンを50mLのジメチルホルムアミドに溶解させた溶液を滴下し、110°Cで2時間攪拌した。反応液を氷水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を水洗後乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を10.5g得た。

工程4 29-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサノナコサノールの合成

10.3gの上記工程3で得られた1-アジド-31, 31, 31-トリフェニル-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサヘントリアコンタノールをベンゼンスルホン酸のメタノール溶液(0.38M)41mLに溶解し、室温で10分攪拌後、水50mLを加え、メタノールを減圧濃縮した。残渣をペンタンで洗浄し、水層を凍結乾燥した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を6.7g得た。

工程5 29-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサノナコサノールの合成

6.5gの上記工程4で得られた29-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサノナコサノールを60mLのメタノールに溶解し、1gの10%パラジウム/炭

素存在下、6時間水素添加した。反応液をろ過し、ろ液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を4.7g得た。

工程6 L- α -ジオレオイルホスファチジル(29-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサ)ノナコサノールの合成

1gのL- α -ジオレオイルホスファチジルコリン、3.6gの上記工程5で得られた29-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサノナコサノールに25mLのジクロロメタン、3.5mLの酢酸ナトリウム(100mM)-塩化カルシウム(50mM)緩衝液(pH6.5)、500UのホスホリパーゼDを加え、30°Cで終夜攪拌した。ジクロロメタン層を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を660mg得た。

工程7 L- α -ジオレオイルホスファチジル{29-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサ}ノナコサノールの合成

500mgの上記工程6で得られたL- α -ジオレオイルホスファチジル(29-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサ)ノナコサノール、158mgのラクトース1水和物をH₂O(1mL)、メタノール(5mL)、ジクロロメタン(1mL)の混合液に溶解し、次いで0.6mLの酢酸、55mgのシアノトリヒドロほう酸ナトリウムを加え、70°Cで終夜攪拌した。反応液を濃縮後、Bligh-Dyer法で目的物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物(本発明誘導体)を320mg得た。

[0084] ESI-Mass (m/z) = 1465.0 ([M-H]⁻)

[0085] 実施例7 2-O-[2-{N-(1-デオキシラクチト-1-イル)-N-エチル}アミノエチル]カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールの合成

300mgの実施例1で得られた2-O-{2-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノエチル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、39mgのアセトアルデヒドをメタノール(14mL)、ジクロロメタン(7mL)の混合液に溶解し、次いで1mLの酢酸、109mgのシアノトリヒドロほう酸ナトリウムを加えて50°Cで終夜攪拌した。反応液を濃縮後、Bligh-Dyer法で目的物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物(本発明誘導体)を200mg得た。

[0086] ESI-Mass (m/z) = 1062. 0 ([M+H]⁺)

[0087] 実施例8 2-O-{11-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデシル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールの合成

工程1 1, 11-ジ{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9-トリオキサウンデカンの合成

15gのテトラエチレングリコール、23. 4gのトリエチルアミンを200mLのジクロロメタンに溶解し、0℃にて22. 1gのメタンスルホニルクロリドを滴下し、1時間攪拌した。反応液をろ過して不溶物を除き、ろ液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル-水で分液し、有機層を水洗後乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を27g得た。

工程2 1, 11-ジアジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカンの合成

23gの上記工程1で得られた1, 11-ジ{(メチルスルホニル)オキシ}-3, 6, 9-トリオキサウンデカンと12. 8gのアジ化ナトリウムを300mLのジメチルホルムアミド中、110℃で2時間攪拌後、反応液を氷水にあけ、酢酸エチルで抽出し、有機層を水洗後乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を13. 8g得た。

工程3 1, 11-ジアミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデカンの合成

13. 5gの上記工程2で得られた1, 11-ジアジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン

を350mLのテトラヒドロフランに溶解し、31. 9gのトリフェニルホスフィンを加え室温で終夜攪拌した後、水50mLを加え、更に終夜攪拌した。反応液をトルエンと水で分液し、水層を凍結乾燥して目的物を10. 4g得た。

工程4 11-t-ブトキシカルボニルアミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデシルアミンの合成

3gの上記工程3で得られた1, 11-ジアミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデカン

をテトラヒドロフラン(5mL)に溶解し、氷冷下、二炭酸ジ-t-ブチル(1. 14g)のテトラヒドロフラン溶液(5mL)を滴下した。滴下後室温で終夜攪拌し、反応液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルに溶解し、飽和食塩水で洗浄、有機層を乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物を1g得た。

工程5 2-O-(11-アミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデシル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールの合成

実施例1の工程2において、N-(t-ブトキシカルボニル)-1, 2-エチレンジアミンの代わりに650mgの上記工程4で得られた11-t-ブトキシカルボニルアミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデシルアミンを用い、目的物を800mg得た。

工程6 2-O-{11-N-(1-デオキシラクチド-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデシル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールの合成

700mgの上記工程5で得られた2-O-(11-アミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデシル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、300mgのラクトース1水和物をH₂O(1mL)、メタノール(5mL)、ジクロロメタン(1mL)の混合液に溶解し、次いで0.8mLの酢酸、157mgのシアノトリヒドロほう酸ナトリウムを加え、70°Cで終夜攪拌した。反応液を濃縮後、Bligh-Dyer法で目的物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的物(本発明誘導体)を508mg得た。

[0088] ESI-Mass (m/z) = 1165. 9 ([M+H]⁺)

[0089] 実施例9 本発明担体の分散液の調製(1)

3. 75mgの2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、1. 25mgの実施例2に係る本発明誘導体及び5mgの卵黄レシチンをバイアル中で0. 5mLのクロロホルムに溶解し、これに窒素ガスを吹きつけてクロロホルムを除去し、バイアルの壁面に薄膜を形成させた。これを更に減圧下で一晩放置した後、1. 995mLの10%マルトース及び5 μLの1N塩酸を加えてボルテックスミキサーで薄膜を剥がした。4°Cで3時間放置した後、マイクロプローブを用いて、1分間超音波処理を行い、5mg/mLの本発明担体の分散液を調製した。

[0090] 実施例10 本発明担体の分散液の調製(2)

2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを3. 75mg、実施例2に係る本発明誘導体を2. 5mg及び卵黄レシチンを3. 75mg用い、実施例9と同様に本発明担体の分散液を調製した。

[0091] 実施例11 本発明担体の分散液の調製(3)

2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセ

ロールを3.75mg、実施例2に係る本発明誘導体を3.75mg及び卵黄レシチンを2.5mg用い、実施例9と同様に本発明担体の分散液を調製した。

[0092] 実施例12 本発明担体の分散液の調製(4)

2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを3.75mg、実施例2に係る本発明誘導体を5mg及び卵黄レシチンを1.25mg用い、実施例9と同様に本発明担体の分散液を調製した。

[0093] 実施例13 本発明担体の分散液の調製(5)

2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを3.75mg及び実施例2に係る本発明誘導体を6.25mg用い、実施例9と同様に本発明担体の分散液を調製した。

[0094] 実施例14 本発明担体の分散液の調製(6)

2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを3.75mg、参考例1に係る化合物を3.75mg及び卵黄レシチンを2.5mg用い、実施例9と同様に本発明担体の分散液を調製した。

[0095] 実施例15 本発明担体の分散液の調製(7)

2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを3.75mg、参考例1に係る化合物を6.25mg用い、実施例9と同様に本発明担体の分散液を調製した。

[0096] 比較例1 比較対照用担体の分散液の調製

2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを3.75mg及び卵黄レシチンを6.25mg用い、実施例9と同様に比較対照用担体の分散液を調製した。

[0097] 試験例1

(1) 組成物の調製

1 μ gのルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドに50 μ Lの10%マルトースを添加し、20 μ g/mLの濃度で上記プラスミドを含む溶液を50 μ L調製した。また、6 μ Lの実施例9~13又は比較例1に係る担体の分散液に、44 μ Lの10%マルトースを添加し、600 μ g/mLの担体希釈液を50 μ L調製した。

50 μ Lの担体希釈液に対して、50 μ Lの上記核酸溶液を添加し、軽く混合した。その後、15分間室温で放置し、10 μ g/mLの濃度で上記プラスミドを含む組成物を100 μ L調製した。

(2) 実験方法

96ウェルプレートに、ヒト肝細胞癌由来の細胞株であるHuH-7細胞を 1×10^4 cells/wellで播種し、37°C、5%CO₂条件下で18時間培養した。その後、1ウェルにつき、上記(1)で調製した実施例9~13又は比較例1に係るいずれかの担体を含む組成物を10 μ L添加し、更に培養を続けた。組成物添加から24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定は、Steady Glo Luciferase Assay System(プロメガ社製)を用い、トップカウント(パッカード社製)により生物発光を検出することにより行った。なお、比較例1に係る担体を含む組成物を添加した細胞を比較対照とした。

(3) 試験結果

その結果、図1に示すように、実施例2に係る本発明誘導体を含有する本発明組成物を用いた場合、当該組成物に含有されているルシフェラーゼ遺伝子の発現効率は、比較対照に比べて、当該誘導体の濃度依存的に増加していることが判った。

[0098] 試験例2

(1) 組成物の調製

Alexa Fluor 488で標識したcontrol siRNA(キアゲン社製、Cat # 1022563、以下同じ。)を注射用水に溶解させ、20 μ Mの濃度で当該siRNAを含む溶液(以下、「核酸原液」という)を調製した。5 μ Lの上記核酸原液に45 μ Lの10%マルトースを添加し、2 μ Mの濃度で上記siRNAを含む溶液(以下、「核酸希釈液」という)を50 μ L調製した。また、4.5 μ Lの実施例13、14又は比較例1に係る担体の分散液に、45.5 μ Lの10%マルトースを添加し、450 μ g/mLの担体希釈液を50 μ L調製した。50 μ Lの担体希釈液に対して、50 μ Lの上記核酸希釈液を添加し、軽く混合した。その後、15分間室温で放置し、1 μ Mの濃度で上記siRNAを含む組成物を100 μ L調製した。

(2) 実験方法

6ウェルプレートにHuH-7細胞を 4×10^5 cells/wellで播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で18時間培養した。その後、1ウェルにつき、上記(1)で調製した実施例13、14又は比較例1に係るいずれかの担体を含む組成物を、siRNAの終濃度が100nMになるように添加し、更に培養を続けた。組成物添加から24時間後に、細胞を2mLのPhosphate buffered saline (pH7.4) (以下、「PBS」という)で2度洗浄し、500 μL のトリプシン/EDTA(シグマ社製)で細胞を剥がし、エッペンドルフチューブに回収した。3000rpmで3分間遠心した後、上清を除き、1mLのPBSで細胞を再懸濁させた。更に、3000rpmで3分間遠心した後、上清を除き、0.5mLのPBSで細胞を再懸濁させた。これらの細胞についてFACS Calibar(登録商標)(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて、細胞毎の蛍光強度を測定した。なお、比較例1に係る担体を含む組成物を添加した細胞を比較対照とし、無処理の細胞を陰性対照とした。

(3) 試験結果

実施例13に係る本発明担体を含む本発明組成物の結果を図2に、また、実施例14に係る本発明担体を含む本発明組成物の結果を図3に示す。これらの結果から、実施例13及び14に係る本発明担体を含む両組成物は、肝細胞への指向性を有することが判った。

[0099] 試験例3

(1) オリゴ二本鎖RNA溶液の調製

配列番号1の塩基配列を有するオリゴRNAと配列番号2の塩基配列を有するオリゴRNAを、それぞれの濃度が100 μM になるように注射用水に溶解し、その後、それぞれ20 μL を試験管中で混合した。これに60 μL の注射用水を添加することにより、20 μM の濃度でそれぞれのオリゴRNAを含む溶液(以下、「核酸溶液」という)を調製した。なお、上記2つのオリゴRNAの合成は、日本バイオサービスに依頼した。

(2) 組成物の調製

実施例15又は比較例1に係る担体の分散液と、核酸原液として、上記(1)で調製した核酸溶液を用い、試験例2・(1)と同様に、1 μM の濃度でそれぞれのオリゴRNAを含む組成物を100 μL 調製した。

(3) 使用細胞株

下記(4)では、HuH-7細胞を用いた、HCVのレプリコン保持細胞を用いた。かかる細胞には、HCVのゲノム構造蛋白質コード領域にネオマイシン耐性遺伝子をコードした、HCVのレプリコンRNAが導入させている。かかる細胞内では、レプリコンの自律複製がなされるため、ネオマイシン耐性遺伝子の産物であるNPTIIが発現する。かかる細胞の詳細については、文献(Biochemical and Biophysical Research Communications、2000年、293巻、p. 993-999)を参照されたい。なお、評価時の培地としては、DMEM培地(シグマ社製)に10%のFBS(バイオウエスト社製)を含有する培地を用いた。評価時以外は、上記培地に、更に400 μ g/mlのG418(インビトロジェン社製)を含有する培地を用いた。

(4) 実験方法

12ウェルプレートに細胞を 5×10^4 cells/wellで播種し、37°C、5%CO₂条件下で一晩培養した。翌日、培養プレートから培地を吸引し、0.9mlの培地を加えて培地交換を行った。その後、1ウェルにつき、上記(2)で調製した実施例15又は比較例1に係る担体を含む組成物を、任意の最終濃度になるように、0.1ml添加した。当該組成物を添加後、CO₂インキュベーター内にて96時間培養した後、細胞をPBSで2回洗浄し、細胞を回収し、タンパク質を抽出した。

抽出したタンパク質中のNPTIIの濃度を、PathoScreen Kit for NPTII(アグディア社製)により測定した。なお、タンパク質の抽出にはキットに付属の抽出緩衝液を用いた。また、抽出したタンパク質中の総タンパク質の濃度を、BCA Protein Assay(ピアス社製)により測定した。なお、比較例1に係る担体を含む組成物を添加した細胞を比較対照とし、上記(2)で調製した組成物の代わりに10%マルトースを添加した細胞を陰性対照とした。

(5) 評価方法

評価は、陰性対照を加えたときの単位タンパク質量中のNPTII量を100%として、NPTII発現率を比較することにより行った。NPTII発現率が低いほど、レプリコンの複製が抑制されていることを示している。

(6) 試験結果

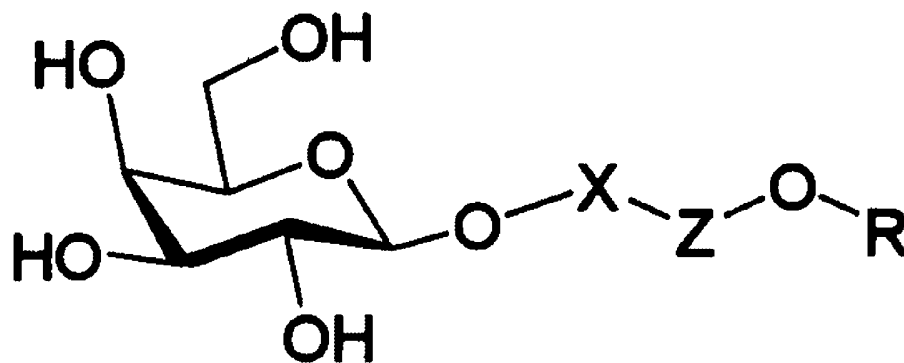
その結果、図4に示すように、実施例15に係る本発明担体を含む本発明組成物を

用いた場合、比較対照よりも強く、レプリコンの複製を抑制していることが判った。

請求の範囲

[1] 次の一般式(I)で表されるガラクトース誘導体。

[化28]

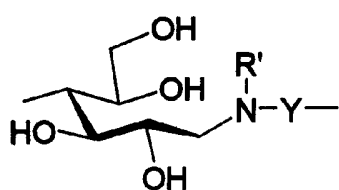


(I)

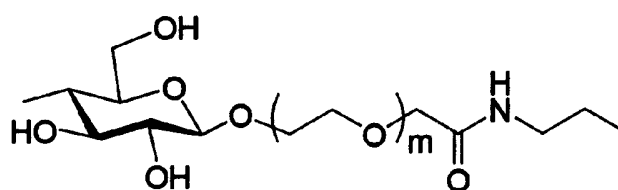
式(I)中、Xは次の式(II)又は(III)を表し、Zは次の式(IV)又は(V)を表し、Rは次の式(VI)又は(VII)を表す。

X:

[化29]



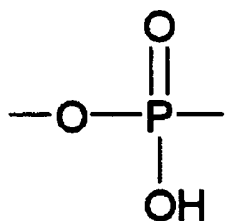
(II)



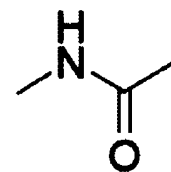
(III)

Z:

[化30]



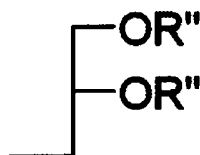
(IV)



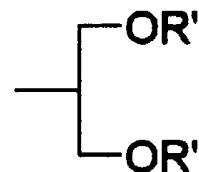
(V)

R:

[化31]



(VI)

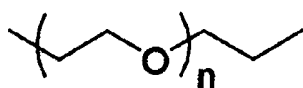


(VII)

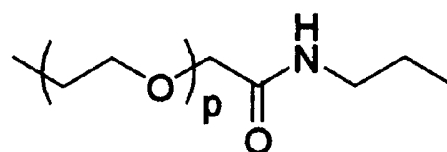
式(II)中、Yは次の式(VIII)又は(IX)を表し、R'は水素又は置換されていてもよい炭素数1~10のアルキルを表す。式(VI)、(VII)中、R''は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪族炭化水素基、又は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪酸残基を表す。

Y:

[化32]



(VIII)



(IX)

式(III)、(VIII)、(IX)中、m、n、pはそれぞれ独立して0～50の整数を表す。

但し、次のガラクトース誘導体を除く。

(1) 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジル-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)エタノールアミン、

(2) 一般式(I)中、Xが式(II)であって、Yが式(VIII)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体、

(3) 一般式(I)中、Xが式(II)であって、Yが式(IX)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体、及び

(4) 一般式(I)中、Xが式(III)であって、Zが式(IV)であって、Rが式(VII)であるガラクトース誘導体。

[2] 下記(1)～(8)のガラクトース誘導体からなる群から選択される請求項1に記載のガラクトース誘導体。

(1) 2-O-{2-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノエチル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、

(2) L- α -ジオレオイルホスファチジル{14-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサ}テトラデカノール、

(3) L- α -ジオレオイルホスファチジル-N-{14-(β -1-ラクトシロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシアセチル}エタノールアミン、

(4) 2-O-[2-N-{14-(β -1-ラクトシロキシ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデコキシアセチル}アミノエチル]カルバモイル-1, 3-ジオレオイルグリセロール、

(5) L- α -ジオレオイルホスファチジル{11-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサ}ウンデカノール、

(6) L- α -ジオレオイルホスファチジル{29-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサ}ノナコサノール、

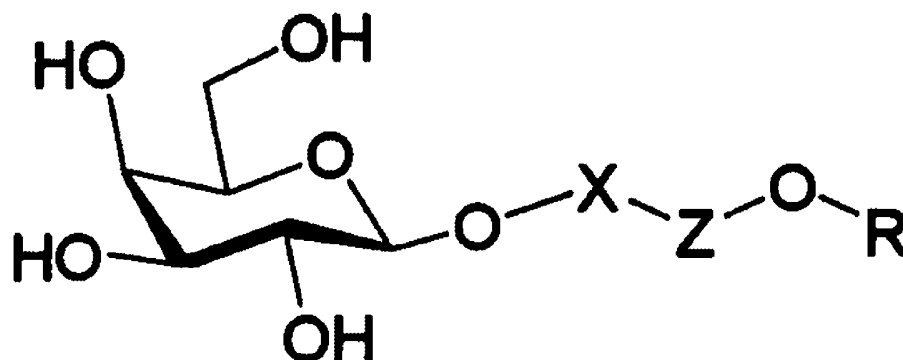
(7) 2-O-[2-{N-(1-デオキシラクチト-1-イル)-N-エチル}アミノエチル]カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール、及び

(8) 2-O-{11-N-(1-デオキシラクチト-1-イル)アミノ-3, 6, 9-トリオキサ

ウンデシル}カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロール。

- [3] 次の一般式(I)で表されるガラクトース誘導体とカチオン性脂質とを含有する薬物担体。

[化33]

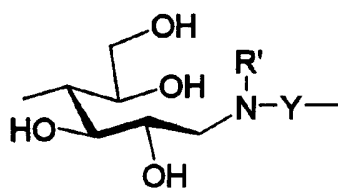


(I)

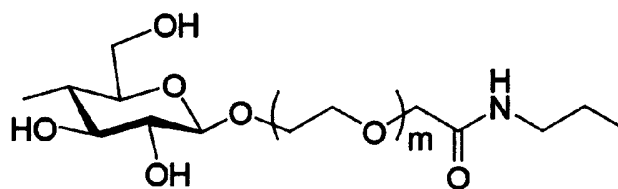
式(I)中、Xは次の式(II)又は(III)を表し、Zは次の式(IV)又は(V)を表し、Rは次の式(VI)又は(VII)を表す。

X:

[化34]



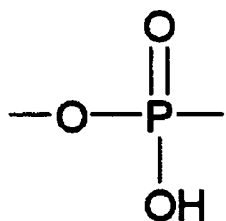
(II)



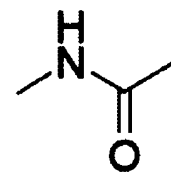
(III)

Z:

[化35]



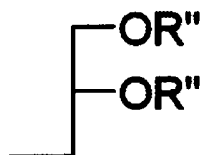
(IV)



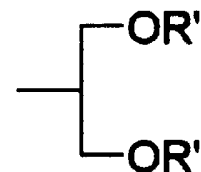
(V)

R:

[化36]



(VI)

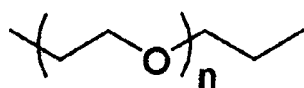


(VII)

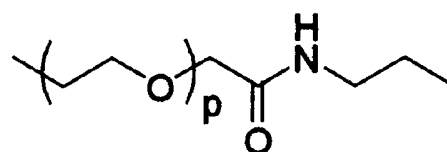
式(II)中、Yは次の式(VIII)又は(IX)を表し、R'は水素又は置換されていてもよい炭素数1~10のアルキルを表す。式(VI)、(VII)中、R''は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪族炭化水素基、又は炭素数10~30の飽和若しくは不飽和の脂肪酸残基を表す。

Y:

[化37]



(VIII)



(IX)

式(III)、(VIII)、(IX)中、 m 、 n 、 p はそれぞれ独立して0～50の整数を表す。

但し、次のガラクトース誘導体を除く。

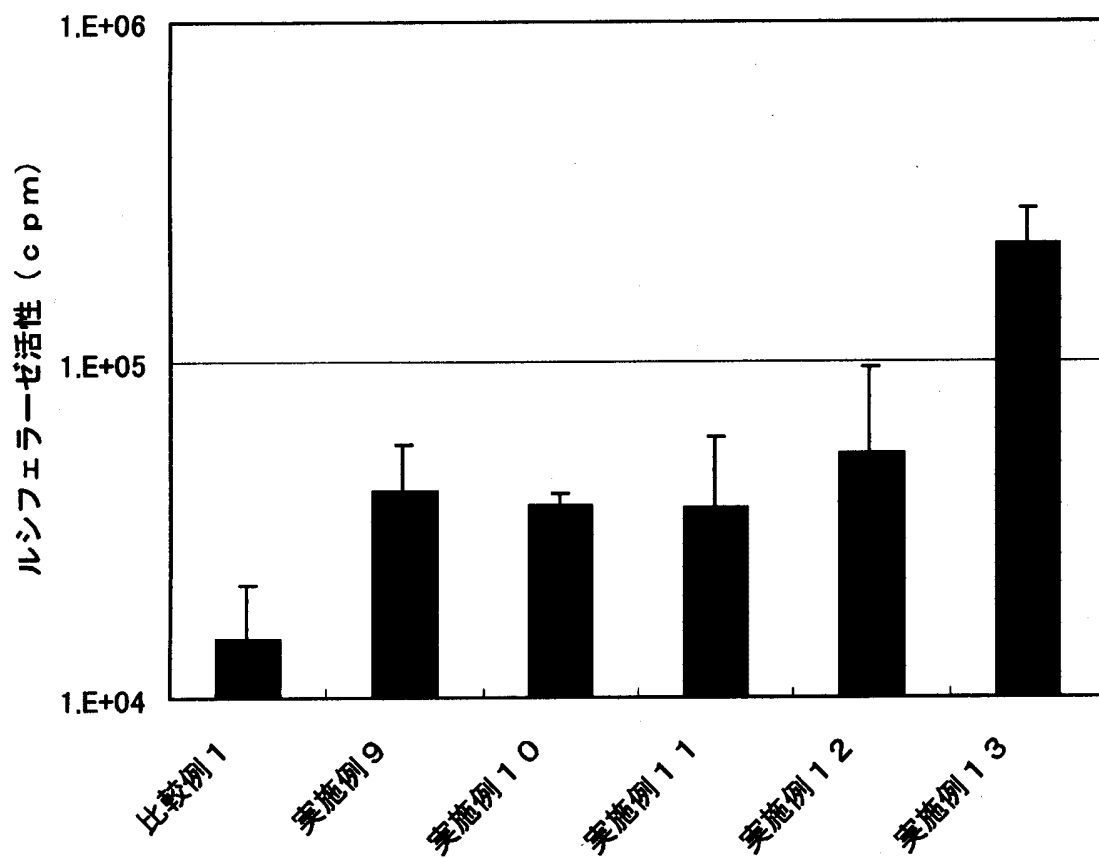
(1)一般式(I)中、 X が式(II)であって、 Y が式(VIII)であって、 Z が式(IV)であって、 R が式(VII)であるガラクトース誘導体、

(2)一般式(I)中、 X が式(II)であって、 Y が式(IX)であって、 Z が式(IV)であって、 R が式(VII)であるガラクトース誘導体、及び

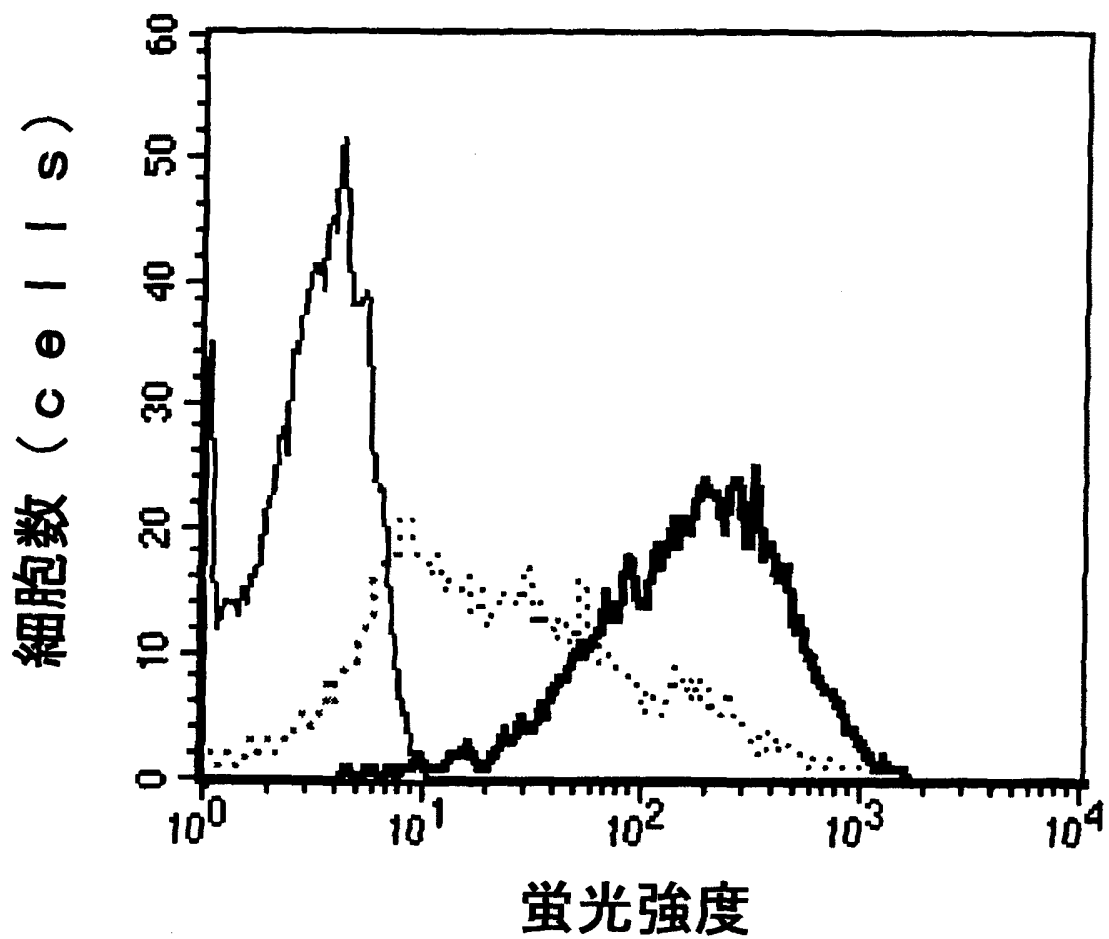
(3)一般式(I)中、 X が式(III)であって、 Z が式(IV)であって、 R が式(VII)であるガラクトース誘導体。

- [4] ガラクトース誘導体が1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-N-(1-デオキシラクチオ-1-イル)エタノールアミンである、請求項3に記載の薬物担体。
- [5] カチオン性脂質が2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールである、請求項3又は4のいずれかに記載の薬物担体。
- [6] 更にリン脂質を含有する、請求項3～5のいずれかに記載の薬物担体。
- [7] 医薬を包含する、請求項3～6のいずれかに記載の薬物担体を含有する医薬組成物。
- [8] 医薬が、二本鎖RNA、二本鎖DNA、オリゴ核酸又は水溶性陰イオン化合物である、請求項7に記載の医薬組成物。
- [9] オリゴ核酸が、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、DNAエンザイム、リボザイム又はアプタマーである、請求項8に記載の医薬組成物。

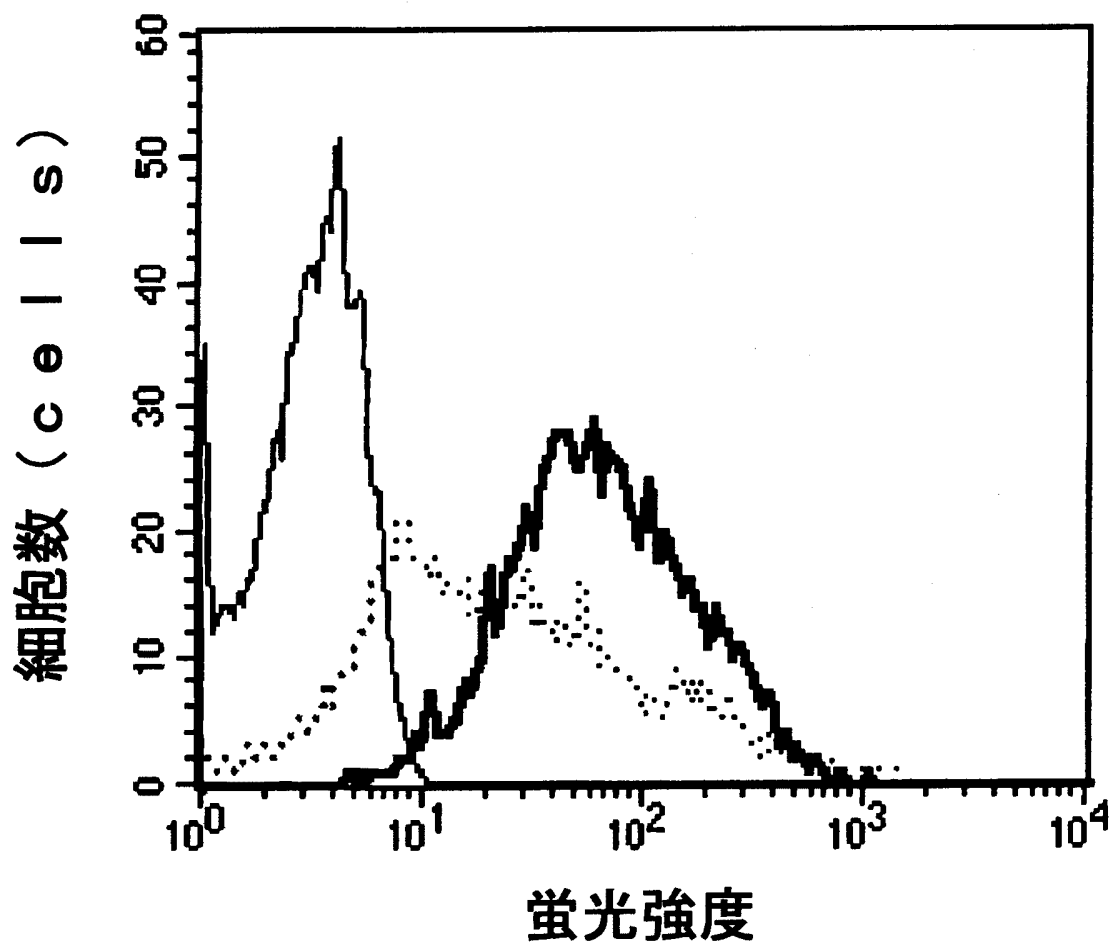
[図1]



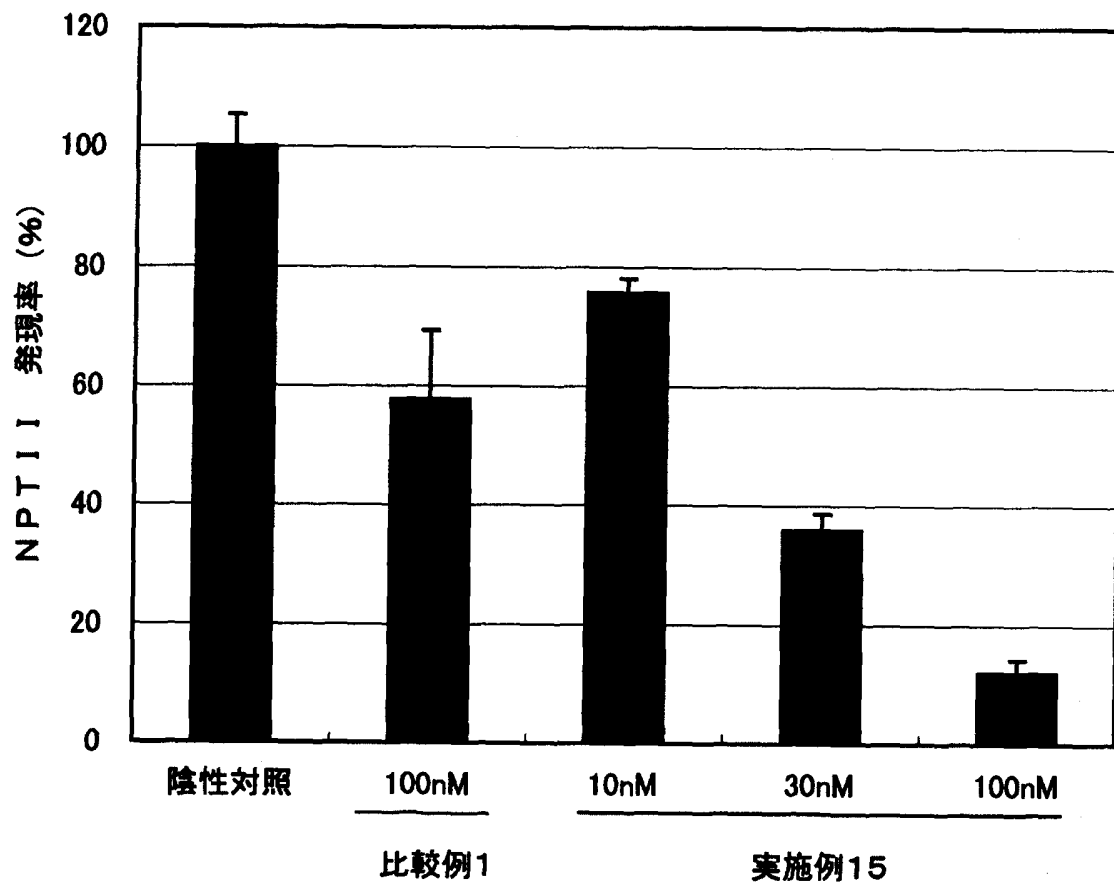
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07H15/04 (2006.01), A61K47/24 (2006.01), A61K47/26 (2006.01), C07H3/04 (2006.01), C07H15/08 (2006.01)		
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) C07H15/04 (2006.01), A61K47/24 (2006.01), A61K47/26 (2006.01), C07H3/04 (2006.01), C07H15/08 (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	POHLENTZ, Gottfried et al., 1-Deoxy-1-phosphatidylethanolamino-lactitol-type neoglycolipids serve as acceptors for sialyltransferases from rat liver Golgi vesicles, European Journal of Biochemistry, 1992, 203(3), 387-389, particularly, Fig. 1	1 3, 5-9 2, 4
X Y A	POHLENTZ, Gottfried et al., Neoglycolipids derived from phosphatidylethanolamine serve as probes in cell culture studies on glycolipid metabolism, Biological Chemistry, 2000, 381(1), 29-34, particularly, Fig. 1	1 3, 5-9 2, 4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document 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 02 December, 2005 (02.12.05)		Date of mailing of the international search report 13 December, 2005 (13.12.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POHLENTZ, Gottfried et al., Neoglycolipids of	1
Y	1-deoxy-1-phosphatidylethanolaminolactitol	3,5-9
A	type: synthesis, structure analysis, and use as probes for characterization of glycosyltransferases, Methods in Enzymology, 1994, 242 (Neoglycoconjugates, Pt. A), 127-145	2,4
Y	JP 9-235292 A (DAIICHI PHARM CO LTD), 09 September, 1997 (09.09.97), Full text (Family: none)	3,5-9
Y	JP 7-188274 A (HOHNEN CORP), 25 July, 1995 (25.07.95), Full text (Family: none)	3,5-9
Y	JP 6-271597 A (DDS KENKYUSHO KABUSHIKI KAISHA), 27 September, 1994 (27.09.94), Full text & JP 2774430 B2	3,5-9
Y	WO 1994/018987 A1 (NIPPON SHINYAKU CO LTD), 01 September, 1994 (01.09.94), Full text & EP 685234 A1	3,5-9
Y	WO 1994/019314 A1 (NIPPON SHINYAKU CO LTD), 01 September, 1994 (01.09.94), Full text & EP 685457 A1	3,5-9
A	XU, Zhong et al., Synthesis and characterization of oligomaltose-grafted lipids with application to liposomes, Journal of Colloid and Interface Science, 2002, 252(1), 57-65	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015424

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Concerning the inventions according to claims 1 to 9 characterized by the general formula (I) and use of the same, in the case where the alternative in the structure of the galactose derivative of the general formula (I) having O-X- attached to the 1-position of galactose is the compound of the formula (III), the structure corresponds to a well known galactose structure to which a linking group having an arbitrary ethoxy repeating unit is attached. Namely, there is no characteristic chemical structure common to the chemical structure of the formula (II). As reported in JP-6-271597 A, a compound in which a phospholipid is attached to a saccharide via a linking group has been publicly known per se and there is no characteristic (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

In claims 1 to 9, the inventions wherein the galactose derivatives of the general formula (I) are derivatives having the chemical structures of the formulae (II) and (III).

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015424

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

chemical structure common to the case wherein the combination of the alternatives corresponding to the substituent Z-O-R comprises (IV), (VI) and (VII) and the case wherein the combination comprises (V), (VI) and (VII). Such being the case, claims 1 involves inventions relating to at least four compounds having different main chemical structures and, therefore, claims 2, 3 and 5 to 9 depending thereon each involves at least four inventions corresponding respectively to the compounds as claimed in claim 1.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C07H15/04** (2006.01), **A61K47/24** (2006.01), **A61K47/26** (2006.01), **C07H3/04** (2006.01), **C07H15/08** (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C07H15/04** (2006.01), **A61K47/24** (2006.01), **A61K47/26** (2006.01), **C07H3/04** (2006.01), **C07H15/08** (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	POHLENTZ, Gottfried et al., 1-Deoxy-1-phosphatidylethanolamino-lactitol-type neoglycolipids serve as acceptors for sialyltransferases from rat liver Golgi vesicles, European Journal of Biochemistry, 1992, 203(3), 387-389 特に図1	1 3, 5-9 2, 4
X Y A	POHLENTZ, Gottfried et al., Neoglycolipids derived from phosphatidylethanolamine serve as probes in cell culture studies on glycolipid metabolism, Biological Chemistry, 2000, 381(1),	1 3, 5-9 2, 4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.12.2005

国際調査報告の発送日

13.12.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

淵野 留香

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4P

9048

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	29-34 特に図 1	
X	POHLENTZ, Gottfried et al., Neoglycolipids of	1
Y	1-deoxy-1-phosphatidylethanolaminolactitol type: synthesis,	3, 5-9
A	structure analysis, and use as probes for characterization of glycosyltransferases, Methods in Enzymology, 1994, 242 (Neoglycoconjugates, Pt. A), 127-145	2, 4
Y	JP 9-235292 A (DAIICHI PHARM CO LTD) 1997. 09. 09 全文 (フ ァミリー無し)	3, 5-9
Y	JP 7-188274 A (HOHNEN CORP) 1995. 07. 25 全文 (ファミリ ー無し)	3, 5-9
Y	JP 6-271597 A (DDS KENKYUSHO KK) 1994. 09. 27 全文 & JP 2774430 B2	3, 5-9
Y	WO 1994/018987 A1 (NIPPON SHINYAKU CO LTD) 1994. 09. 01 全文 & EP 685234 A1	3, 5-9
Y	WO 1994/019314 A1 (NIPPON SHINYAKU CO LTD) 1994. 09. 01 全 文 & EP 685457 A1	3, 5-9
A	XU, Zhong et al., Synthesis and characterization of oligomaltose-grafted lipids with application to liposomes, Journal of Colloid and Interface Science, 2002, 252(1), 57-65	1-9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

一般式 (I) 及びその用途に特徴を有する請求項1-9に係る発明に関し、一般式 (I) のガラクトース誘導体の構造中、ガラクトースの1位にO-X-が連結した構造のうち、選択肢が式 (III) の化合物である場合は、周知のラクトース部分に任意にエトキシ繰り返し単位を有する連結基が接続した構造であり、式 (II) の化学構造と共通する特徴的な化学構造は存在しない。また、特開平6-271597号公報にも記載されるとおり、糖にリン脂質が連結基を介して結合した化合物自体は公知であるところ、置換基Z-O-Rに相当する選択肢の組み合わせが(IV)と(VI)、(VII)である場合と、(V)と(VI)、(VII)である場合とに、共通する特徴的な化学構造は存在しない。してみると、請求の範囲1には、主要な化学構造の異なる少なくとも4種類の化合物に関する発明が包含されており、これを引用する請求項2, 3, 5-9にも、それぞれに請求項1に記載の化合物の発明に対応した4種類の発明が包含されている。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-9の中、一般式 (I) のガラクトース誘導体が式 (II) 及び(IV)の化学構造を有する誘導体である場合の発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。