

(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2005-526727

(P2005-526727A)

(43) 公表日 平成17年9月8日(2005.9.8)

| | | |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 47/22 | A 6 1 K 47/22 Z N M | 4 C O 7 6 |
| A 6 1 K 9/127 | A 6 1 K 9/127 | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 9/51 | A 6 1 K 9/51 | 4 C O 8 6 |
| A 6 1 K 31/7088 | A 6 1 K 31/7088 | |
| A 6 1 K 31/7105 | A 6 1 K 31/7105 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|-------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-569178 (P2003-569178) | (71) 出願人 | 503300306 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年2月19日 (2003.2.19) | | ノヴォソム アクチエンゲゼルシャフト |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成16年10月18日 (2004.10.18) | | ドイツ連邦共和国 O 6 1 2 O ハレ ヴ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2003/001661 | | アインベルクヴェーク 2 2 |
| (87) 国際公開番号 | W02003/070220 | (74) 代理人 | 100082005 |
| (87) 国際公開日 | 平成15年8月28日 (2003.8.28) | | 弁理士 熊倉 禎男 |
| (31) 優先権主張番号 | 102 07 177.2 | (74) 代理人 | 100084009 |
| (32) 優先日 | 平成14年2月19日 (2002.2.19) | | 弁理士 小川 信夫 |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (DE) | (74) 代理人 | 100084663 |
| | | | 弁理士 箱田 篤 |
| | | (74) 代理人 | 100093300 |
| | | | 弁理士 浅井 賢治 |
| | | (74) 代理人 | 100114007 |
| | | | 弁理士 平山 孝二 |
| | | 最終頁に続く | |

(54) 【発明の名称】 pH感受性カチオン脂質、それを含有するリポソーム及びナノカプセル

(57) 【要約】

本発明は、下記一般式を有する pK_a 値が3.5～8のpH感受性カチオン脂質に関する。

カチオン - スペーサー - Y - スペーサー - X - 脂質

(式中、Y及びXは結合基である。)

該カチオンは窒素を含むヘテロ環であって、特にイミダゾール及びモルフォリンである。本発明はまた、前記カチオン性脂質を含む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)を有する pK_a 値が3.5～8のpH感受性カチオン脂質。

(I) カチオン - スペース-2 - Y - スペース-1 - 両親媒性物質

[式中、(a)カチオンはイミダゾール、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からなる群より選ばれ、

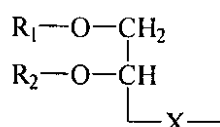
(b)スペース-1及び/又はスペース-2はエチレン系不飽和結合0、1又は2個とヒドロキシル基0～4個を含む直鎖、分枝鎖又は環状構造をもつC原子8個までを有する低級アルキル残基であり、

(c)Yは欠除部分；-(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(II)又は(III)

【化 1】

(II)

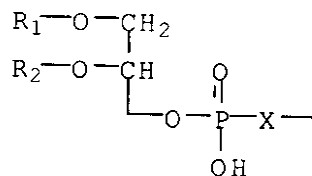


(式中、 R_1 及び R_2 は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有する C_8-C_{30} アルキル鎖又はアシル鎖であり、

Xは欠除部分；-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-である。) 又は

【化 2】

(III)



(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。)

を有する構造を含んでいる。]

【請求項 2】

両親媒性分子成分が C_8-C_{30} アルコールでエステル化した1,4-又は1,5-ジカルボン酸であることを特徴とする、請求項1記載の脂質。

【請求項 3】

ジカルボン酸がアスパラギン酸、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/又はマレイン酸であることを特徴とする、請求項2記載の脂質。

【請求項 4】

両親媒性分子成分が、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 C_8-C_{30} 脂肪酸とのジアミドの群より選ばれ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】

両親媒性分子成分が下記式(IV)：

20

30

40

【化 3】



(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は欠除部分、-O-; -NH-及び/又は-S-を含む群より選ばれる。)

を有する化合物であることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の脂質。

【請求項 6】

R₁及びR₂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、及びリノレノイルの残基及び/又はその対応するアルコールからなる群より選ばれることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の脂質。

【請求項 7】

脂質のpK_a値が4～6.5であ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

【請求項 8】

結合基X及び/又はYが-(C=O)-O-、-(C=O)-NH-、-(C=O)-S-、-O-、-NH-、-S-、-CH=N-、-O-(O=C)-、-S-(O=C)-、-NH-(O=C)-、及び/又は-N=CH-からなる群より選ばれ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】

スパーサー1及び/又はスパーサー2が糖及び/又はモノマー単位20個までを有する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1～8のいずれか1項に記載の脂質。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか1項に記載のpH感受性カチオン脂質を含むリポソーム。

【請求項 1 1】

リポソームが5～50モル%、好ましくは5～40モル%、更に好ましくは10～30モル%の前記脂質を含んでいることを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載のリポソーム。

【請求項 1 2】

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、セラミド、スフィンゴ脂質、テトラエテル脂質、コレステロール及び/又はジアシルグリセロールを含んでいることを特徴とする、請求項10又は11記載のリポソーム。

【請求項 13】

リポソームがアニオン脂質、特にホスファチジルセリン、ホスファチジン酸及び/又はC
HEMSを含んでいることを特徴とする、請求項10～12のいずれか1項に記載のリポソーム。

【請求項 14】

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10～13のいずれか1項に記載のリポソーム。

【請求項 15】

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10～14のいずれか1項に記載のリポソーム。

【請求項 16】

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/又はデコイヌクレオチドであることを特徴とする、請求項1～15のいずれか1項に記載のリポソーム。

【請求項 17】

脂質1 mg当たり少なくとも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ボソーム内部に入り込んでいることを特徴とする、請求項1～16のいずれか1項に記載のリボソーム。

【請求項 18】

請求項1～9のいずれか1項に記載の脂質及び/又は請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソームを含むナノカプセル。

【請求項 19】

薬剤の活性物質として用いられる請求項1～9のいずれか1項に記載の脂質、請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソーム及び/又は請求項18記載のナノカプセル。

【請求項 20】

活性物質が予防、診断、治療、経過モニタリング及び/又はアフタケアに用いられる活性物質であることを特徴とする、請求項1～19のいずれか1項に記載の脂質、リポソーム及び/又はナノカプセル。

10

【請求項 21】

請求項1～9のいずれか1項に記載の少なくとも1種の脂質、請求項10～17のいずれか1項に記載の少なくとも1種のリポソーム及び/又は請求項18記載の少なくとも1種ナノカプセルを、任意により薬学的に許容しうる担体と共に含む医薬組成物。

【請求項 22】

製剤及び/又は前記製剤を受容個体に投与するアルゴリズムを与えるための、請求項1～9のいずれか1項に記載の少なくとも1種の脂質、請求項10～17のいずれか1項に記載の少なくとも1種のリポソーム、請求項18記載の少なくとも1種のナノカプセル及び/又は請求項21記載の医薬組成物を、任意によりキットの内容物の混合方法の情報と共に含むキット。

【請求項 23】

生体内トランスフェクションシステムであって、前記システムには遺伝物質で充填された請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソームが含まれていることを特徴とする、前記システム。

20

【請求項 24】

請求項10～17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、封入のための特定pH値と非結合活性物質除去のための第二pH値が用いられることを特徴とする、前記方法。

【請求項 25】

ナノカプセルの製造における請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

【請求項 26】

疾患の治療用薬剤の製造における請求項1～9のいずれか1項に記載の脂質、請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソーム、請求項18記載のナノカプセル、又は請求項22記載のキットの使用。

30

【請求項 27】

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10～17のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

【請求項 28】

活性物質を輸送及び/又は放出するための請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

【請求項 29】

デポ製剤及び/又は循環デポとしての請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

40

【請求項 30】

静脈内適用又は腹腔内適用における請求項10～17のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

【請求項 31】

生体内、試験管内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10～17のいずれか1項に記載のリポソームの使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

50

【0001】

本発明は、pH感受性カチオン脂質、即ち、pK値が3.5～8の有機カチオンの1種以上で頭の親水性基が置換されている両親媒性分子に基づく極性化合物に関する。本発明は、また、前記化合物を含有するリポソーム及びナノカプセル、及びそのようなリポソームの使用に関する。

“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、例えば、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、例えば、濃度、温度又はpH値に応答して性質を変化させるリポソームが開発された。様々な温度感受性リポソームやpH感受性リポソームが当該技術において既知である。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。

【0002】

以後、下記略号が用いられる。

| | |
|-------|-----------------|
| 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 |

周知のpH感受性リポソームは、特にCHEMSである。ホスファチジルエタノールアミンと混合したCHEMSが特に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。

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りポソームは、全体の電荷が負であり、不利なことに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。

このために、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ポソームの使用は、そのような正に荷電されたりポソームによって不利なことに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。

【0003】

周知の脂質とそのような脂質から形成された構造の欠点は、次のように纏めることができる。一般に、アニオンリポソームによって入り込むことができるタンパク質、DNA又はRNAの量は平均より少なく、様々な使用に不十分である。周知のカチオンリポソームを用いることにより、適切な量のタンパク質又は核酸又はその誘導体を取り込ませることが可能であるが、これらの構造はしばしば決定的な細胞毒性を有する。しかしながら、細胞融合を引き起こす特性を高めるために多量のホスファチジルエタノールアミンを封入した膜は安定性が低い。従って、周知のリポソームは下記の欠点を含んでいる。

- (a)不安定であること、
- (b)その内部に不十分な物質を運搬すること、又は
- (c)過度の細胞毒性があること。

そのような不利な特性を改善する試みは高細胞毒性や血清又は血液との不適合性にしば

しば付随している。周知の脂質やそれを含むリポソームの一部は必ずしも上記欠点のすべてを示すものではない。しかしながら、可能なだけの、即ち、2つの、好ましくは3つ以上の上記欠点が存在しない構造は知られていない。

【0004】

それ故、本発明の目的は、簡単に低コストで製造することができ、上記欠点を示さず、
 i) 活性物質をリポソーム内に安定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の製造を援助し；
 iii) 存在によって血清と混合し得るカチオンリポソームの製造を凝集体が主として形成せ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) 生分解性が良好で生物学的安定性が十分である
 新規化合物を提供することであった。

10

【0005】

本発明は、下記一般式(I)を有する pK_a 値が3.5~8のpH感受性カチオン脂質を供給することにより上記の技術的目的を達成する。

(I) カチオン - スペース-2 - Y - スペース-1 - 両親媒性物質

[式中、(a)カチオンはイミダゾール、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からなる群より選ばれ、

(b) スペース-1及び/又はスペース-2は直鎖、分枝鎖又は環状構造でエチレン系不飽和結合0、1又は2個を含むC原子8個までを有する低級アルキル残基であり、

20

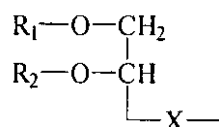
(c) Yは欠除部分；-(C=O)-O-；-(C=O)-NH-；-NH-(C=O)-O-；-O-；-NH-；-CH=N-；-O-(O=C)-；-S-；-(O=C)-；-NH-(O=C)-；-O-(O=C)-NH-；-N=CH- 及び/又は-S-S-を含み、

(d) 両親媒性物質は下記一般式(II)又は(III)を有する構造を含んでいる。

【0006】

【化1】

(II)



30

【0007】

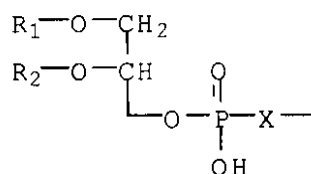
(式中、 R_1 及び R_2 は独立してエチレン系不飽和結合0、1又は2個を有する C_8-C_{30} アルキル鎖又はアシル鎖であり、

Xは欠除部分；-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-である。)

【0008】

【化2】

(III)



40

【0009】

(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。)

具体的な成分を次に説明する。

両親媒性物質

50

両親媒性物質は、二分子膜の膜形成化合物と膜性化合物双方を含んでいる。本発明の化合物の好ましい成分は、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-プロパンジオールのような両親媒性物質であり、これらは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-完全に-膜特性を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ためである。

また、両親媒性物質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-プロパンジオールが好ましい。これらの断片内に存在する長鎖アルキル又はアシルはC原子8~10個を有する。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個を有してもよい。天然脂質に見られる置換基、即ち、C原子12~20個を有し、不飽和結合0、1又は2個を有する直鎖脂肪酸又は脂肪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。一般に、そのことはN,N-ジアルキルアミンの長鎖アルキル残基にもあてはまる。

10

特に好ましい方法においては、特に、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、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る。それから誘導される次の両親媒性物質：1,4-又は1,5-ジカルボン酸、特にアスパラギン酸、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、マレイン酸又は実際に電荷をもつ置換基が残存するアミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、又は二重結合を介してカップリングされる同様の化合物の長鎖エステルが好ましい。

20

【0010】

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。

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、便利には簡単で安定なカップリングを可能にするか又は場合によっては立体スパ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。ヒドロキシル基、アミノ基、カルボキシル基が直接カップリングに特に適している。有利には、上記カップリングは生分解性が良好である。

30

YとXは結合官能基であり、その存在はいずれにせよ強制的でなく、Y及び/又はXの値が欠除部分であると考えてもよい。即ち、これらの官能基は存在しない。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。例えば、Y基はカチオン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。

40

スパーサー：

分子成分スパーサー-Y-スパーサー-Xはカチオンと両親媒性物質との間に位置する。スパーサーは、スパーサー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、好ましくは-CH₂-; -CH₂-CH₂-及び/又は-CH₂-CH₂-CH₂-である。スパーサーは、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、スパーサーは糖であり得る。有利には、スパーサーはポリエチレングリコールであり得、そのようなスパーサーはモノマー単位を20個まで含むことができる。

【0011】

カチオン：

分子全体は、pK_a値が3.5~8の有機カチオン1つ以上によりpH依存性荷電特性を呈する。

50

この特性を有する好ましい分子又は分子成分は窒素塩基である。これらの窒素塩基は、スパーサーとカップリング基によって脂質に結合するので、本発明の式を有する化合物を形成する。

カップリング反応によって、例えば、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、又はチロシンの誘導体から誘導される両親媒性有機カチオンが得られる。ピペラジン、イミダゾール、モルホリン、プリン及び/又はピリミジンが特に好ましい。

【0012】

多くの場合、例えば、窒素塩基が環系の形である場合、位置異性体が存在し、結合スパーサーは有機カチオンのいろいろな位置に置換される。そのような位置異性体は、本発明の開示の範囲内に包含される。多くの場合、有機カチオンの pK_a 値は前記位置異性によってのみ影響され得る。関連した基本的な法則は当業者によく知られている。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.). 好適方法においては、 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、特にラウロイル、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又はその対応するアルコールである。当業者は、好ましい両親媒性物質、Y、X、 R_1 、 R_2 、スパーサー及び/又はカチオンのほかに他の両親媒性物質、Y、X、 R_1 、 R_2 、スパーサー及び/又はカチオンの選択をよく知っている。この場合、好ましい両親媒性物質、Y、X、 R_1 、 R_2 、スパーサー及び/又はカチオンは本発明の構造の必須成分ではない。更に、スパーサー、Y及び/又はXを含まないことも有利であり得る。

【0013】

本発明の好適実施態様においては、化合物の pK_a 値は3.5~7、好ましくは4~6.5である。有利には、この pK_a 値は、多くの生物体の生理学に極めて重要である。

本発明の他の好適実施態様においては、カチオンはピペラジン、イミダゾール、モルホリン、プリン及び/又はピリミジンの誘導体である。

生物系に存在するような分子断片、特に4-イミダゾール(ヒスタミン)、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(ニコチン酸のエステル又はアミド)が非常に好ましい。

上記構造断片は、置換基が追加されてもよいことは当然である。例えば、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル残基、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された形であり得る。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。

更に、アニオンで解離した分子部分がpH範囲3.5~8.5で、例えば、カルボン酸、スルホン酸、又はある芳香族ヒドロキシル基、又はエノールを形成しない限り他の構造断片も可能である。

【0014】

好適 pK_a 値を有する窒素塩基は、窒素原子を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で1個又は複数個置換することにより形成される。この基から適した有機塩基は、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、又は対応する置換エチルアミンである。

10

20

30

40

50

好適 pK_a 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ることができる。分子の疎水性部分へのこれらの断片のカップリングは、塩基の窒素を介して又はヒドロキシル官能を介して進行することができる。

単一有機カチオンを含む誘導体のほかに、2つ又は3つの同じ基又は異なる基を含む誘導体も好ましい。これらの基のすべてが上記範囲の pK_a 値を有することが必要である。適切な一複合基は、ヒスタミンとヒスチジンのアミド又はヒスタミンとヒスチジルヒスチジンのアミドである。

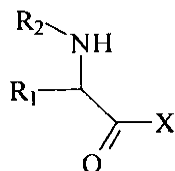
カルボン酸、スルホン酸、エノール又は芳香族ヒドロキシルのようなアニオン基は、特許請求した pH 範囲3.5~8.5で解離されない場合にのみ分子の成分として許容される。一般に、このことは pK_a 値が9.5より高い場合である。

10

本発明の好適実施態様においては、両親媒性物質は

【0015】

【化3】



【0016】

(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、

20

X は欠除部分、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ からなる群より選ばれる。)

より選ばれる。

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、

30

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

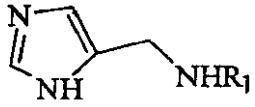
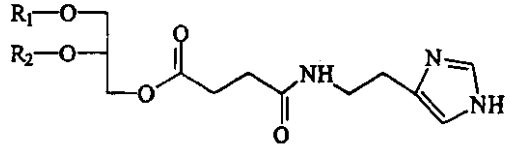
により調製することができる。

上記方法を用いた合成により得ることができる特に好ましい化合物としては、次の化合物(表1)が含まれ、ここで R_1 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。

40

【0017】

【表 1 - 1】

| | |
|---|---|
|  | <p>ヒスタミン誘導体。 遊離カルボキシル官能を有する両親媒性物質がアミドとしてカップリングされることが好ましい。また、ホスファチジルセリンのアミノ化が好ましい。</p> |
|  | <p>#59 ヒスタミンのジパルミトイルグリセロールコハク酸塩への結合。R₁、R₂の残基はアシル基、アルキル基又はアルケニル基である。</p> |

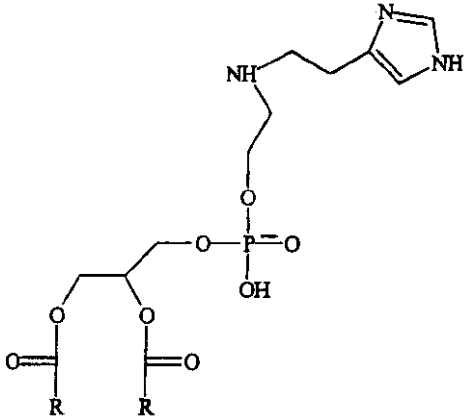
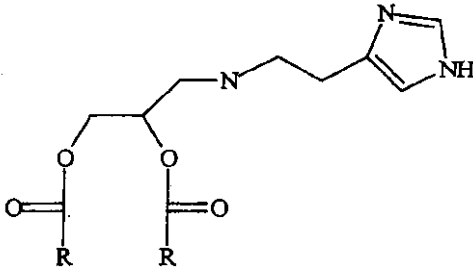
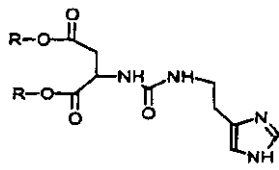
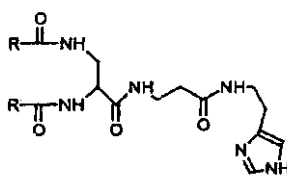
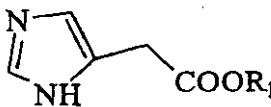
10

20

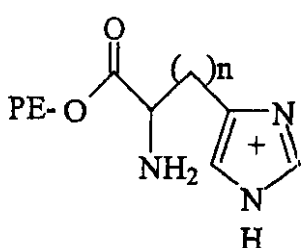
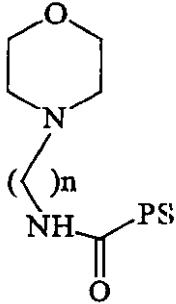
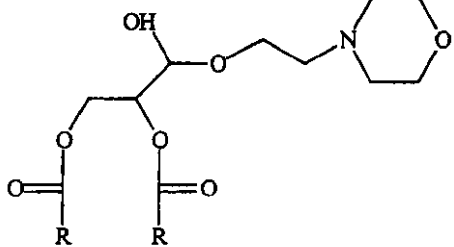
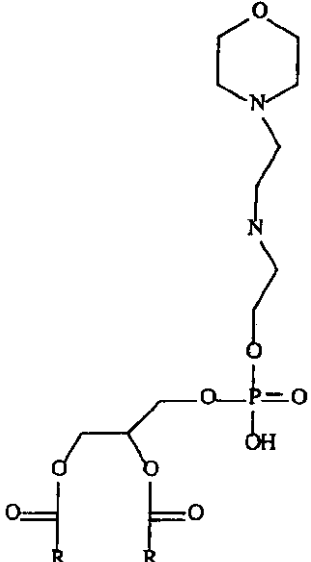
30

40

【表 1 - 2】

| | | |
|---|---|----|
|  | <p>#30 ホスファチジルグリセロール誘導体 有利には、カップリングは末端グリセロールを酸化してアルデヒドを形成した後に行われ、続いて両性物質の還元的カップリングが行われる。例はヒスタミンを示している。R残基はアルキル基又はアルケニル基である。</p> | 10 |
|  | <p>例えば、ヒスタミンのグリセルアルデヒドの結合、続いてアシル化。R残基はアルキル基又はアルケニル基である。</p> | 20 |
|  | <p>N-(アスパルチルジヒドロキシアシル)-N'-ヒスタミルウレア。 R残基はアルキル基又はアルケニル基である。</p> | 30 |
|  | <p>2,3-ジアミノプロピオン酸、β-アラニン及びヒスタミンのジアシル化ジペプチド R残基はアルキル基又はアルケニル基である。</p> | 40 |
|  | <p>イミダゾール酢酸誘導体。 好適方法においては3-アミノ-1,2-プロパンジオールを用いてアミドを形成することができる。</p> | 40 |

【表 1 - 3】

| | |
|---|---|
|  | <p>ヒスチジン誘導体</p> <p>左に示される好ましい化合物はホスファチジルエタノールアミンとのアミド形成によって形成される。</p> |
|  | <p>モルホリン誘導体</p> <p>左に示される好ましい化合物はホスファチジルセリンのカルボキシルとアミド結合により形成される。他の好ましい誘導体は、例えば、ジアシルグリセロール半コハク酸塩のカルボキシルと形成することができる。</p> |
|  | <p>アシル化グリセルアルデヒドと2-ヒドロキシモルホリンのヘミアセタール。R残基はアルキル基又はアルケニル基である。</p> |
|  | <p>モルホリニルホスファチジルエタノールアミン</p> <p>例えば、3-モルホリノ-1,2-プロパンジオールの酸化と続いてのホスファチジルエタノールアミンとの還元的アミノ化により得られる。R残基はアルキル基又はアルケニル基である。</p> |

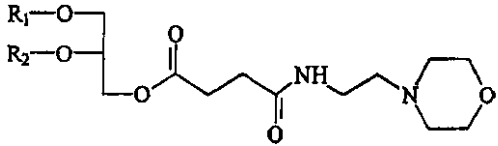
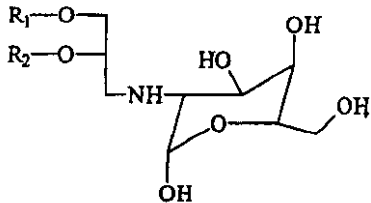
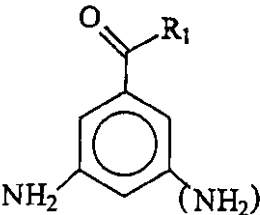
10

20

30

40

【表 1 - 4】

| | |
|--|--|
|  | #60 4-(2-アミノエチル)モルホリンのジパルミトイルグリセロールコハク酸塩への結合。R ₁ 、R ₂ の残基はアシル基、アルキル基又はアルケニル基である。 |
|  | アミノ糖誘導体 例えば、グルコサミンのグリセルアルデヒドへの結合と続いてのアシル化。R残基はアシル基、アルキル基又はアルケニル基である。 |
|  | アミノ安息香酸又はジアミノ安息香酸誘導体 好ましくは、両親媒性物質のカップリングは安息香酸のエステル又はアミドとしてである。脂質は、例えば、3-アミノ-1,2-プロパンジオール誘導体であり得る。 |

10

20

【0021】

本発明の脂質の開示は、当業者が通常の試験によって化合物が等価であることを可能にし、それらの化合物は本発明の教示の範囲内に包含される。当業者は、また、本発明の脂質を具体的な適用に適応させるために付加、重複、置換、欠失、転化又は他の手順によって修飾され得ることを認識するであろう。

30

例えば、付加は、脂質に他のカチオン、他のスペーサー、他のX、他のY及び/又は他の両親媒性物質を付加する方法を含むことができる。数種の他のカチオン、スペーサー、X、Y及び/又は両親媒性物質が本発明の脂質へ付加されることも認識することができる。更に、脂質の具体的な領域又は脂質全体の少なくとも1つの重複も可能である。同様に、当業者は、本発明の脂質の具体的な成分を同様の作用をもつ成分で置き換える選択をよく知っている。

更に、本発明の脂質の構造は、脂質内の具体的な配列又は脂質内の一部の具体的な配列が修飾されるように修飾され得るので、例えば、カチオンは両親媒性物質に直接結合され、スペーサーはX又はYによって両親媒性物質に結合され、本発明の意味においては、そのような化合物は本発明の脂質とほとんど同様の機能を含んでいる。更に、脂質からすべての領域を除去するとともに逆に再び取り込むことが可能である。化学の当業者は、例えば、ペプチド核酸化学の分野に存在する修飾や変異のあらゆる選択が実際に同様の方法で脂質化学の分野にも適用し得るという事実をよく知っている。

40

本発明は、また、本発明の物質を含むリポソームに関する。有利には、本発明の物質又は化合物のすべてを多量にリポソーム膜内に取り込むことができ、媒体のpH値が本発明の化合物の ($pK_a + 1$) より低い場合にのみ粒子全体が正電荷になる。

本発明の具体的な一実施態様においては、pH感受性カチオン脂質の量は最高で50モル%、特に40モル%、好ましくは30モル%である。少なくとも5モル%の化合物、好ましくは7モル%、更に好ましくは10モル%、特に好ましくは15モル%で最高で40モル%を含む組成物が特に好ましい。少なくとも10モル%で最高で30モル%のpH感受性カチオン脂質が最も好ましい

50

。

【0022】

リポソームが特に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及び/又はジアシルグリセロールを含む他の実施態様も便利である。コレステロール自体はリポソームを形成することができない。それ故、脂質の添加が更に必要である。特に、この脂質はリン脂質であり得る。リポソームの修飾が更に可能であることは明らかである。従って、ポリエチレングリコール修飾リン脂質又は類似生成物の使用が特に有利である。

両性リポソームを製造するために、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、又はCHEMSのようなアニオン脂質を添加することができ、アニオン脂質の量はpH感受性カチオン脂質の量を超えてはならない。その代わりにより少なくなければならない。血清成分と凝集体を形成しないので、そのような両性リポソームは生体内適用において適合性が改善された。

10

【0023】

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、特に50~300 nm、更に好ましくは60~130 nmである。

他の好適実施態様においては、リポソームは水溶性の活性物質を含んでいる。特に、本発明のリポソームは非経口適用に適している。例えば、がんの治療や重篤な感染症の治療に使用し得る。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。

20

有利には、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して非特異結合が低い。特に、これは製造においてアニオン脂質を追加した場合である。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。

30

【0024】

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。

本発明の好適実施態様においては、リポソームは活性物質としてタンパク質、ペプチド、炭水化物構造、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を含んでいる。

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 µg、好ましくは80 µgを超える、更に好ましくは100 µgを超える、特に好ましくは140 µgを超える活性物質がリポソーム内部に存在する。

40

本発明は、また、本発明の脂質及び/又はリポソームを含むナノカプセルに関する。リポソームナノカプセルを得る様々な方法が当業者に既知である。例えば、国際出願第00/28972号及び/又は同第01/64330号には、ナノカプセルを生成する様々な方法が開示され、それらの明細書の記載は本発明の開示に含まれるものとする。

【0025】

本発明は、また、薬剤活性物質として用いられる本発明の脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルに関する。好ましい方法においては、治療的に有効な化合物は、特定の症状に制限されない。本発明の教示の開示によって、本発明の構造は治療に用いられるものである。即ち、有利にはあらゆる特定の症状を包含している。

50

本発明の好適実施態様においては、活性物質は疾患の特に予防、治療、経過モニタリング及び/又はアフタケアに用いられる活性物質である。活性物質として用いられる脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルの第二活性物質による充填を考えることができることは当然のことである(以後同意語として用いられる)。活性物質が予防に用いられる活性物質である場合には、例えば、予防接種に適した物質であり得る。診断においては、脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルは生物体内又は組織培養内又は体内の他の分離した成分において病原性修飾を検出するために生体内、試験管内又は生体外で用いられる。治療においては脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルに用いた場合、疾患の治療又は健康な初期症状の回復又は非病原性初期症状の達成が試みられ、この場合、特定の疾患が存在しないことは生物体が他の病原性変化を示すことができないことを意味しない。即ち、ウイルス性疾患の治療や治療に本発明の構造を用いた場合、生物体は最初に同時治療されない腫瘍疾患をなお含むことができる。一つを超える疾患の同時又は時間をずらした治療も考えることができることは明らかである。例えば、経過モニタリングは、治療と平行して時間間隔で行われる診断であり得る。この場合、代謝疾患、がん疾患、免疫疾患又は遺伝病の治療が関与し得る。そのとき、治療の成功がモニタされ、経過モニタリングに用いられる脂質、リポソーム又はナノカプセルによって管理される。アフタケアには、部分的又はほぼ治療した成功後の特別の診断操作や治療操作が含まれる。

10

【0026】

本発明は、また、少なくとも1種の本発明の脂質、少なくとも1種の本発明のリポソーム及び/又は少なくとも1種のナノカプセルを任意により薬学的に許容しうる担体と供に含む医薬組成物に関する。特に、医薬組成物として活性物質を含む又は含まない本発明の構造の使用が考えられ得る。

20

特に、医薬組成物は薬剤として使用し得る。このために、脂質及び/又はリポソーム及び/又はナノカプセルは、当業者に周知の方法に従って修飾し得る。有利には、本発明のリポソームは補体成分又はパーフォリンで攻撃されないもので、活性物質を輸送するために使用し得る。

【0027】

本発明によれば、薬剤又は本明細書では同意語として用いられる医薬組成物は、ヒト体の上又は中に適用することにより疾患、病気、物理的欠損又は病理学的罹患を治療、改善又は回避するものである物質や物質の製剤、特に脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルである。本発明によれば、医薬用補助剤又は担体は薬剤の製造において有効成分として用いられる物質である。製造-技術的補助剤は、薬剤又は医薬組成物を適切に配合する働きをし、製造工程でのみ必要とされる場合には、その後除去することさえもでき、薬学的に許容しうる担体として医薬組成物の一部でもあり得る。任意により、薬剤製剤又は医薬組成物の製剤は薬学的に許容しうる担体及び/又は希釈剤と組合わせて行われる。適切な薬学的に許容しうる担体の例としては、リン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン、ゲル、滅菌溶液等が挙げられる。そのような担体を含む薬剤又は医薬組成物は、周知の通常の方法によって配合され得る。これらの薬剤又は医薬組成物は、個体に適切な用量で、例えば、1日患者1人当たり1 μ g~10 gの脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルの範囲で活性物質を封入して及び/又は封入せずに投与し得る。1 mg~1 gの用量が好ましく、このことは脂質、リポソーム、ナノカプセル及び/又はそれによって輸送される活性物質にあてはまる。できるだけわずかで少量の用量の投与が好ましく、1回又は多回の投与が好ましい。投与は、様々な経路、例えば、静脈内、腹腔内、直腸内、胃腸内、結節内、筋肉内、局所、例えば、腫瘍内、皮下、皮内で又は皮膚上又は粘膜を介した投与として行われ得る。

30

40

【0028】

投与は遺伝子治療の形で行うこともでき、脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルは核酸を輸送するために用いられる。

更に詳しくは、医薬組成物又は薬剤は脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルにより入り込んでいる又は結合している薬理学的物質を含んでいる。その投与は、単独で又は薬

50

剤又は医薬組成物とともに、又は1種以上の補助剤、例えば、QS-21、GPI-0100又はモンタニド(Montanide)のようなエマルジョンの補助剤、CpGのようなDNA化合物、デトックス(Detox)、細菌ワクチン、リン酸カルシウムのような塩及び/又は薬剤効果を高める他の適切な物質、好ましくは、インターロイキン、例えば、IL-2、IL-12、IL-4のような免疫刺激分子及び/又はGM-CSFのような増殖因子と組合わせて記載された適切な補助剤と供に行われ得る。これらは本発明の脂質、リポソーム及び/又はナノカプセルと周知の方法により混合され、適切な製剤と用量で投与される。処方、用量、適切な成分は当業者に周知である。

【0029】

医薬組成物又は薬剤は、また、同じ時間に又は別の時間に適切な方法で投与又は適用される本発明の医薬組成物又は薬剤の2種以上の組合わせ、抗体療法、化学療法又は放射線療法のような他の薬剤と組合わせてもよいことは明らかである。薬剤又は医薬組成物の製造は周知の方法に従って進行する。

本発明は、また、少なくとも1種の本発明の脂質、少なくとも1種の本発明のリポソーム、少なくとも1種の本発明のナノカプセル及び/又は本発明の医薬組成物を、任意によりキットの内容物をどのように混合するかの情報及び/又は配合剤にすることと前記配合剤を投与するアルゴリズム、即ち、特に、用量又は時間間隔でキットの具体的な成分を患者に投与するための情報と共に含むキットに関する。しかしながら、本発明の意味での受容個体は生体内、生体外又は試験管内の細胞又は組織であってもよい。例えば、情報は使用説明書の印刷物又は使用者が電話かインターネットで得ることができる情報であり得る。配合剤を投与するアルゴリズムには、特に患者を治療する診断手順及び/又は治療手順が含まれる。手順は一段階又は多段階手順、また、医師の存在又は不在のときに行われる手順であり得る。即ち、治療法又はそれについての情報はキットの一部であり得る。

【0030】

本発明は、また、本発明の脂質、本発明のリポソーム、本発明のナノカプセル、本発明のキットの使用及び/又は疾患、特に遺伝病、免疫疾患、代謝疾患又は細胞増殖疾患、好ましくは自己免疫疾患、血流疾患、腫瘍疾患、免疫不全疾患、単一臓器又は臓器又は組織の完全領域、又ははじめはウイルス、細菌又は寄生虫に起因する疾患の治療用薬剤を製造するための使用に関する。

本発明は、また、リポソームを活性物質で充填する方法であって、特定のpH値が封入に用いられ、第二pH値が非結合活性物質を除去するために調整されている、前記方法に関する。

本発明は、また、ナノカプセルの製造におけるリポソームの使用に関する。

本発明は、また、診断における放出システムを製造するためのリポソームの使用に関する。

有利には、リポソームは活性物質の輸送及び/又は放出に用いられる。

他の実施態様においては、リポソームはデポ製剤及び/又は循環デポとして用いられる。

特に、リポソームは静脈内又は腹腔内適用において有利に使用し得る。

本発明の他の実施態様においては、リポソームは細胞を生体内、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有利に用いられる。

【0031】

驚くべきことに、平均より多いタンパク質又はDNAの量を本明細書に記載された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、はじめにはリポソーム内のカーゴ分子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pK_a値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任意のカチオン脂質のpK_a値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、脂質層の正味の電荷はすでに正電荷である。

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。

【0032】

本発明の成分を含むリポソームは、当業者に周知の条件下にポリマーで被覆することができ、特に、そのような物質を表面上に1回又は多数回付着させることが可能である。多数回付着においては、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を国際出願第00/28972号又は同第01/64330号に記載されたように形成され、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。

本明細書に記載された物質を用いた場合の有利な一実体は、高分子電解質との静電相互作用を中断し得るということである。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ー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い。このように、脂質のクラスター形成と関連のある膜の透過化は回避することができる。

【0033】

本発明の教示の一態様においては、これらの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用いられる。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。

驚くべきことに、本発明のリポソームは低pH値で他の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はしばしば見出される。

しかしながら、本発明の物質を用いて製造されるリポソームはそのようなヘルパー脂質の存在しないときでさえ有効な融合を受ける。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。

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、このことは化合物がアミノ酸のような生理的成分を含む場合に当てはまる。

【0034】

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血清と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

10

20

30

40

50

凝集体も形成しない。

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り得ることがわかった。そのような条件下でさえ、活性物質の放出は少量である。

10

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。

これらの3種の必須条件はすべて本発明の物質を用いて製造されたりポソームによって満たされる。それ故、本明細書に開示されたりポソームは、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これらの物質の適切なpH値における膜の透過化による十分に特定された放出である。

【実施例】

【0035】

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。

20

実施例 1

#59 (ヒスタミン-ジパルミトイルグリセロールコハク酸塩)の合成

1.7 gのジパルミトイルグリセロールコハク酸塩を20 mlのDMFに室温で溶解する。その溶液に20 mlのDMFに溶解した400 mgのカルボニルジイミダゾールを添加する。その混合液を1時間攪拌し、引き続き300 mgのヒスタミンを添加する。その混合液を一晩攪拌し、減圧下で十分に濃縮する。残留物をクロロホルム/メタノール10:1が溶離液として用いられるシリカゲル60によるカラムクロマトグラフィーを用いて精製する。

【0036】

実施例 2

化合物#60、4-(2-アミノエチル)モルホリン-ジパルミトイルグリセロールコハク酸塩の合成

30

合成手順は実施例 1の通りであるが、ヒスタミンの代わりに350 mgの4-(2-アミノエチル)モルホリンを用いる。

【0037】

実施例 3

pH感受性カチオンリポソームの調製

12 mgのモル比50:15:35のDMPC/#60/Cholの混合物を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。脂質膜を脂質濃度5 mMに4 mlの対応する緩衝液(10 mM Kac、10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.5)で簡単な超音波処理(5分間)を用いて水和する。最後に懸濁液を凍結し、解凍後、多数回押出し(Avestine Liposo-Fast

40

種々のpH値のゼータ電位のプロファイルを下記表に示す。

DMPC/#60/Chol 50:15:35

| pH値 | ゼータ電位 /mV |
|-----|-----------|
| 4 | +54 |
| 5 | +36 |
| 6 | +16 |
| 7.5 | -15 |

【0038】

実施例 4

50

化合物#30 (2-ヒスタミン-(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)エチル)のその場調製

単層リボソーム (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 μ 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。リボソーム懸濁液の溶離液を充填して4 mlにする。

このように酸化したりボソームにヒスタミンを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。過剰量のヒスタミンは、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。

10

【0039】

実施例 5

pK_a 値の定量

15 mgの各々の脂質をクロロホルムに溶解し、脂質膜が形成されるまで回転蒸発器で濃縮乾固する。これを20 mlの0.5% TRITON-X 100水溶液に吸収し、HClを用いてpH 3.0に調整する。その溶液を100 μ lの段階で20 mM NaOHで滴定し、pH値を記録する。

| 化合物 | pKa |
|-----|-----|
| #60 | 7.2 |
| #59 | 5.5 |
| #30 | 6.7 |

20

【0040】

実施例 6

DNAプラスミドで充填したりボソームの調製

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 μ 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。

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。

30

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 μ lのヨウ化プロピジウムと6 μ lのTriton X-100 (10%/水)に試料を充填して300 μ lにし、蛍光プレートリーダーを用いて測定する。

【0041】

実施例 7

リボソームの血清凝集の測定

140 μ lのヒト血清に10 μ lの25 mMリボ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 μ 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 μ 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。

40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/01661

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/127 C07D233/64 C07D295/088 C07D295/13 | | |
|---|---|--|
| 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 C07D A61K | | |
| 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) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 01 26629 A (ALZA CORP) 19 April 2001 (2001-04-19) claims 1,5 figure 1; example V --- | 1-31 |
| X | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 12, 29 October 1999 (1999-10-29) & JP 11 199488 A (SANKYO CO LTD), 27 July 1999 (1999-07-27) abstract --- | 1-31 |
| X | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 13, 30 November 1999 (1999-11-30) & JP 11 217328 A (NISSIN FOOD PROD CO LTD), 10 August 1999 (1999-08-10) abstract --- | 1-31 |
| --- -/- | | |
| <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. *Z* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 20 May 2003 | | Date of mailing of the international search report 28/05/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Kollmannsberger, M |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/01661

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 5 965 434 A (GUREVICH VLADIMIR ET AL) 12 October 1999 (1999-10-12) column 5 -column 8 ----- | 1-31 |
| A | WO 00 30444 A (UNIV VANDERBILT) 2 June 2000 (2000-06-02) claims 1,18 ----- | 1-31 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/01661

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:

Although Claims 28-31 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the stated effects of the compound or composition.

2. ☒ Claims Nos.: 1-31 (in part)
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:

See supplementary sheets PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/01661

CONTINUATION OF BOX 1.2

Claims 1-31 (in part)

The claims are unclear in comparison with the description because many of the definitions in the description are inconsistent with the claims (see page 8, definition of the spacer as a sugar or PEG, definition of the cationic part (pages 8-9) as aniline, isoquinoline etc.). Equally, many of the structures described in Table 1 are not covered by the claims. Furthermore, the description states that various parts of the structures defined in the claims are optional and can be either replaced by other parts, exchanged with each other or omitted altogether (page 9, lines 26-36, and page 17). The scope of the claims is thus so unclear (PCT Article 6) that it is not possible to carry out a meaningful search. Moreover, the search in respect of the compounds defined in the claims initially yielded a very large number of documents detrimental to novelty. This number is so large that it becomes impossible to determine a subject matter in any of the claims for which protection might justifiably be sought (PCT Article 6). For these reasons a meaningful search covering the full scope of the claims appears impossible. The search was therefore confined to compounds according to Claim 1 in which the "cationic" part is derived from histamine, *N*-(2-aminoethyl)morpholine or *N*-(2-hydroxyethyl)morpholine, and to corresponding parts of Claims 10-31 (see Examples 1-7 in the description). For other parts of the claims only a small number of illustrative documents were cited.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/01661

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0126629 | A | 19-04-2001 | AU 7868400 A | 23-04-2001 |
| | | | AU 8006400 A | 23-04-2001 |
| | | | CA 2386164 A1 | 19-04-2001 |
| | | | CN 1378536 T | 06-11-2002 |
| | | | EP 1223916 A2 | 24-07-2002 |
| | | | HU 0203117 A2 | 28-01-2003 |
| | | | JP 2003511405 T | 25-03-2003 |
| | | | NO 20021615 A | 05-04-2002 |
| | | | WO 0126625 A2 | 19-04-2001 |
| | | | WO 0126629 A2 | 19-04-2001 |
| | | | US 2003031704 A1 | 13-02-2003 |
| JP 11199488 | A | 27-07-1999 | NONE | |
| JP 11217328 | A | 10-08-1999 | NONE | |
| US 5965434 | A | 12-10-1999 | NONE | |
| WO 0030444 | A | 02-06-2000 | AU 1830200 A | 13-06-2000 |
| | | | WO 0030444 A1 | 02-06-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/01661

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | US 5 965 434 A (GUREVICH VLADIMIR ET AL) 12. Oktober 1999 (1999-10-12) Spalte 5 -Spalte 8 --- | 1-31 |
| A | WO 00 30444 A (UNIV VANDERBILT) 2. Juni 2000 (2000-06-02) Ansprüche 1,18 ----- | 1-31 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/01661

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 28-31 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-31 (teilweise) weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03 01661

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-31 (teilweise)

Die Ansprüche sind unklar in bezug auf die Beschreibung, da viele Definitionen in der Beschreibung im Widerspruch zu den Ansprüchen stehen (vgl. Seite 8 Definition des Spacers als Zucker/PEG, Definition des kationischen Teils Seite 8/9 als Aniline, Isochinoline etc). Ebenso fallen viele der in der Tabelle 1 beschriebenen Strukturen nicht unter die Ansprüche. Des weiteren wird in der Beschreibung ausgeführt, dass verschiedene Teile der in den Ansprüchen definierten Strukturen optional sind und durch andere ersetzt, untereinander vertauscht oder ganz weggelassen werden können (Seite 9 Zeilen 26-36, Seite 17). Der beanspruchte Bereich ist daher so unklar (Art. 6 PCT), dass eine sinnvolle Recherche unmöglich ist. Überdies ergab die Recherche in bezug auf die in den Ansprüchen definierten Verbindungen in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente. Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrt werden könnte (Art. 6 PCT). Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche unmöglich. Die Recherche wurde daher auf Verbindungen nach Anspruch 1, in denen der "kationische" Teil von Histamin, N-(2-Aminoethyl)morpholin oder N-(2-Hydroxyethyl)morpholin abgeleitet ist, und entsprechende Teile der Ansprüche 10-31 beschränkt (vgl Beispiele 1-7 der Beschreibung). Für andere teile der Ansprüche wurden nur wenige illustrative Dokumente zitiert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/01661

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 0126629 A | 19-04-2001 | AU 7868400 A | 23-04-2001 |
| | | AU 8006400 A | 23-04-2001 |
| | | CA 2386164 A1 | 19-04-2001 |
| | | CN 1378536 T | 06-11-2002 |
| | | EP 1223916 A2 | 24-07-2002 |
| | | HU 0203117 A2 | 28-01-2003 |
| | | JP 2003511405 T | 25-03-2003 |
| | | NO 20021615 A | 05-04-2002 |
| | | WO 0126625 A2 | 19-04-2001 |
| | | WO 0126629 A2 | 19-04-2001 |
| | | US 2003031704 A1 | 13-02-2003 |
| JP 11199488 A | 27-07-1999 | KEINE | |
| JP 11217328 A | 10-08-1999 | KEINE | |
| US 5965434 A | 12-10-1999 | KEINE | |
| WO 0030444 A | 02-06-2000 | AU 1830200 A | 13-06-2000 |
| | | WO 0030444 A1 | 02-06-2000 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 31/711 | A 6 1 K 31/711 | |
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 47/12 | |
| A 6 1 K 47/12 | A 6 1 K 47/16 | |
| A 6 1 K 47/16 | A 6 1 K 47/24 | |
| A 6 1 K 47/24 | A 6 1 K 47/34 | |
| A 6 1 K 47/34 | A 6 1 K 48/00 | |
| A 6 1 K 48/00 | A 6 1 P 3/00 | |
| A 6 1 P 3/00 | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 P 9/00 | A 6 1 P 31/04 | |
| A 6 1 P 31/04 | A 6 1 P 31/10 | |
| A 6 1 P 31/10 | A 6 1 P 31/12 | |
| A 6 1 P 31/12 | A 6 1 P 33/00 | |
| A 6 1 P 33/00 | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 P 37/00 | |
| A 6 1 P 37/00 | A 6 1 P 37/04 | |
| A 6 1 P 37/04 | A 6 1 P 37/06 | |
| A 6 1 P 37/06 | A 6 1 P 43/00 | |
| A 6 1 P 43/00 | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| // A 6 1 J 1/14 | A 6 1 K 37/02 | |
| A 6 1 J 3/00 | A 6 1 J 1/00 | 3 9 0 R |
| | A 6 1 J 3/00 | 3 1 0 K |

(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 0 6 1 0 8 ハレ アウグスト ベーベル シュトラーセ 4 1

(72)発明者 パンツナー シュテッフェン

ドイツ連邦共和国 0 6 1 0 8 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 0 6 1 1 4 ハレ ジーベナー シュトラーセ 2 0

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA65 AA95 BB13 BB21 CC07 CC21 CC27 DD42L DD52L
DD58L DD63L EE23L FF21 FF27 FF31 GG21
4C084 AA01 AA02 AA13 MA24 MA38 MA56 MA66 NA13 NA14 ZA36
ZB07 ZB08 ZB09 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37 ZC02 ZC21
4C086 AA01 BC42 BC43 CB07 DA38 EA17 EA18 MA02 MA05 MA24
MA38 MA56 MA66 NA13 NA14 ZA36 ZB07 ZB08 ZB09 ZB26
ZB33 ZB35 ZB37 ZC02 ZC21