

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成24年12月27日(2012.12.27)

【公表番号】特表2011-520936(P2011-520936A)

【公表日】平成23年7月21日(2011.7.21)

【年通号数】公開・登録公報2011-029

【出願番号】特願2011-509929(P2011-509929)

【国際特許分類】

A 6 1 K 9/107 (2006.01)

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 K 47/06 (2006.01)

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 47/28 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 9/107

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/06

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/28

A 6 1 K 48/00

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月7日(2012.11.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

エンドサイトーシス促進表面を有する安定なペルフルオロカーボンナノエマルションであつて、

(i)少なくとも1つのペルフルオロカーボン化合物を含むペルフルオロカーボン成分；

(ii)乳化成分；及び

(iii)エンドサイトーシスを介したナノエマルションの細胞取り込みを誘導するエンドサイトーシス促進成分としてのトランスフェリン又はそのフラグメント若しくは誘導体

を含有し、且つ

以下の工程：

(a)乳化成分を含む緩衝水溶液を調製すること、

(b)ペルフルオロカーボン成分を添加すること、

(c)その後、工程(b)の反応生成物を混合し、高圧均質化すること、及び

(d)工程(c)の反応生成物にエンドサイトーシス促進成分を添加し、生じた混合物を均質化すること

を含む方法によって得られる、安定なペルフルオロカーボンナノエマルション。

【請求項2】

100nm未満の粒径を有し、好ましくは約50nmの平均粒径を有する粒子からなる

、請求項 1 に記載のナノエマルション。

【請求項 3】

前記緩衝水相がナノエマルションの 25 ~ 60 重量%を占める、請求項 1 又は 2 に記載のナノエマルション。

【請求項 4】

前記エンドサイトーシス促進成分が、トランスフェリンである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のナノエマルション。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つのペルフルオロカーボン化合物が、 $C_m F_{2m+1} X$ 、 $X C_m F_{2m} X$ 、 $X C_n F_{2n} O C_o F_{2o} X$ 、 $N(C_o F_{2o} X)_3$  及び  $N(C_o F_{2o+1} X)_3$  (式中、 $m$  は 3 ~ 10 の整数であり、 $n$  及び  $o$  は 1 ~ 5 の整数であり、 $X$  は、存在する各々の場合に独立して  $C_1$ 、 $B_r$  及び  $I$  から選択される) から選択され、好ましくはペルフルオロカーボンがペルフルオロオクチルプロマイド及びペルフルオロトリブチルアミン及びそれらの混合物から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のナノエマルション。

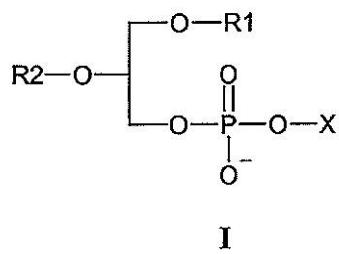
【請求項 6】

前記乳化成分が、必須乳化成分としての少なくとも 1 つのリン脂質及び 1 又はそれ以上のヘルパー脂質を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のナノエマルション。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つのリン脂質が、式 I :

【化 1】



(式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、独立して  $H$  及び  $C_{16} \sim C_{24}$  アシル残基 (前記アシル残基は飽和であってもよく又は不飽和であってもよく、1 ~ 3 個の残基  $R^3$  を担持してもよく、C 原子の 1 又はそれ以上は、O 又は  $N R^4$  によって置換されてもよい) から選択され、 $X$  は、 $H$ 、 $- (C_2H_2)_p - N(R^4)_3^+$ 、 $- (C_2H_2)_p - CH(N(R^4)_3^+) - COO^-$ 、 $- (C_2H_2)_p - CH(OH) - CH_2OH$  及び  $- CH_2(CH_2OH)_p - CH_2OH$  (式中、 $p$  は 1 ~ 5 の整数であり； $R^3$  は、独立して  $H$ 、低級アルキル、 $F$ 、 $C_1$ 、 $CN$  及び  $OH$  から選択され； $R^4$  は、独立して  $H$ 、 $CH_3$  及び  $CH_2CH_3$  から選択される) から選択される)

によって表される化合物又は薬理学的に許容されるその塩から選択され、好ましくは、 $R^1$  及び  $R^2$  が、独立して  $H$  及び 非置換  $C_{16} \sim C_{24}$  アシル残基 (前記アシル残基は飽和であってもよく又は不飽和であってもよい) から選択され、 $X$  が、コリン、セリン、エタノールアミン及びイノシトール残基から選択される、請求項 6 に記載のナノエマルション。

【請求項 8】

前記リン脂質成分が、ホスファチジルコリン、リゾ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それらの混合物から選択される、請求項 7 に記載のナノエマルジョン。

【請求項 9】

前記ヘルパー脂質が、脂肪酸、ステロイド類、ビタミン類及びそれらの混合物から選択される、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載のナノエマルション。

【請求項 10】

ペルフルオロカーボン成分( a )としてペルフルオロオクチルプロマイド、リン脂質としてホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、コレステロール及びリゾホスファチジルコリンを含む乳化成分( b )、並びにエンドサイトーシス促進成分( c )としてトランスフェリンを含有する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のナノエマルション。

【請求項 1 1】

医薬品及び遺伝物質を含む、親水性化合物をインビボ及びインビトロで細胞に導入するに適する、好ましくは RNA 及び DNA 配列並びにそれらの組合せ及び誘導体から選択される遺伝物質の導入に適する、最も好ましくは miRNA 、 siRNA 又は dsRNA の導入に適する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のナノエマルション。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のナノエマルションを含有する遺伝子導入剤又は医薬組成物。

【請求項 1 3】

インビボ及びインビトロで細胞に導入される医薬品及び遺伝物質をさらに含有する、好ましくは RNA 及び DNA 配列並びにそれらの組合せ及び誘導体から選択される遺伝物質を含有する、最も好ましくは miRNA 、 siRNA 又は dsRNA を含有する、請求項 1 2 に記載の遺伝子導入剤又は医薬組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のナノエマルション、及び請求項 1 2 又は 1 3 に記載の遺伝子導入剤又は医薬組成物を調製するための方法であって、以下の工程：

( a ) 乳化成分を含む緩衝水溶液を調製すること、  
( b ) ペルフルオロカーボン成分を添加すること、及び  
( c ) その後、工程( b )の反応生成物を混合し、高圧均質化すること  
を含む方法。

【請求項 1 5】

( d ) 工程( c )の反応生成物にエンドサイトーシス促進成分及び / 又は導入のための親水性化合物を添加し、生じた混合物を均質化すること  
をさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

親水性化合物をインビトロで細胞に導入するための方法であって、細胞を請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のナノエマルション又は請求項 1 2 若しくは 1 3 に記載の遺伝子導入剤と接触させることを含む方法。

【請求項 1 7】

医薬品及び遺伝物質を患者に導入するための薬剤を調製するための、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のナノエマルションの使用。

【請求項 1 8】

医薬品及び遺伝物質を患者に導入するための方法であって、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のナノエマルション又は請求項 1 2 若しくは 1 3 に記載の遺伝子導入剤若しくは医薬組成物を患者に投与することを含む方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

エンドサイトーシス促進表面を提供する分子をナノエマルションに添加することは、細胞内へのペルフルオロカーボンナノエマルションの取り込みを有意に上昇させる。本発明は、従って、

( 1 ) エンドサイトーシス促進表面を有する安定なペルフルオロカーボンナノエマルション；

(2) 前記ナノエマルションが、連続ペルフルオロカーボン相と緩衝不連続水相を有し、且つ

(a) 少なくとも1つのペルフルオロカーボン化合物を含むペルフルオロカーボン成分；

(b) 乳化成分；及び

(c) エンドサイトーシスを介したナノエマルションの細胞取り込みを誘導する少なくとも1つの化合物を含むエンドサイトーシス促進成分を含有する、上記(1)の好ましい実施形態；

(3) 上記(1)又は(2)で定義されたナノエマルションを含有する遺伝子導入剤又は医薬組成物；

(4) 以下の工程：

(a) 乳化成分を含む緩衝水溶液を調製すること、

(b) ペルフルオロカーボン成分を添加すること、及び

(c) 工程(b)の反応生成物を混合し、高圧ホモジナイザーによって均質化すること

を含む、上記(1)若しくは(2)のナノエマルション又は上記(3)の遺伝子導入剤若しくは医薬組成物を調製するための方法；

(5) 遺伝物質を患者に導入するための薬剤を調製するための、上記(1)又は(2)で定義されたナノエマルションの使用；

(6) 上記(1)若しくは(2)で定義されたナノエマルション又は上記(3)で定義された遺伝子導入剤若しくは医薬組成物を患者に投与することを含む、遺伝物質を患者に導入するための方法；並びに

(7) 細胞を上記(1)若しくは(2)で定義されたナノエマルション又は上記(3)で定義された遺伝子導入剤と接触させることを含む、親水性化合物をインピトロで細胞に導入するための方法  
を提供する。

また、本発明によって、以下が提供される。

[1]

エンドサイトーシス促進表面を有する安定なペルフルオロカーボンナノエマルションであって、連続ペルフルオロカーボン相と緩衝不連続水相を有し、且つ

(a) 少なくとも1つのペルフルオロカーボン化合物を含むペルフルオロカーボン成分；

(b) 乳化成分；及び

(c) エンドサイトーシスを介したナノエマルションの細胞取り込みを誘導する少なくとも1つの化合物を含むエンドサイトーシス促進成分を含有するナノエマルション。

[2]

100nm未満の粒径を有し、好ましくは約50nmの平均粒径を有する粒子からなる、[1]に記載のナノエマルション。

[3]

前記緩衝水相がナノエマルションの25～60重量%を占める、[1]又は[2]に記載のナノエマルション。

[4]

エンドサイトーシスを介した細胞取り込みを誘導する前記少なくとも1つの化合物が、トランスフェリン、アポリボタンパク質A1、グリコシルホスファチジルイノシトール(GIP)アンカー型タンパク質、メガリン結合タンパク質、アンテナペディアタンパク質、前記化合物のフラグメント及び誘導体並びに類似作用を有する化合物から選択され、最も好ましくは前記化合物がトランスフェリン又はそのフラグメント若しくは誘導体である、[1]から[3]のいずれか一項に記載のナノエマルション。

[5]

前記少なくとも1つのペルフルオロカーボン化合物が、 $C_m F_{2m+1} X$ 、 $X C_m F_{2m} X$ 、 $X C_n F_{2n} O C_o F_{2o} X$ 、 $N(C_o F_{2o} X)_3$ 及び $N(C_o F_{2o+1} X)_3$ （式中、 $m$ は3～10の整数であり、 $n$ 及び $o$ は1～5の整数であり、 $X$ は、存在する各々の場合に独立して $C_1$ 、 $B_r$ 及び $I$ から選択される）から選択され、好ましくはペルフルオロカーボンがペルフルオロオクチルプロマイド及びペルフルオロトリプチルアミン及びそれらの混合物から選択される、[1]から[4]のいずれか一項に記載のナノエマルション。

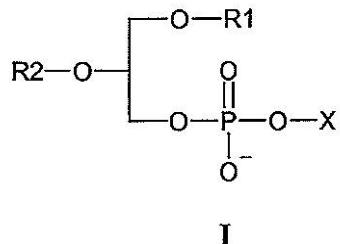
[6]

前記乳化成分が、必須乳化成分としての少なくとも1つのリン脂質及び1又はそれ以上のヘルパー脂質を含む、[1]から[5]のいずれか一項に記載のナノエマルション。

[7]

前記少なくとも1つのリン脂質が、式I：

【化0】



（式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、独立してH及び $C_{16-24}$ アシル残基（前記アシル残基は飽和であってもよく又は不飽和であってもよく、1～3個の残基 $R^3$ を担持してもよく、C原子の1又はそれ以上は、O又はNR<sup>4</sup>によって置換されてもよい）から選択され、Xは、H、- $(CH_2)_p-N(R^4)_3^+$ 、- $(CH_2)_p-CH(N(R^4)_3^+)-COO^-$ 、- $(CH_2)_p-CH(OH)-CH_2OH$ 及び- $CH_2(CH_2OH)_p-CH_2OH$ （式中、 $p$ は1～5の整数であり； $R^3$ は、独立してH、低級アルキル、F、C<sub>1</sub>、CN及びOHから選択され； $R^4$ は、独立してH、CH<sub>3</sub>及びCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>から選択される）から選択される）

によって表される化合物又は薬理学的に許容されるその塩から選択され、好ましくは、 $R^1$ 及び $R^2$ が、独立してH及び非置換 $C_{16-24}$ アシル残基（前記アシル残基は飽和であってもよく又は不飽和であってもよい）から選択され、Xが、コリン、セリン、エタノールアミン及びイノシトール残基から選択され、最も好ましくは、リン脂質成分が、ホスファチジルコリン、リゾ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それらの混合物から選択される、[6]に記載のナノエマルション。

[8]

前記ヘルパー脂質が、脂肪酸、ステロイド類、ビタミン類及びそれらの混合物から選択される、[6]又は[7]に記載のナノエマルション。

[9]

ペルフルオロカーボン成分（a）としてペルフルオロオクチルプロマイド、リン脂質としてホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、コレステロール及びリゾホスファチジルコリンを含む乳化成分（b）、並びにエンドサイトーシス促進成分（c）としてトランスフェリンを含有する、[1]から[8]のいずれか一項に記載のナノエマルション。

[10]

医薬品及び遺伝物質を含む、親水性化合物をインビボ及びインビトロで細胞に導入するのに適する、好ましくはRNA及びDNA配列並びにそれらの組合せ及び誘導体から選択される遺伝物質の導入に適する、最も好ましくはm<sub>i</sub>RNA、s<sub>i</sub>RNA又はd<sub>s</sub>RNAの導入に適する、[1]から[9]のいずれか一項に記載のナノエマルション。

[11]

[ 1 ] から [ 10 ] のいずれか一項に記載のナノエマルションを含有する遺伝子導入剤又は医薬組成物。

[ 12 ]

インビボ及びインビトロで細胞に導入される医薬品及び遺伝物質をさらに含有する、好ましくはRNA及びDNA配列並びにそれらの組合せ及び誘導体から選択される遺伝物質を含有する、最も好ましくはm<sub>i</sub>RNA、s<sub>i</sub>RNA又はdsRNAを含有する、[ 11 ]に記載の遺伝子導入剤又は医薬組成物。

[ 13 ]

[ 1 ] から [ 10 ] に記載のナノエマルション、及び [ 11 ] 又は [ 12 ] に記載の遺伝子導入剤又は医薬組成物を調製するための方法であって、以下の工程：

( a ) 乳化成分を含む緩衝水溶液を調製すること、  
( b ) ペルフルオロカーボン成分を添加すること、及び  
( c ) その後、工程 ( b ) の反応生成物を混合し、高圧均質化することを含む方法。

[ 14 ]

( d ) 工程 ( c ) の反応生成物にエンドサイトシス促進成分及び / 又は導入のための親水性化合物を添加し、生じた混合物を均質化することをさらに含む、[ 13 ] に記載の方法。

[ 15 ]

親水性化合物をインビトロで細胞に導入するための方法であって、細胞を [ 1 ] から [ 10 ] に記載のナノエマルション又は [ 11 ] 若しくは [ 12 ] に記載の遺伝子導入剤と接触させることを含む方法。

[ 16 ]

医薬品及び遺伝物質を患者に導入するための薬剤を調製するための、[ 1 ] から [ 10 ] のいずれか一項に記載のナノエマルションの使用。

[ 17 ]

医薬品及び遺伝物質を患者に導入するための方法であって、[ 1 ] から [ 10 ] のいずれか一項に記載のナノエマルション又は [ 11 ] 若しくは [ 12 ] に記載の遺伝子導入剤若しくは医薬組成物を患者に投与することを含む方法。