(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-529882
(P2023-529882A)
(43)公表日　令和5年7月12日(2023.7.12)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）	
C07D 319/06	*(2006.01)*	C07D	319/06	CSP	4C063
C07D 405/14	*(2006.01)*	C07D	405/14		4C076
A61K 9/16	*(2006.01)*	A61K	9/16		4C084
A61K 47/22	*(2006.01)*	A61K	47/22		4C086
A61K 47/28	*(2006.01)*	A61K	47/28		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全36頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-575723(P2022-575723)
(86)(22)出願日　令和3年6月10日(2021.6.10)
(85)翻訳文提出日　令和5年1月31日(2023.1.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/036819
(87)国際公開番号　WO2021/252769
(87)国際公開日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(31)優先権主張番号　63/038,451
(32)優先日　令和2年6月12日(2020.6.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

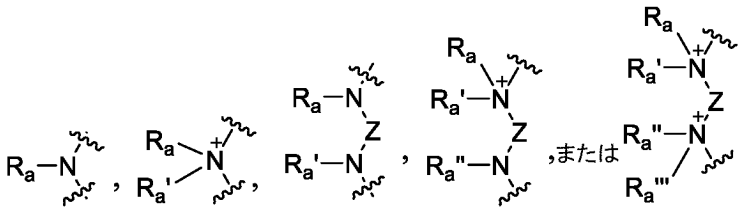
(71)出願人　319009901
トラスティーズ オブ タフツ カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02155 メドフォード バルー ホール
(74)代理人　100139723
弁理士　樋口 洋
(72)発明者　シュィ，チアオビン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02421 レキシントン バトル グリーン ロード 27
(72)発明者　リー，ヤーミン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02143 サマーヴィル ウィロビー ストリート 21

Fターム（参考）　4C063　AA03 BB07 CC82 DD03
最終頁に続く

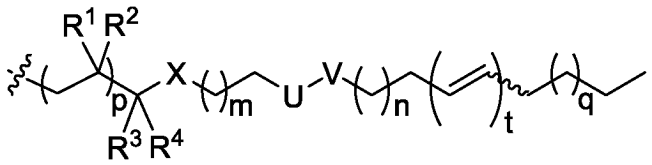
(54)【発明の名称】　細胞内ｍＲＮＡ送達のためのｐＨ応答性リピドイドナノ粒子

(57)【要約】
リピドイド化合物ならびにそのような化合物を含むリピドイドナノ粒子が開示される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式Ｉの化合物およびその薬学的に許容される塩：
$R^{頭部}$－リンカー－$R^{脂質}$　（Ｉ）
［式中、
$R^{頭部}$は、
【化１】

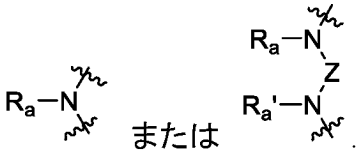


であり；
R_a、R_a'、R_a''、およびR_a'''は、独立して、$R^{脂質}$、Ｈ、C_1～C_{20}アルキル、C_2～C_{20}アルケニル、C_2～C_{20}アルキニル、C_3～C_{20}シクロアルキル、C_1～C_{20}ヘテロアルキル、C_1～C_{20}ヘテロシクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、ここで、R_aとR_a'、R_a''とR_a'''は、両方が$R^{脂質}$であることはなく；
Ｚは、C_1～C_{20}二価脂肪族ラジカル、C_1～C_{20}二価ヘテロ脂肪族ラジカル、二価アリールラジカル、または二価ヘテロアリールラジカルであり；
リンカーは、水性酸性条件下で切断可能な酸不安定部分であり；
$R^{脂質}$の各例は独立して、C_1～C_{20}アルキル、C_2～C_{20}アルケニル、C_2～C_{20}アルキニル、または
【化２】



であり；
R^1およびR^2は独立して、Ｈ、ＯＨ、NHR^{30}、またはＳＨであり；
R^3およびR^4は共にＨであり；または、R^3およびR^4は一緒になってオキソ（＝Ｏ）基を形成し；
Ｘは、CH_2、Ｏ、NR^{30}、またはＳであり；
R^{30}は、Ｈ、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルケニル、またはC_{1-6}アルキニルであり；
ＵおよびＶは独立して、Ｓ、Ｓｅ、Ｏ、またはCH_2であり；
ｍは１～３から選択される整数であり；
ｎは１～１４から選択される整数であり；
ｐは０または１であり；
ｑは１～１０から選択される整数であり；
ｔは、０、１、または２である］。
【請求項２】
$R^{頭部}$は、

【化３】



である、請求項１に記載の化合物。

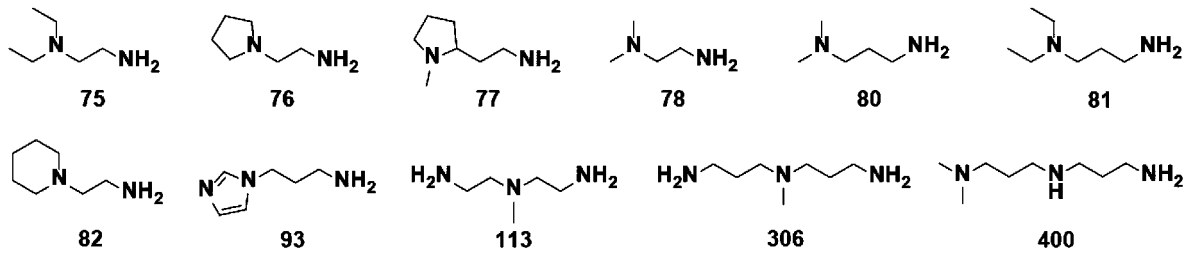
【請求項３】

R_aおよびR_a'は独立して、$R^{脂質}$、Ｈ、またはC_1～C_{20}アルキルである、請求項２に記載の化合物。

【請求項４】

$R^{頭部}$は、

【化４】

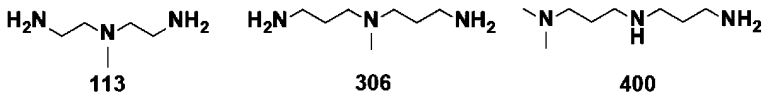


からなる群より選択される化合物に由来する、請求項１に記載の化合物。

【請求項５】

$R^{頭部}$は、

【化５】



からなる群より選択される化合物に由来する、請求項４に記載の化合物。

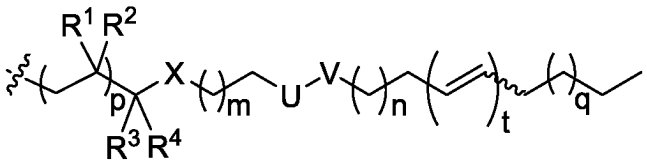
【請求項６】

$R^{脂質}$の各例は独立して、C_1～C_{20}アルキル、C_2～C_{20}アルケニル、またはC_2～C_{20}アルキニルである、請求項１～５のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項７】

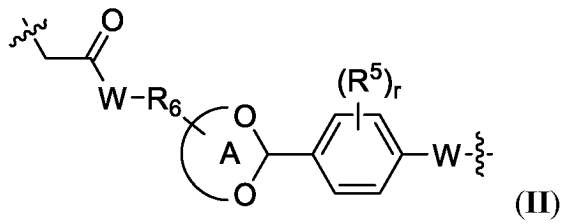
$R^{脂質}$の各例は独立して、

【化６】



である、請求項１～５のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項８】
R^1およびR^2はＨである、請求項７に記載の化合物。
【請求項９】
R^1はＨであり、R^2はＯＨである、請求項７に記載の化合物。
【請求項１０】
R^3およびR^4はＨである、請求項７～９のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１１】
R^3およびR^4は一緒になってオキソ（＝Ｏ）基を形成する、請求項７～９のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１２】
Ｚは、CH_2、Ｏ、またはNR^{30}である、請求項７～１１のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１３】
ＺはCH_2である、請求項７～１１のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１４】
ＺはＯである、請求項７～１１のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１５】
ＺはNR^{30}である、請求項７～１１のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１６】
ＵおよびＶは独立して－CH_2－または－Ｏ－である、請求項７～１５のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１７】
ＵおよびＶは独立して－CH_2－または－Ｏ－であり、ＵとＶは同じではない、請求項７～１５のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１８】
ＵおよびＶは独立して－CH_2－または－Ｓ－である、請求項７～１５のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１９】
ＵおよびＶは両方とも－CH_2－である、請求項７～１５のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２０】
ＵおよびＶは両方とも－Ｓ－である、請求項７～１５のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２１】
ｍは１または２である、請求項７～２０のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２２】
ｎは４～１２から選択される整数である、請求項７～２１のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２３】
ｎは６～１０から選択される整数である、請求項７～２１のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２４】
ｐは０である、請求項７～２３のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２５】
ｐは１である、請求項７～２３のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２６】
ｑは２～８から選択される整数である、請求項７～２５のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２７】
ｑは４～８から選択される整数である、請求項７～２５のいずれか一項に記載の化合物

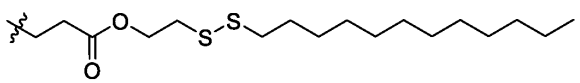
。
【請求項２８】
ｔは０である、請求項７～２７のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２９】
ｔは１である、請求項７～２７のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項３０】
前記リンカーは式ＩＩによって表される、請求項１～２９のいずれか一項に記載の化合物：
【化７】

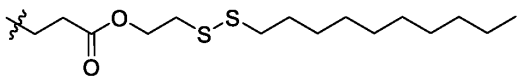


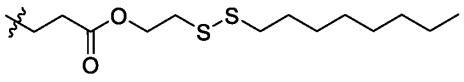
(II)

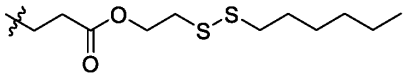
［式中、
Ｗは、ＯまたはＮＨであり；
Ｒ^{5}の各々は独立して、水素、ハロゲン、ニトロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキル、ヘテロアラルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、またはヘテロアリールであり；
ｒは０～４から選択される整数であり；
Ａは５～８員複素環であり；
Ｒ^{6}は存在しないか、またはＲ^{6}はアルキレンもしくはアルケニレンである］。
【請求項３１】
ＷはＯである、請求項３０に記載の化合物。
【請求項３２】
ＷはＮＨである、請求項３０に記載の化合物。
【請求項３３】
Ｒ^{5}はアルコキシ（例えばメトキシ）である、請求項３０～３２のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項３４】
ｒは２である、請求項３３に記載の化合物。
【請求項３５】
Ｒ^{6}は存在しない、請求項３０～３４のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項３６】
Ｒ^{6}はメチレンである、請求項３０～３４のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項３７】
Ａは６員複素環である、請求項３０～３６のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項３８】
Ａは非置換である、請求項３０～３７のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項３９】
Ａは、ハロゲン、ニトロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキル、ヘテロアラルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、またはヘテロアリールで置換されている、請求項３０～３７のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項４０】
Ｒ^{脂質}の各例は独立して、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル，ｎ－オクチル

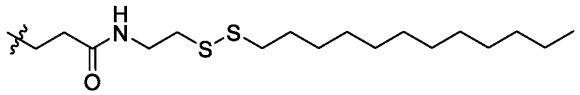
【化８－１】

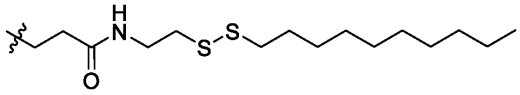

,

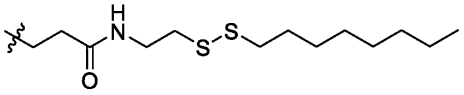

,

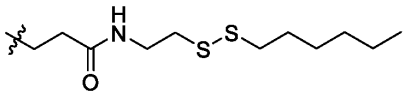

,

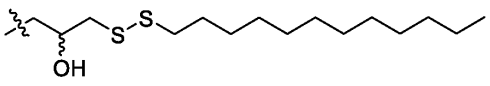

,

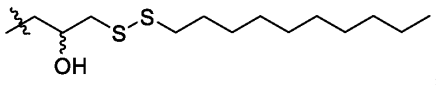

,

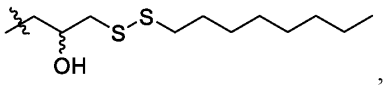

,

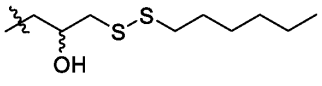

,


,

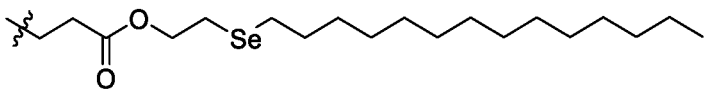

,

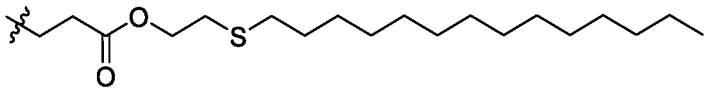

,

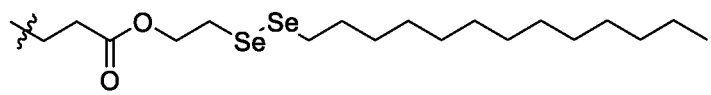

,

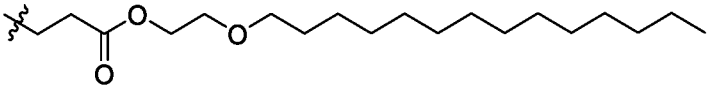

,

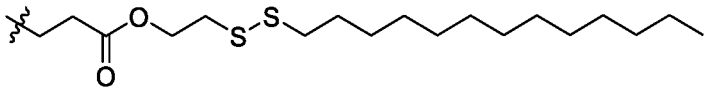
【化８－２】

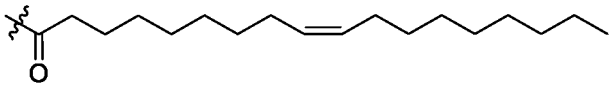

,

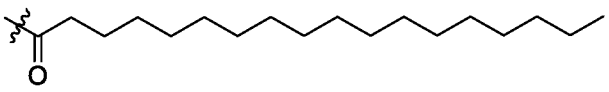

,

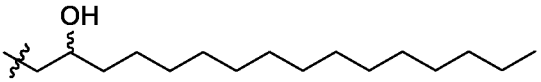

,


,


,


,


, および

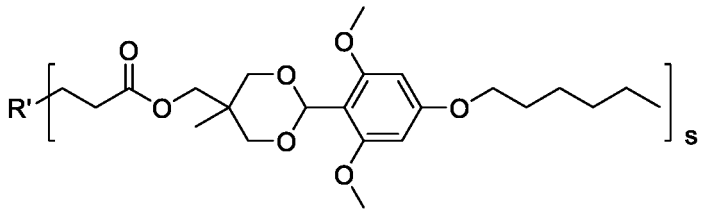


からなる群より選択される、請求項１に記載の化合物。

【請求項４１】

式ＩＩＩの化合物である、請求項１に記載の化合物：

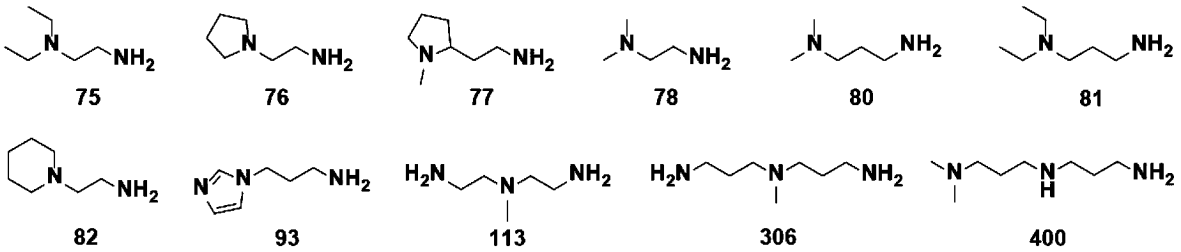
【化９】


(III),

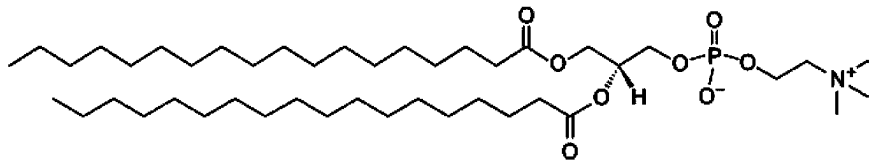
［式中、

Ｒ’は、

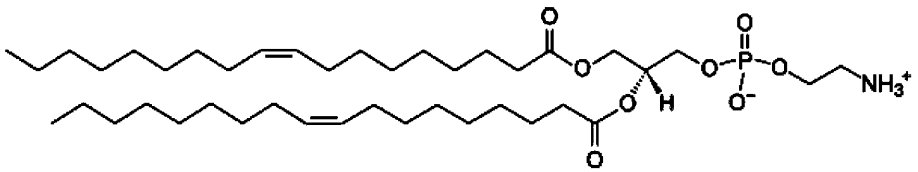
【化１０】



からなる群より選択される化合物に由来し；
　ｓは、原子価が許す限り、１～４から選択される整数である］。
【請求項４２】
　請求項１～４１のいずれか一項に記載の化合物を含む、リピドイドナノ粒子。
【請求項４３】
　コレステロールをさらに含む、請求項４２に記載のリピドイドナノ粒子。
【請求項４４】
　化合物とコレステロールの重量比が約２：１～約８：１である、請求項４３に記載のリピドイドナノ粒子。
【請求項４５】
　化合物とコレステロールの重量比が約４：１である、請求項４３に記載のリピドイドナノ粒子。
【請求項４６】
　ＤＯＰＥ、ＤＳＰＣ、ＤＯＰＣ、またはＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋをさらに含み、
　ＤＳＰＣは、以下の構造：
【化１１】

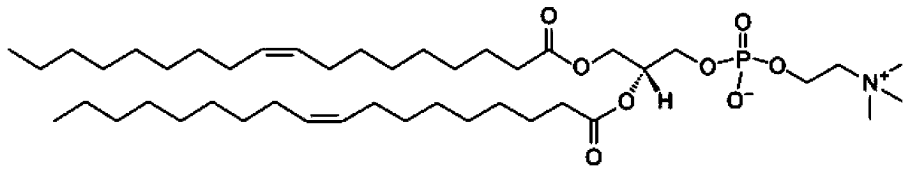


を有し、
　ＤＯＰＥは、以下の構造：
【化１２】



を有し、
　ＤＯＰＣは、以下の構造：

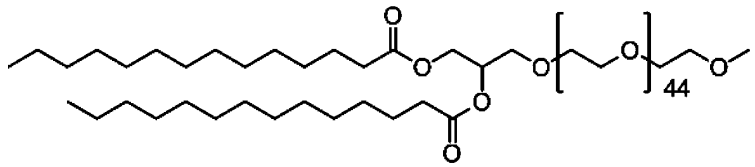
【化１３】



を有し、

ＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋは、以下の構造：

【化１４】



を有する、請求項４２～４５のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項４７】

ＤＯＰＥをさらに含む、請求項４２～４５のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項４８】

化合物とＤＯＰＥの重量比が、約４：１～約１：１である、請求項４７に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項４９】

化合物とＤＯＰＥの重量比が、約４：１または約１：１である、請求項４７に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５０】

ｍＲＮＡをさらに含む、請求項４０～４９のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５１】

前記ｍＲＮＡが緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）ｍＲＮＡである、請求項５０に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５２】

小分子をさらに含む、請求項４０～５１のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５３】

前記小分子が抗真菌剤または化学療法剤である、請求項５２に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５４】

前記小分子が、ボルテゾミブ、イマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、ダコミチニブ、ダウノルビシン塩酸塩、シタラビン、フルオロウラシル、塩酸イリノテカン、ビンクリスチン硫酸塩、メトトレキサート、パクリタキセル、ビンクリスチン硫酸塩、エピルビシン、ドセタキセル、シクロホスファミド、カルボプラチン、レナリドミド、イブルチニブ、アビラテロン酢酸エステル、エンザルタミド、ペメトレキセド、パルボシクリブ、ニロチニブ、エベロリムス、ルキソリチニブ、エピルビシン、ピリルビシン、イダルビシン、バルルビシン、アムルビシン、ブレオマイシン、フレオマイシン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、ストレプトゾテシン、ペントスタチン、ミトサン類（mitosanes）マイトマイシンＣ、エンジイン類（enediynes）カリケア

マイシン、グリコシド類　レベッカマイシン、マクロライドラクトン類　エポチフィロン、イクサベピロン、ペントスタチン、サリノスポラミドＡ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、エトポシド、テニポシド、ビノレルビン、ドセタキセル、カンプトテシン、ハイカムチン、ペデリン、テオペデリン、アンナミド（annamide）、トラベクテジン、アプリジン、およびエクテイナシジン７４３（ＥＴ７４３）からなる群より選択される、請求項５３に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５５】

前記小分子が、アムホテリシンＢまたはドキソルビシンである、請求項５４に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５６】

約２５ｎｍ～約１０００ｎｍの粒径を有する、請求項４２～５５のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５７】

約５０ｎｍ～約７５０ｎｍの粒径を有する、請求項４２～５５のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５８】

約２００ｎｍ～約５００ｎｍの粒径を有する、請求項４２～５５のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子。

【請求項５９】

請求項４２～５８のいずれか一項に記載のリピドイドナノ粒子、および１つまたは複数の薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【０００１】

本出願は、２０２０年６月１２日に出願された米国仮特許出願第６３／０３８，４５１号に対する優先権の利益を主張する；その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【０００２】

本発明は、アメリカ国立科学財団（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）によって与えられたＤＭＲ１４５２１２２；アメリカ国立衛生研究所によって与えられたＲ０１　ＥＢ０２７１７０－０１；およびアメリカ国立衛生研究所によって与えられたＵＧ３ＴＲ００２６３６－０１の助成の下、政府の支援により行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【０００３】

コンビナトリアルライブラリー戦略は、薬物送達のためのカチオン性脂質様（リピドイド）ナノ粒子（ＬＮＰ）の開発に有効であることが示されている。様々な親水性アミン頭部（ｈｅａｄ）および疎水性尾部（ｔａｉｌ）を有するリピドイド分子が合成され、小分子、タンパク質およびペプチド、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）、ならびに核酸（ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ＡＳＯ、ｐＤＮＡ等）をｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏの両方で送達するために使用されている。リピドイド分子設計およびナノ粒子超分子構造最適化戦略は、送達特異性を改善し、効力を増強し、また副作用を低減することによって、より良好な送達性能を達成した。分子構造設計をさらに改良するために、本発明者らは、刺激応答性分解性特徴を有する官能基をコンビナトリアルリピドイド分子に組み込んだ。

【０００４】

グルタチオン（ＧＳＨ）および他の細胞内還元剤の存在下で分解され得る還元応答性ジスルフィド結合含有リピドイドナノ粒子のライブラリーが報告されている。これらのリピドイドはｓｉＲＮＡおよびタンパク質の送達に使用された。刺激応答性コンビナトリアルリピドイドライブラリーの概念は、生化学的トリガーから物理的／外部トリガーにさらに

拡張された。これは、リピドイド尾部構造へのｏ－ニトロベンジルエステル基の組み込みにより達成された。次いで、光分解性リピドイドナノ粒子が作製され、小分子薬物送達に使用された。

【０００５】

刺激応答性リピドイドの各ライブラリーは、独自の物理化学的特性を有する。これらのライブラリーの作製および拡大は、ナノ薬物送達用途のために我々の分子ツールボックスを強化にするのに役立つ。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

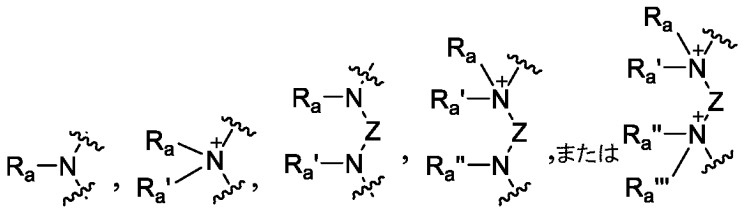
特定の態様では、式Ｉの化合物およびその薬学的に許容される塩が本明細書で提供される：

$$R^{頭部}－リンカー－R^{脂質}\quad（Ｉ）$$

［式中、

$R^{頭部}$は、

【化１】



であり；

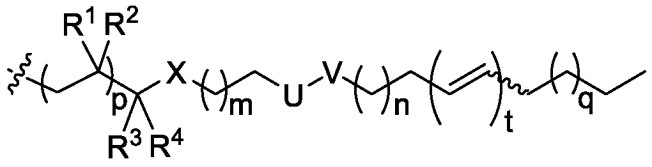
R_a、R_a'、R_a''、およびR_a'''は、独立して、$R^{脂質}$、Ｈ、C_1～C_{20}アルキル、C_2～C_{20}アルケニル、C_2～C_{20}アルキニル、C_3～C_{20}シクロアルキル、C_1～C_{20}ヘテロアルキル、C_1～C_{20}ヘテロシクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、ここで、R_aとR_a'、R_a''とR_a'''は、両方が$R^{脂質}$であることはなく；

Ｚは、C_1～C_{20}二価脂肪族ラジカル、C_1～C_{20}二価ヘテロ脂肪族ラジカル、二価アリールラジカル、または二価ヘテロアリールラジカルであり；

リンカーは、水性酸性条件下で切断可能な酸不安定部分であり；

$R^{脂質}$の各例は独立して、C_1～C_{20}アルキル、C_2～C_{20}アルケニル、C_2～C_{20}アルキニル、または

【化２】



であり；

R^1およびR^2は独立して、Ｈ、ＯＨ、NHR^{30}、またはＳＨであり；

R^3およびR^4は共にＨであり；または、R^3およびR^4は一緒になってオキソ（＝Ｏ）基を形成し；

Ｘは、CH_2、Ｏ、NR^{30}、またはＳであり；

R^{30}は、Ｈ、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルケニル、またはC_{1-6}アルキニルであり；

ＵおよびＶは独立して、Ｓ、Ｓｅ、Ｏ、またはCH_2であり；
ｍは１～３から選択される整数であり；
ｎは１～１４から選択される整数であり；
ｐは０または１であり；
ｑは１～１０から選択される整数であり；
ｔは、０、１、または２である］。

【０００７】

特定の態様では、本明細書に開示される化合物を含むリピドイドナノ粒子が提供される。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１Ａ】リピドイドナノ粒子の酸誘発分解（acid-triggered degradation）の概略図である。

【図１Ｂ】Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの合成経路および酸性ｐＨ誘発加水分解反応である。

【図１Ｃ】例示的なアミン頭部基の化学構造を示す。

【図２Ａ】Ｏ１６ＣＢＡ尾部の^{1}H　ＮＭＲスペクトルである。

【図２Ｂ】Ｏ１６ＣＢＡ尾部の^{13}C　ＮＭＲスペクトルである。

【図２Ｃ】７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの^{1}H　ＮＭＲスペクトルである。

【図２Ｄ】７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの^{13}C　ＮＭＲスペクトルである。

【図２Ｅ】７５－Ｏ１６ＣＢＡおよび７６－Ｏ１６ＣＢＡのＥＳＩ－ＭＳスペクトルのセットである。

【図２Ｆ】Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの化学式、ならびに計算された分子量（理論分子量；Ｃａｌ．）および観察された分子量（実測分子量；Ｏｂｓ．）の概要の表である。

【図３Ａ】Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの酸誘導加水分解反応および尾部切断の概略図である。

【図３Ｂ】異なるインキュベーション時間についてｐＨ４．５および７．０での７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの環状ベンジリデンアセタール基の分解効力を示す棒グラフである。

【図３Ｃ】ｐＨ４．５における７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの^{1}H　ＮＭＲスペクトルの時系列である。

【図３Ｄ】ｐＨ７．２における７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの^{1}H　ＮＭＲスペクトルの時系列である。

【図３Ｅ】ｐＨ７．２、６．０、５．０、および４．５でのインキュベーションの２４時間後の７５－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰのＥＳＩ－ＭＳスペクトルである。

【図４Ａ】中性（ｐＨ７．２）および酸性（ｐＨ５．０）溶液中のＲ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰのＴＥＭ画像（スケールバー＝５００ｎｍ）のセットである。

【図４Ｂ】中性（ｐＨ７．２）および酸性（ｐＨ５．０）溶液中のＲ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰの平均流体力学的直径である。

【図４Ｃ】ｐＨ７．２および５．０の溶液中のＮＲ／７５－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰの蛍光発光スペクトルである。

【図５】Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰ製剤（Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１、およびＲ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２）の細胞内ＧＦＰ　ｍＲＮＡ送達効力（delivery efficacy）を示す棒グラフである。Ｌｐｆ２ｋおよび裸の（naked）ｍＲＮＡを陽性対照および陰性対照として使用した。［Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ］＝７．４μｇ／ｍＬ；［ＧＦＰ　ｍＲＮＡ］＝０．７４μｇ／ｍＬ；暴露時間＝２４時間。

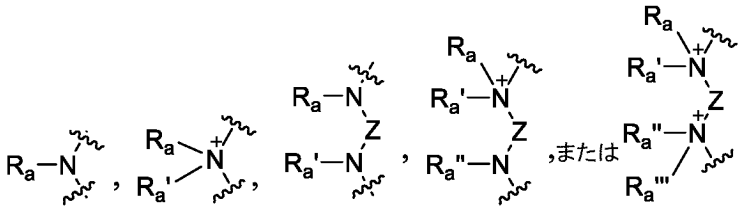
【図６】Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰおよびＬｐｄ２ｋ（［リピドイド］＝７．４μｇ／ｍＬ；暴露時間＝２４時間）の細胞毒性試験を示す棒グラフである。未処理の細胞を陰性対照として使用した。

【図７】酸分解性疎水性尾部Ｏ１６ＣＢＡの調製に使用される合成経路を示す。

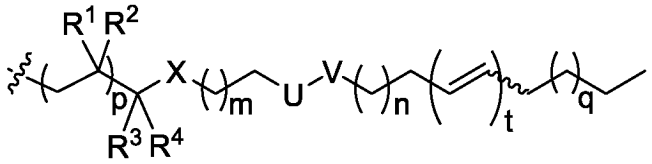
【図８】ＤＭＳＯ－ｄ６中のＨｅｘＤＭＢＡの^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルである。
【図９】ＤＭＳＯ－ｄ６中のＨｅｘＤＭＢＡＨの^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルである。
【図１０】環状ベンジリデンアセタール含有リピドイドである７７－Ｏ１６ＣＢＡ、７８－Ｏ１６ＣＢＡ、および８０－Ｏ１６ＣＢＡのＥＳＩ－ＭＳスペクトルのセットである。
【図１１】２４時間後における、ｐＨ７．２、６．０、５．０、および４．５の下でインキュベートした７６－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰのＥＳＩ－ＭＳスペクトルのセットである。
【図１２】２４時間後における、ｐＨ７，２、６．０、５．０、および４．５の下でインキュベートした７７－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰのＥＳＩ－ＭＳスペクトルのセットである。
【図１３】ｐＨ５．０下で２４時間インキュベートした後の７５－、７６－、および７７－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰの追加のＴＥＭ画像のセットである。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
特定の態様では、式Ｉの化合物またはその薬学的に許容される塩が本明細書で提供される：

$$R^{頭部}-リンカー-R^{脂質}\quad（Ｉ）$$

［式中、
$R^{頭部}$は、
【化３】



であり；
R_a、R_a'、R_a''、およびR_a'''は、独立して、$R^{脂質}$、Ｈ、C_1～C_{20}アルキル、C_2～C_{20}アルケニル、C_2～C_{20}アルキニル、C_3～C_{20}シクロアルキル、C_1～C_{20}ヘテロアルキル、C_1～C_{20}ヘテロシクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、ここで、R_aとR_a'、R_a''とR_a'''は、両方が$R^{脂質}$であることはなく；
Ｚは、C_1～C_{20}二価脂肪族ラジカル、C_1～C_{20}二価ヘテロ脂肪族ラジカル、二価アリールラジカル、または二価ヘテロアリールラジカルであり；
リンカーは、水性酸性条件下で切断可能な酸不安定部分であり；
$R^{脂質}$の各例は独立して、C_1～C_{20}アルキル、C_2～C_{20}アルケニル、C_2～C_{20}アルキニル、または
【化４】



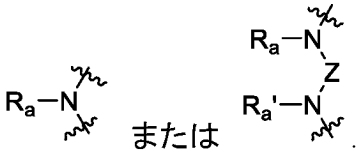
であり；
R^1およびR^2は独立して、Ｈ、ＯＨ、NHR^{30}、またはＳＨであり；
R^3およびR^4は共にＨであり；または、R^3およびR^4は一緒になってオキソ（＝Ｏ）基を形成し；
Ｘは、CH_2、Ｏ、NR^{30}、またはＳであり；

Ｒ^{30}は、Ｈ、Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-6}$アルケニル、またはＣ$_{1-6}$アルキニルであり；
ＵおよびＶは独立して、Ｓ、Ｓｅ、Ｏ、またはＣＨ$_2$であり；
ｍは１～３から選択される整数であり；
ｎは１～１４から選択される整数であり；
ｐは０または１であり；
ｑは１～１０から選択される整数であり；
ｔは、０、１、または２である］。

【００１０】

特定の実施形態では、Ｒ^{頭部}は、

【化５】



である。

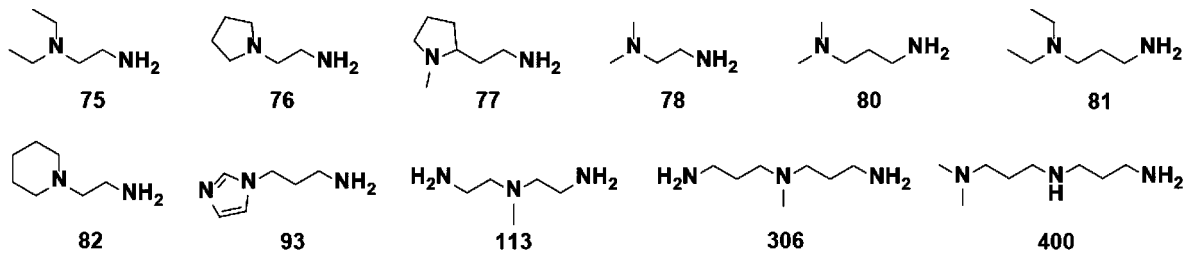
【００１１】

特定の実施形態において、Ｒ$_a$およびＲ$_a$'は独立して、Ｒ^{脂質}、Ｈ、またはＣ$_1$～Ｃ$_{20}$アルキルである。

【００１２】

特定の実施形態において、Ｒ^{頭部}は、

【化６】

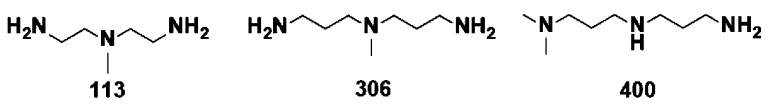


からなる群より選択される化合物に由来する。

【００１３】

特定の実施形態において、Ｒ^{頭部}は、

【化７】

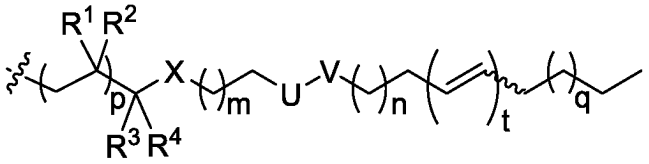


からなる群より選択される化合物に由来する。

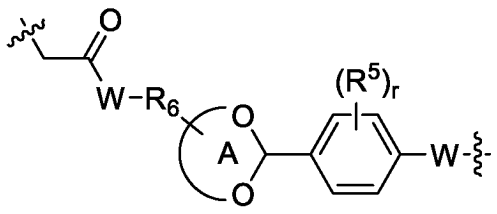
【００１４】

特定の実施形態では、Ｒ^{脂質}の各例は独立して、Ｃ$_1$～Ｃ$_{20}$アルキル、Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$アルケニル、またはＣ$_2$～Ｃ$_{20}$アルキニルである。

【００１５】
特定の実施形態において、$R^{脂質}$の各例は独立して、
【化８】



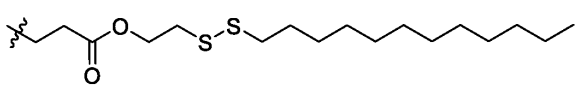
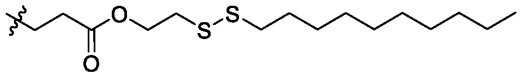
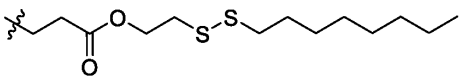
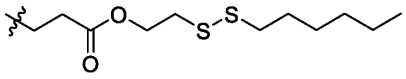
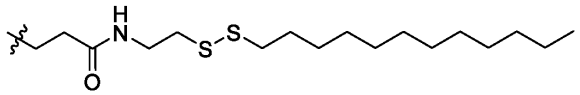
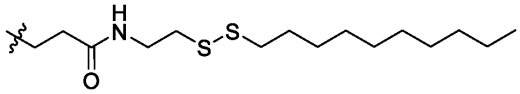
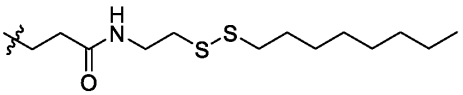
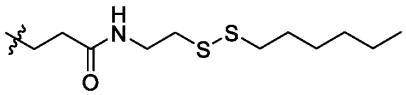
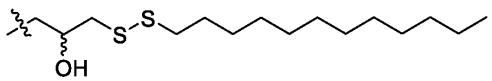
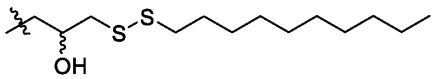
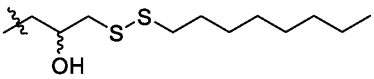
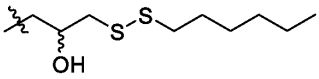
である。
【００１６】
ある特定の実施形態において、R^1およびR^2はＨである。特定の実施形態において、R^1はＨであり、R^2はＯＨである。
【００１７】
特定の実施形態では、R^3およびR^4はＨである。特定の実施形態では、R^3およびR^4は一緒になってオキソ（＝Ｏ）基を形成する。
【００１８】
特定の実施形態において、Ｚは、CH_2、Ｏ、またはNR^{30}である。特定の実施形態において、ＺはCH_2である。特定の実施形態では、ＺはＯである。特定の実施形態において、ＺはNR^{30}である。
【００１９】
特定の実施形態では、ＵおよびＶは独立して－CH_2－または－Ｏ－である。特定の実施形態では、ＵおよびＶは独立して－CH_2－または－Ｏ－であり、ＵとＶは同じではない。特定の実施形態において、ＵおよびＶは独立して－CH_2－または－Ｓ－である。特定の実施形態では、ＵおよびＶは両方とも－CH_2－である。特定の実施形態において、ＵおよびＶは両方とも－Ｓ－である。
【００２０】
特定の実施形態において、ｍは、１または２である。
【００２１】
特定の実施形態において、ｎは４～１２から選択される整数である。特定の実施形態において、ｎは６～１０から選択される整数である。
【００２２】
特定の実施形態において、ｐは０である。特定の実施形態において、ｐは１である。
【００２３】
特定の実施形態において、ｑは２～８から選択される整数である。特定の実施形態において、ｑは４～８から選択される整数である。
【００２４】
特定の実施形態において、ｔは０である。特定の実施形態において、ｔは１である。
【００２５】
特定の実施形態において、リンカーは式ＩＩによって表される：
【化９】



(II)

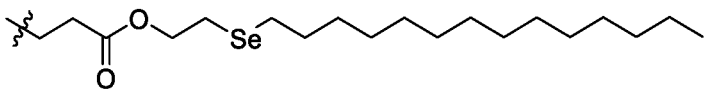
［式中、
Ｗは、ＯまたはＮＨであり；
Ｒ^{5}の各々は独立して、水素、ハロゲン、ニトロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキル、ヘテロアラルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、またはヘテロアリールであり；
ｒは０～４から選択される整数であり；
Ａは５～８員複素環であり；
Ｒ^{6}は存在しないか、またはＲ^{6}はアルキレンもしくはアルケニレンである］。
【００２６】
特定の実施形態において、ＷはＯである。特定の実施形態において、ＷはＮＨである。
【００２７】
特定の実施形態において、Ｒ^{5}はアルコキシ、例えばメトキシである。
【００２８】
特定の実施形態において、ｒは２である。
【００２９】
特定の実施形態において、Ｒ^{6}は存在しない。特定の実施形態では、Ｒ^{6}はメチレンである。
【００３０】
特定の実施形態において、Ａは６員複素環である。
【００３１】
特定の実施形態において、Ａは非置換である。
【００３２】
特定の実施形態では、Ａは、ハロゲン、ニトロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アラルキル、ヘテロアラルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、またはヘテロアリールで置換されている。
【００３３】
特定の実施形態において、Ｒ^{脂質}の各例は独立して、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル，ｎ－オクチル、

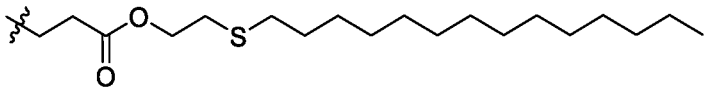
【化１０－１】

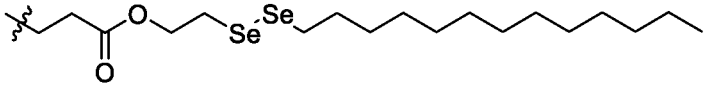

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

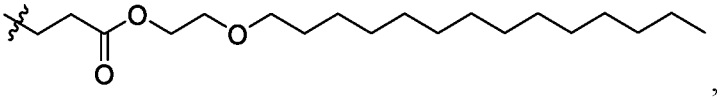
,

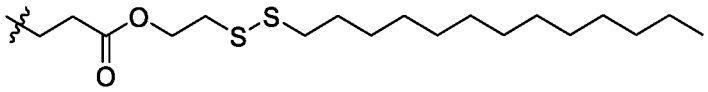
【化１０－２】

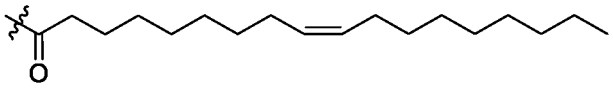

,

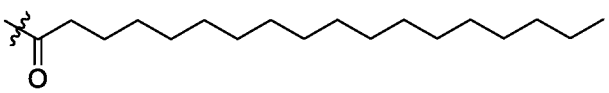

,

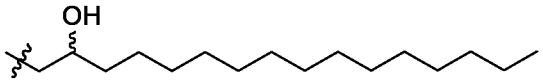

,


,


,


,


, および

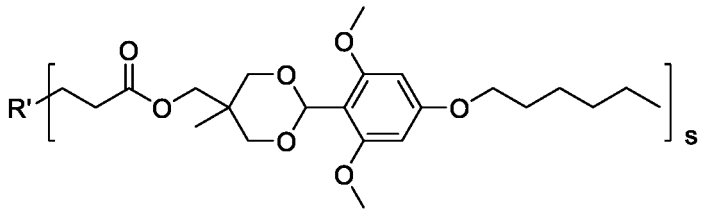


からなる群より選択される。

【００３４】

特定の実施形態において、化合物は式ＩＩＩの化合物である：

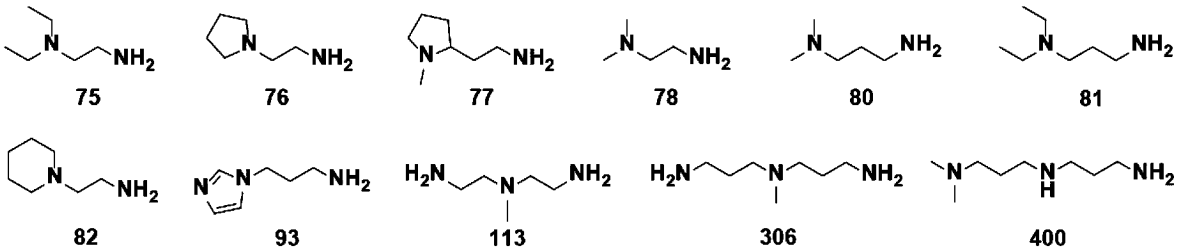
【化１１】


(III),

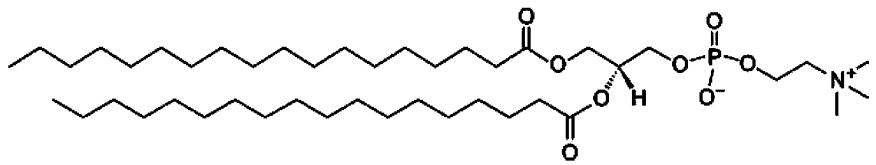
［式中、

Ｒ’は、

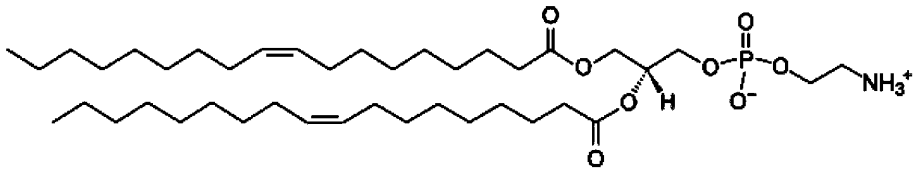
【化１２】



からなる群より選択される化合物に由来し；
ｓは、原子価が許す限り、１～４から選択される整数である］。
【００３５】
特定の態様では、本明細書に開示される化合物を含むリピドイドナノ粒子が提供される。
【００３６】
特定の実施形態では、リピドイドナノ粒子はコレステロールをさらに含む。
【００３７】
特定の実施形態では、化合物とコレステロールの重量比（化合物：コレステロール）は、約２：１～約８：１である。
【００３８】
特定の実施形態では、化合物とコレステロールの重量比は約４：１である。
【００３９】
特定の実施形態では、リピドイドナノ粒子は、ＤＯＰＥ、ＤＳＰＣ、ＤＯＰＣ、またはＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋをさらに含み、
ＤＳＰＣは、以下の構造：
【化１３】

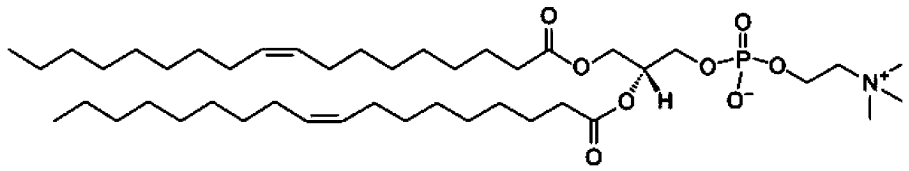


を有し；
ＤＯＰＥは、以下の構造：
【化１４】



を有し；
ＤＯＰＣは、以下の構造：

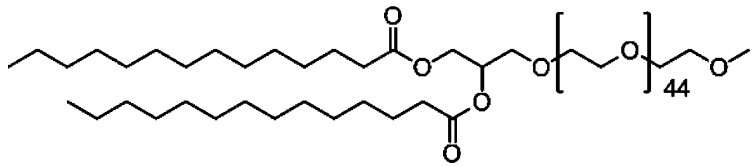
【化１５】



を有し；

ＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋは、以下の構造：

【化１６】



を有する。

【００４０】

特定の実施形態では、リピドイドナノ粒子はＤＯＰＥをさらに含む。

【００４１】

特定の実施形態では、化合物とＤＯＰＥの重量比（化合物：ＤＯＰＥ）は、約４：１～約１：１である。ある特定の実施形態では、化合物とＤＯＰＥの重量比は、約４：１または約１：１である。

【００４２】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるリピドイドナノ粒子は、ｍＲＮＡをさらに含む。ある特定の実施形態では、ｍＲＮＡは、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）ｍＲＮＡである。

【００４３】

特定の実施形態では、小分子をさらに含む。ある態様において、小分子は抗真菌剤または化学療法剤である。特定の実施形態では、小分子は、ボルテゾミブ、イマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、ダコミチニブ、ダウノルビシン塩酸塩、シタラビン、フルオロウラシル、塩酸イリノテカン、ビンクリスチン硫酸塩、メトトレキサート、パクリタキセル、ビンクリスチン硫酸塩、エピルビシン、ドセタキセル、シクロホスファミド、カルボプラチン、レナリドミド、イブルチニブ、アビラテロン酢酸エステル、エンザルタミド、ペメトレキセド、パルボシクリブ、ニロチニブ、エベロリムス、ルキソリチニブ、エピルビシン、ピリルビシン、イダルビシン、バルルビシン、アムルビシン、ブレオマイシン、フレオマイシン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、ストレプトゾテシン、ペントスタチン、ミトサン類（mitosanes）マイトマイシンＣ、エンジイン類（enediynes）カリケアマイシン、グリコシド類　レベッカマイシン、マクロライドラクトン類　エポチフィロン、イクサベピロン、ペントスタチン、サリノスポラミドＡ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、エトポシド、テニポシド、ビノレルビン、ドセタキセル、カンプトテシン、ハイカムチン、ペデリン、テオペデリン、アンナミド（annamide）、トラベクテジン、アプリジン、およびエクテイナシジン７４３（ＥＴ７４３）からなる群より選択される。

【００４４】

特定の実施形態では、小分子はアムホテリシンＢまたはドキソルビシンである。

【００４５】

特定の実施形態では、リピドイドナノ粒子は、約２５ｎｍ～約１０００ｎｍの粒径を有する。特定の実施形態では、リピドイドナノ粒子は、約５０ｎｍ～約７５０ｎｍの粒径を有する。特定の実施形態では、リピドイドナノ粒子は、約２００ｎｍ～約５００ｎｍの粒径を有する。

【００４６】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に開示されるリピドイドナノ粒子と、１つまたは複数の薬学的に許容される担体または賦形剤とを含む医薬組成物である。

【実施例】

【００４７】

本明細書に記載される発明がより完全に理解され得るように、以下の実施例を記載する。本出願に記載される実施例は、本明細書に提供される化合物、組成物、材料、デバイス、および方法を例示するために提供され、その範囲を限定するものとして決して解釈されるべきではない。

【００４８】

材料および方法

材料および機器

リピドイド合成に使用したすべての化学物質および溶媒は、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ－Ｓｉｇｍａから購入し、特に断りのない限り精製しないで使用した。また、^{1}Ｈおよび^{13}ＣＮＭＲスペクトルは、Ｂｒｕｋｅｒ　ＡＶＩＩｌ　５００ＭＨｚ　ＮＭＲ分光計で収集した。ＥＳＩ－ＭＳスペクトルは、溶媒としてメタノール（０．５％酢酸；ｖ／ｖ）を用いてＦｉｎｎｉｇａｎ　ＬＴＱ質量分析計で収集した。ナノ粒子の流体力学的サイズは、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｚｅｔａ－ＰＡＬＳ粒径分析器によって測定した。ＴＥＭ画像は、ＦＥＩ　Ｔｅｃｈｎａｉ透過型電子顕微鏡で撮影した。ＧＦＰ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーターで分析し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いてデータを解析した。

【００４９】

Ｏ１６ＣＢＡの合成

環状ベンジリデンアセタール含有疎水性尾部Ｏ１６ＣＢＡの合成経路を図７に示す。４－ヒドロキシ－２，６－ジメトキシベンズアルデヒド（ＨＤＭＢＡ；５．１ｇ、２８．０ｍｍｏｌ）をアセトン（１００ｍＬ）に溶解した。炭酸カリウム（４．６ｇ、３３．３ｍｍｏｌ）を添加し、続いて、連続撹拌しながら１－ブロモヘキサン（６．８ｇ、４１．２ｍｍｏｌ）を添加した。反応を５５℃で２４時間維持した。混合物を室温に冷却し、濾紙で濾過した。次いで、溶媒をロータリーエバポレーションにより除去し、移動相としてヘキサンおよび酢酸エチルを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより生成物を精製した。ＨｅｘＤＭＢＡを白色固体として得て（５．２ｇ；収率　約７０％）、その構造を^{1}Ｈ　ＮＭＲによって確認した（図８）。

【００５０】

ＨｅｘＤＭＢＡＨを、以前に報告された同様の手順を使用して合成した。簡単に説明すると、ＨｅｘＤＭＢＡ（５．２ｇ、１９．５ｍｍｏｌ）および１，１，１－トリス（ヒドロキシメチル）エタン（６．７ｇ、５５．９ｍｍｏｌ）を無水テトラヒドロフラン（２００ｍＬ）に溶解した。次いで、５Åモレキュラーシーブ（３０ｇ）およびｐ－トルエンスルホン酸（０．４４ｇ、２．５６ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で１２時間撹拌し、モレキュラーシーブを濾別し、溶媒をロータリーエバポレーションにより除去した。移動相としてヘキサンおよび酢酸エチルを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりＨｅｘＤＭＢＡＨを精製した。ＨｅｘＤＭＢＡＨを白色固体として回収し（５．４ｇ；収率　約７５％）、その構造を^{1}Ｈ　ＮＭＲによって確認した（図９）。

【００５１】

ＨｅｘＤＭＢＡＨ（５．４ｇ、１４．７ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（約１５０ｍＬ）に溶解し、続いてトリエチルアミン（２．２ｇ、２２．１ｍｍｏｌ）に溶解した。溶液を

氷浴中で１５分間冷却し、塩化アクリロイル（２．００ｇ、２２．１ｍｍｏｌ）をゆっくり滴下した。反応混合物を室温に加温し、１２時間撹拌した。先に記載したものと同じ移動相を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、Ｏ１６ＣＢＡを白色固体として得た（４．５ｇ；収率　約７３％）。その構造を^{1}Ｈおよび^{13}Ｃ　ＮＭＲを用いて確認した（図２Ａおよび２Ｂ）。

【００５２】

Ｏ１６ＣＢＡ尾部リピドイドの合成

本発明者らが以前に報告した手順を使用して、マイケル付加反応を介してＯ１６ＣＢＡ尾部およびアミン頭部からリピドイドを合成した。７５－Ｏ１６ＣＢＡ等を合成するために、アミン（７５、７６、７７、７８、８０、８１、８２、および９３）をＯ１６ＣＢＡと１／２．２のモル比で混合した。１１３－Ｏ１６ＣＢＡ等を合成するために、アミン（１１３、３０６、および４００）をＯ１６ＣＢＡと１／３．３のモル比で混合した。これらの混合物を、テフロン（登録商標）で裏打ちしたガラス製スクリュートップバイアル中において連続撹拌しながら７０℃で４８時間置いた。混合物を室温に冷却し、ジクロロメタンで希釈した。移動相としてジクロロメタンおよびメタノールを用い、Ｔｅｌｅｄｙｎｅ　ＩＳＣＯクロマトグラフィー精製システムを使用して粗生成物を精製した。^{1}Ｈ　ＮＭＲ、^{13}Ｃ　ＮＭＲ（図２ＣおよびＤ）、およびＥＳＩ－ＭＳ（図２Ｅおよび１０）によってリピドイドを特徴付けた。

【００５３】

リピドイドナノ粒子の作製

ヘルパー脂質（すなわち、コレステロールおよびＤＯＰＥ）を含まないリピドイドナノ粒子は、純粋なＯ１６ＣＢＡリピドイド（７５－Ｏ１６ＣＢＡなど）をエタノールに溶解することによって調製した。選択的溶媒（selective solvent）として水を添加し、超音波水浴中での１０分間の超音波処理により自己組織化プロセスを誘発した。これに続いて透析（ＭＷＣＯ　３．５ｋＤａ；Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ透析カセット；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を行い、エタノールを除去した。コレステロールおよびＤＯＰＥを含むリピドイドナノ粒子は、予め計算された量のＯ１６ＣＢＡリピドイド、コレステロール、およびＤＯＰＥ（Ｏ１６ＣＢＡリピドイド／コレステロール／ＤＯＰＥ＝４／１／１または４／１／４；重量比）をエタノールおよび次いで水に溶解することによって調製した。これに再び超音波処理および透析を行った。

【００５４】

ＧＦＰ　ｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋから購入）搭載リピドイドナノ粒子は、ＰＢＳ中においてリピドイドナノ粒子（ヘルパー脂質を含むまたは含まない）とｍＲＮＡを１０／１の重量比（Ｏ１６ＣＢＡリピドイド／ｍＲＮＡ）で混合することによって作製した。混合物を室温で１５分間インキュベートした後に使用した。

【００５５】

ｍＲＮＡの細胞内送達

２５０μＬのＤＭＥＭ細胞培養培地中に分散させた２．０ｋ細胞／ウェルの初期濃度のＨｅＬａ細胞を４８ウェルプレートに播種し、２４時間インキュベートした。フローサイトメトリー分析の前に、細胞を３７℃および５％CO_2でさらに２４時間インキュベートした。

【００５６】

ＭＴＴアッセイ

１００μＬのＤＭＥＭ細胞培養培地中に分散させた５０００細胞／ウェルの初期濃度のＨｅＬａ細胞を９６ウェルプレートに播種し、２４時間インキュベートした。次いで、リピドイドナノ粒子を各ウェルに添加した。細胞を３７℃および５％CO_2でさらに２４時間インキュベートした後、ＭＴＴ試薬（５ｍｇ／ｍＬ；３０μＬのＰＢＳ中）を添加した。４時間のインキュベーション後、培養培地を注意深く除去し、２００μＬのＤＭＳＯを各ウェルに添加した。ホルマザンをＤＭＳＯ溶液で溶解した後、マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｓｐｅｃｔｒａ　Ｍａｘ）を用いて５７０ｎ

ｍで吸光度を測定した。

【００５７】

統計分析

データは平均±ＳＤとして報告した。実験を少なくとも３回繰り返した。群間の差の有意性を決定するために、スチューデントｔ検定を行った。０．０５未満のＰ値を統計的に有意であるとみなした。

【００５８】

実施例１．脂質合成

ｐＨ応答性環状ベンジリデンアセタール含有疎水性尾部Ｏ１６ＣＢＡを、多段階反応によって最初に合成した（図７）。Ｏ１６ＣＢＡ（図２Ａおよび２Ｂ）およびその前駆体（図８および９）の化学構造をＮＭＲ分析によって確認した。

【００５９】

次いで、アクリレート含有Ｏ１６ＣＢＡ尾部を市販のアミン含有頭部基（７５、７６、７７等；図１Ｂおよび１Ｃ）と反応させることによるマイケル付加反応によって、カチオン性リピドイドのコンビナトリアルライブラリーを合成した。リピドイドをＲ－Ｏ１６ＣＢＡ（Ｒはアミン番号を表す）と命名し、化学構造をＮＭＲ（図２Ｃおよび２Ｄ）およびＥＳＩ－ＭＳスペクトル（図２Ｅおよび１０）によって確認した。要約されたＭＳデータ（図２Ｆ）は、Ｏ１６ＣＢＡリピドイドライブラリーの計算された分子量（理論分子量）および観察された分子量（実測分子量）が一致していることを示し、Ｏ１６ＣＢＡベースのリピドイドが首尾よく合成されたことを示した。反応物質として異なるベンズアルデヒド誘導体およびハロアルカンを使用することにより、同じ方法によってＯ１６ＣＢＡの類似体を合成できることに留意されたい（図７）。これは、新しい官能基を導入するために、またはナノキャリアとしてのリピドイドナノ粒子の送達性能をさらに最適化するために有用であり得る。

【００６０】

リピドイド尾部中の環状ベンジリデンアセタール部分は、酸によって促進される加水分解反応によって切断することができる。２，４，６－トリメトキシフェニル基含有環状アセタール基が、ｐＨ５．２３で容易に分解され得ることが以前に報告されている。したがって、今回合成したＲ－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドは、弱酸性条件下で分解し、自己組織化ナノ粒子を解離させると予想された（図１Ａおよび図１Ｂ）。

【００６１】

実施例２．Ｒ－Ｑ１６ＣＢＡリピドイドのｐＨ応答性

このライブラリーにおいて、７５－Ｏ１６ＣＢＡおよび７６－Ｏ１６ＣＢＡなどの２つの尾部を含むリピドイドは、両方の尾部が酸分解によって切断される。このプロセス中に、生成物Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－１、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－０、およびＨｅｘＤＭＢＡを形成することができる（図３Ａ）。２つより多くの尾部を含むリピドイド（１１３－、３０６－、および４００－Ｏ１６ＣＢＡ）も、分解後により多くの生成物を形成することができる。インタクトな（無傷の）リピドイドおよび分解生成物上の環状ベンジリデンアセタール／アルデヒド部分の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルに示される特徴的なピークを使用して、酸誘発リピドイド分解プロセスをリアルタイムで研究することができた。以前に確立された手順に従って、７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドの加水分解反応を３７℃およびｐＨ７．２または４．５で調べた。図３Ｂに示すように、環状ベンジリデンアセタール基の分解は、ｐＨ４．５で１時間、４時間、８時間、および２４時間のインキュベーション後に、２５％、６０％、８８％、および９９％であると決定された。この結果は、８時間の処理後に７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイド中の尾部基のほとんどが切断され、２４時間後にはほぼ全てが分解されたことを示す。これは、２，４，６－トリメトキシフェニル含有環状アセタール基が酸性条件下でどのように高分解性であるかを概説する以前の報告と一致する。

【００６２】

比較すると、ｐＨ７．２で８時間および２４時間インキュベートした後の７５－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドでは、わずか１．９％および３，３％のアセタール結合の分解が生じた

だけである。図３Ａに示される特徴的なプロトンシグナルは、ｐＨ４．５での７５－Ｏ１６ＣＢＡの１Ｈ　ＮＭＲスペクトルにおいて観察することができる（図３Ｃ）。さまざまなインキュベーション時間間隔（０、１、４、８、および２４時間）で、ｐＨ７．２の溶液中のリピドイドのスペクトルにおいてピークシフト（置換されたフェニル基上のプロトン）も新たなピーク生成（アルデヒド基上のプロトン）も観察されなかった（図３Ｄ）。

【００６３】

酸誘発リピドイド分解をＥＳＩ－ＭＳによってさらに確認した。７５－Ｏ１６ＣＢＡ、７６－Ｏ１６ＣＢＡ、および７７－Ｏ１６ＣＢＡリピドイドナノ粒子を調製し、それぞれ７．２、６．０、５．０、および４．５のｐＨ値を有する水溶液中において３７℃でインキュベートした。２４時間後、０．５％酢酸を含有するメタノールでＬＮＰ水溶液を希釈し、ＥＳＩ－ＭＳによって調べた。図３Ｅに示すように、インタクトな７５－Ｏ１６ＣＢＡを表すピーク（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$；ｍ／ｚ　９６１．６４）および７５－Ｏ１６ＣＢＡ－１を表す小さなピーク（ｍ／ｚ　７１３．５５）がｐＨ７．２の溶液で観察された。^{1}Ｈ ＮＭＲはｐＨ７．２での２４時間のインキュベーション後に７５－Ｏ１６ＣＢＡ－１またはアルデヒド副生成物の生成を示さなかったので、ｐＨ７．２の溶液中の７５－Ｏ１６ＣＢＡ－１の存在は、ＭＳ試験からの酸によって誘導される分解による可能性が最も高いことに留意されたい（図３Ｄ）。ｐＨ６．０でインキュベートした７５－Ｏ１６ＣＢＡのＥＳＩ－ＭＳは、インタクトな７５－Ｏ１６ＣＢＡと７５－Ｏ１６ＣＢＡ－１の小さなピークの両方が観察され、ｐＨ７．２のものと同様の結果を示した。ｐＨ４．５では、生成物７５－Ｏ１６ＣＢＡ－０が検出され、７５－Ｏ１６ＣＢＡ－１もインタクトな７５－Ｏ１６ＣＢＡも観察されなかった。これは、７５－Ｏ１６ＣＢＡの分解がｐＨ４．５で２４時間後にほぼ完了したことを示し、これは１Ｈ　ＮＭＲ測定と一致している（図３Ｂ）。ｐＨ５．０の条件で処理した試料は、ｐＨ４．５の結果と非常に類似した結果を示した。さらに、図１１および１２に示すように、２つの他のリピドイド（７６－Ｏ１６ＣＢＡおよび７７－Ｏ１６ＣＢＡ）で同じパターンが観察された。

【００６４】

<u>実施例３．Ｏ１６ＣＢＡリピドイドナノ粒子の酸誘導分解</u>

酸誘導分解下でのＯ１６ＣＢＡ　ＬＮＰの形態学的変化をＴＥＭおよびＤＬＳを使用して研究した。この研究では、自己組織化手順を使用して７５－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰを作製した。ＴＥＭ試験により、ｐＨ７．２の溶液中で３１５ｎｍの平均サイズの球状ナノ粒子が形成されたことが確認された（図４Ａ）。

【００６５】

リピドイド分子の自己組織化充填パラメータ（self-assembly packing parameter）および使用する自己組織化手順に起因して、本発明者らが先に研究したコンビナトリアルリピドイドナノ粒子のほとんどすべてが、小胞／リポソーム構造を有する。リピドイドナノ粒子の超分子構造（例えば、形態、サイズなど）は、リピドイド分子の化学構造および組織化条件の両方に依存すると考えられる。リピドイドナノ粒子のサイズおよび分布はまた、マイクロ流体工学、機械的押出、および他の技法を使用してさらに最適化することもできる。

【００６６】

ｐＨ５．０で２４時間インキュベートした後、リピドイドナノ粒子は破壊され、約１３０ｎｍの非晶質凝集体が生じた（図４Ａ）。同じ酸誘発形態学的変換が、ＴＥＭ画像を用いて７６－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰおよび７７－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰにおいても観察された（図１３）。ＤＬＳ測定は、酸処理後のサイズ変動をさらに示した。７５－Ｏ１６ＣＢＡの流体力学的直径は、ｐＨ５．０の溶液中での２４時間のインキュベーション後に３８２ｎｍから１５０ｎｍに減少した（図４Ｂ）。平均流体力学的サイズの減少は７６－Ｏ１６ＣＢＡおよび７７－Ｏ１６ＣＢＡについても観察され、これはＴＥＭ観察結果と一致した。ＤＬＳによって測定されたＲ－Ｏ１６ＣＢＡの流体力学的サイズは、ＴＥＭ画像から計算された平均サイズより大きかった。これは、ＴＥＭ画像を乾燥状態で撮影したためであると考えられる。以前に報告された手順に従って、微小環境極性感受性蛍光色素（ナイ

ルレッド（Ｎｉｌｅ　ｒｅｄ））を７５－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰの疎水性リピドイド二重膜に組み込んだ。ナイルレッドは、リピドイド二重層などの非極性環境において明るい蛍光発光を有し、極性または水溶液において蛍光が減少する。ＮＲ／７５－Ｏ１６ＣＢＡの蛍光発光強度の減少（約５４％）および最大発光ピークのレッドシフト（６１９から６４６ｎｍ）が、ｐＨ５．０での２４時間のインキュベーション後に観察された（図４Ｃ）。これは、酸処理後に微小環境変動およびナノ粒子解離が起こったことを示した。全体として、^{1}Ｈ　ＮＭＲ、ＭＳ、ＴＥＭ、ＤＬＳ、および蛍光測定は、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡリピドイド分子の酸誘発分解、ならびに結果として生じるナノ粒子構造の破壊を実証した。

【００６７】

実施例４．ｍＲＮＡ送達のためのＲ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰ

細胞内ｍＲＮＡ送達のための活性リピドイドとしてＲ－Ｏ１６ＣＢＡ分子を使用する可能性を調査した。この研究では、異なる製剤を調製した。表１に示すように、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰはＲ－Ｏ１６ＣＢＡのみを含有する；Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１　ＬＮＰは、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ、コレステロール、およびＤＯＰＥを４／１／１の重量比で含有する：Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２　ＬＮＰは、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ、コレステロール、およびＤＯＰＥを４／１／４の重量比で含有する。コレステロールおよびＤＯＰＥは、以前の研究においてこれらヘルパー脂質がナノ粒子の安定化、膜注入、および細胞内在化を高め得るが示されたため、添加された。

【表１】

表1. 本研究で使用したリピドイドナノ粒子製剤のコードおよびパラメータ

コード	重量比		
	リピドイド	コレステロール	DOPE
R-O16CBA	4	0	0
R-O16CBA-F1	4	1	1
R-O16CBA-F2	4	1	4

【００６８】

ＰＢＳ緩衝液中でｍＲＮＡとＬＮＰ（Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ／ｍＲＮＡ＝１０／１；重量比）を混合することによって、異なるナノ粒子製剤にＧＦＰｍＲＮＡを搭載（load）した。ほとんどのコンビナトリアルＬＮＰは、保存中に高い安定性を示した。さらに、ＬＮＰの安定性は、小さなおよび巨大分子賦形剤（コレステロール、ＤＯＰＥ、ＰＥＧ－ＤＳＰＥなど）を製剤に添加することによってさらに改善することができる。以下の研究の全てにおいて、別段の記載がない限り、フレッシュに調製したＬＮＰを使用したことに留意されたい。ｍＲＮＡおよびＬＮＰをＨｅＬａ細胞に添加し、２４時間のインキュベーション後にフローサイトメトリーを用いて送達効率（delivery efficiency）を決定した（［Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ］＝７．４μｇ／ｍＬ；［ＧＦＰ　ｍＲＮＡ］＝０．７４μｇ／ｍＬ；暴露時間＝２４時間）。細胞内ｍＲＮＡ送達効率は、ＧＦＰ＋細胞のパーセンテージによって表された。市販のカチオン性トランスフェクション試薬Ｌｐｆ２ｋを陽性対照として使用した。未処理のＨｅＬａ細胞および裸のＧＦＰ　ｍＲＮＡで処理したＨｅＬａ細胞を陰性対照として使用した。図５に示すように、未処理細胞および裸のｍＲＮＡ処理細胞の両方が、無視できるパーセンテージ（＜１％）のＧＦＰ＋ＨｅＬａ細胞を誘導した。一方、Ｌｐｆ２ｋは、約９１％のＧＦＰ＋細胞が記録され、ｍＲＮＡの送達効率が高かった。

【００６９】

Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ製剤中の中性ヘルパー脂質（コレステロールおよびＤＯＰＥ）は、ｍＲＮＡ送達において必須の役割を果たすことが発見された。ヘルパー脂質なしでは、送達

効率はかなり低く、ＬＮＰ製剤の８つ（７５－Ｏ１６ＣＢＡおよび７６－Ｏ１６ＣＢＡなど）は１５％未満の効率を有していた。２つのリピドイドナノ粒子、１１３－Ｏ１６ＣＢＡおよび３０６－Ｏ１６ＣＢＡは、それぞれ２９％および４４％のＧＦＰ＋細胞を誘導したが、最も活性な４００－Ｏ１６ＣＢＡは６８％のＧＦＰ＋細胞を誘導した。核酸送達に関して、２つの尾部を有するリピドイド（７５－Ｇ１６ＣＢＡなど）と比較して、２つより多くの尾部を有するリピドイド（１１３－、３０６－、および４００－Ｏ１６ＣＢＡ）のより優れた性能は、以前の報告と一致し、さらなる研究の価値がある。

【００７０】

ヘルパー脂質の添加はＬＮＰ送達効力を大きく改善し、複数のＬＮＰがＬｐｆ２ｋのＧＦＰに匹敵するＧＦＰ発現を達成した。Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１製剤のライブラリーにおいて、９３－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１（約２％ＧＦＰ＋細胞）を除く全てのＬＮＰが、それらの対応するＲ－Ｏ１６ＣＢＡ製剤よりも高い効力を示した。Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１製剤の９つは、＞５０％の送達効率を有し、８１－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１は、約９３％のＧＦＰ＋細胞を生成し、最も高かった。７６－、７７－、１１３－、３０６－、および４００－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１などの他のトップ製剤は、７８～８３％の送達効力を誘導した。

【００７１】

次いで、ｍＲＮＡ送達に対するヘルパー脂質の量の増加の効果を調査した。重量比４／１／４でＲ－Ｏ１６ＣＢＡ／コレステロール／ＤＯＰＥを有する製剤（Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２）を作製し、試験した。図５に示すように、９３－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２と４００－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２を除き、他のすべてのＬＮＰが、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡより高い効力を示した。Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１　ＬＮＰと比較して、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２の送達効力はわずかに低かった（７５－および７８－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２を除く）。８１－Ｑ１６ＣＢＡ－Ｆ２は、約７８％のＧＦＰ＋細胞が記録され、この製剤化されたライブラリーにおいて最も効率的であると決定された。再び、１１３－、３０６－、および４００－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２は、それらの送達効力が５７～７３％であると決定され、依然としてトップＬＮＰに含まれていた。

【００７２】

全体として、ヘルパー脂質の添加は、ほとんどのＬＮＰの送達効力を改善することができる。より高いＤＯＰＥ含有量を有するＲ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ２　ＬＮＰは、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１　ＬＮＰと同程度またはわずかに低い効力を有した。さらに、８１－Ｏ１６ＣＢＡ－Ｆ１および－Ｆ２は、２つの製剤ライブラリーにおいて最も効率的であることが決定され、３尾部ＬＮＰ（three-tailed LNP）は、ヘルパー脂質有りおよび無しの両方で良好に機能した。

【００７３】

実施例５．細胞毒性試験

上述のように、Ｒ－Ｏ１６ＣＢＡ製剤のいくつかは、市販の試薬Ｌｐｆ２ｋと同等のｍＲＮＡ送達効力を達成した。効力に加えて、担体の生体適合性も調べた。Ｌｐｆ２ｋは高効率であるが、以前の研究は、Ｌｐｆ２ｋが毒性であることも示した。これに関連して、４つの成功したＲ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰ、すなわち、１つの２尾部（two-tailed）リピドイド（８１－Ｏ１６ＣＢＡ）および３つの多尾部リピドイド（１１３－、３０６－、および４００－Ｏ１６ＣＢＡ）の細胞毒性を、ＭＴＴアッセイを用いて試験した（［リピドイド］＝７．４μｇ／ｍＬ；暴露時間＝２４時間）。コレステロールおよびＤＯＰＥなどのヘルパー脂質の添加は、製剤の非常に類似するかまたはわずかに低い細胞毒性をもたらし、これは、コレステロールおよびＤＯＰＥなどの優れた細胞適合性を考慮すると合理的である。図６に示すように、Ｌｐｆ２ｋはｍＲＮＡ送達について高効率であるが、送達後に生存可能な細胞はわずか約５３％であるため、毒性でもある。一方、新たに開発されたＲ－Ｏ１６ＣＢＡ　ＬＮＰは、同じ条件下で毒性が低かった。３０６－および４００－Ｏ１６ＣＢＡは約７０％の細胞生存率を有し、８１－および１１３－Ｏ１６ＣＢＡは＞９０％の細胞生存率を有していた。

【００７４】

参照による組み込み

本明細書で引用される米国特許、ならびに米国およびＰＣＴ公開特許出願の全てが、参照により本明細書に組み込まれる。

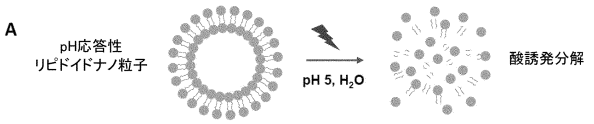
【００７５】

均等物

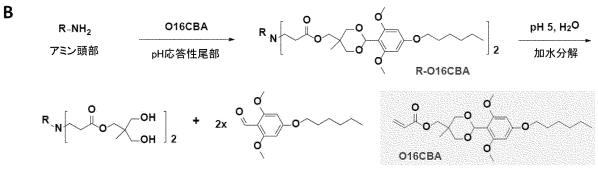
前述の明細書は、当業者が本発明を実施することを可能にするのに充分であると考えられる。実施例は、本発明の一態様の単なる例示として意図されており、他の機能的に等価な実施形態も本発明の範囲内にあり、本発明は、提供される実施例によって範囲を限定されるものではない。本明細書に示され、記載されるものに加えて、本発明の様々な改変が前述の説明から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲内に含まれる。本発明の利点および目的は、必ずしも本発明の各実施形態に包含されるわけではない。

【図面】

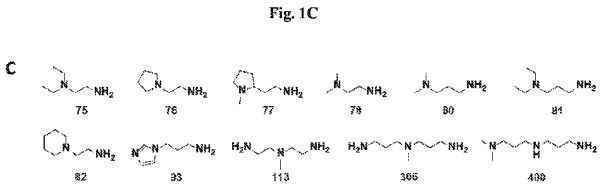
【図１Ａ】



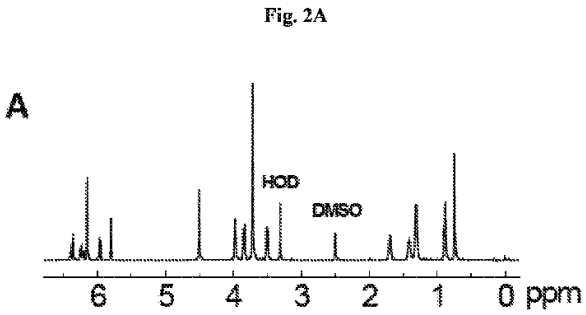
【図１Ｂ】



【図１Ｃ】

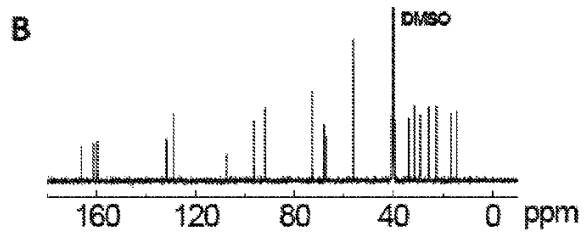


【図２Ａ】



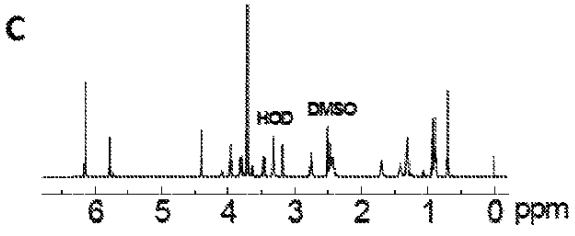
【図２Ｂ】

Fig. 2B



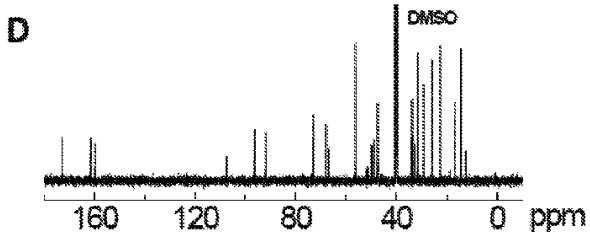
【図２Ｃ】

Fig. 2C



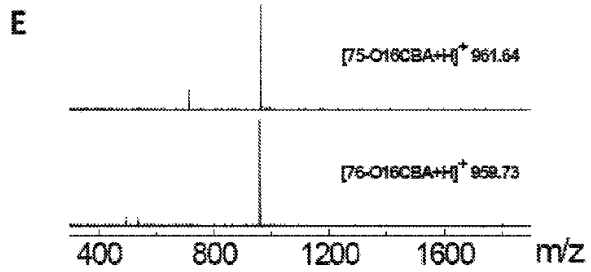
【図２Ｄ】

Fig. 2D



【図２Ｅ】

Fig. 2E

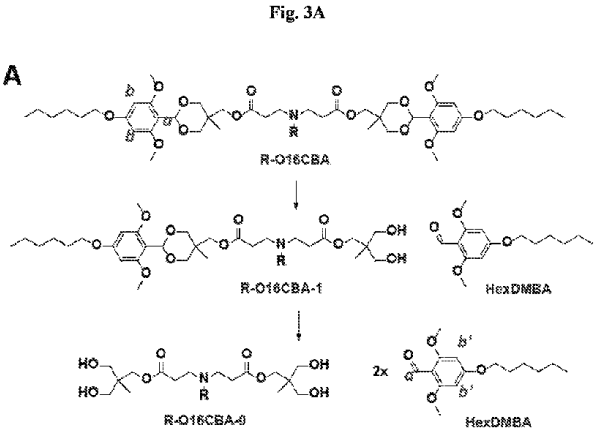


【図２Ｆ】

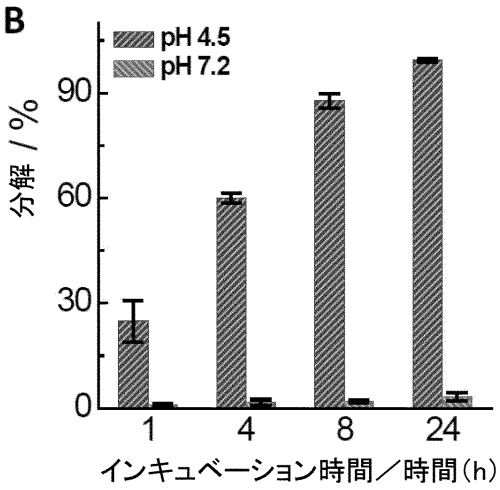
F

リピドイド	式	Cal. $[M+H]^+$	Obs. $[M+H]^+$
75-O16CBA	$C_{52}H_{85}N_2O_{14}$	961.60	961.64
76-O16CBA	$C_{52}H_{83}N_2O_{14}$	959.58	959.73
77-O16CBA	$C_{53}H_{85}N_2O_{14}$	973.60	973.73
78-O16CBA	$C_{50}H_{81}N_2O_{14}$	933.57	933.64
80-O16CBA	$C_{51}H_{83}N_2O_{14}$	947.58	947.64
81-O16CBA	$C_{53}H_{87}N_2O_{14}$	975.62	975.73
82-O16CBA	$C_{53}H_{85}N_2O_{14}$	973.60	973.73
93-O16CBA	$C_{52}H_{80}N_3O_{14}$	970.56	970.64
113-O16CBA	$C_{74}H_{118}N_3O_{21}$	1384.83	1384.91
306-O16CBA	$C_{76}H_{122}N_3O_{21}$	1412.86	1412.82
400-O16CBA	$C_{77}H_{124}N_3O_{21}$	1426.87	1426.91

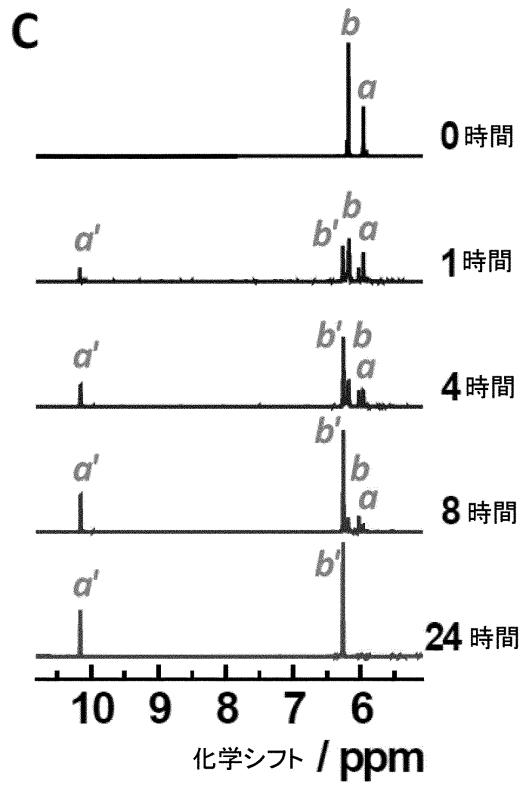
【図３Ａ】



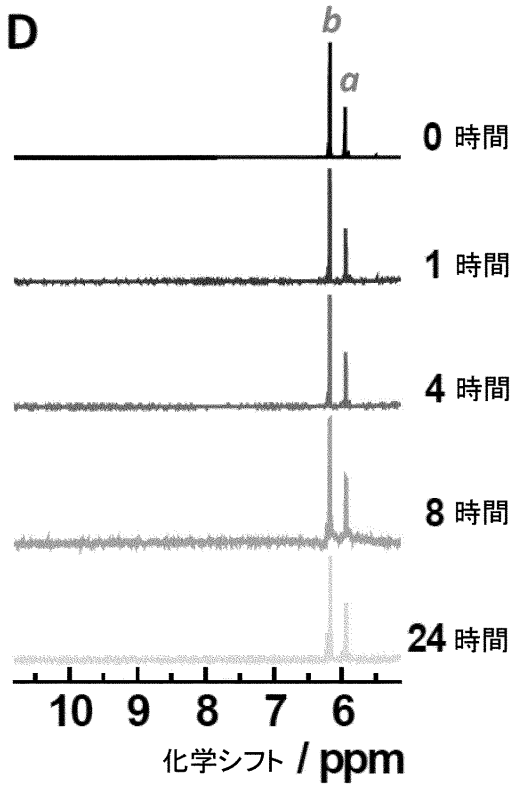
【図３Ｂ】



【図３Ｃ】

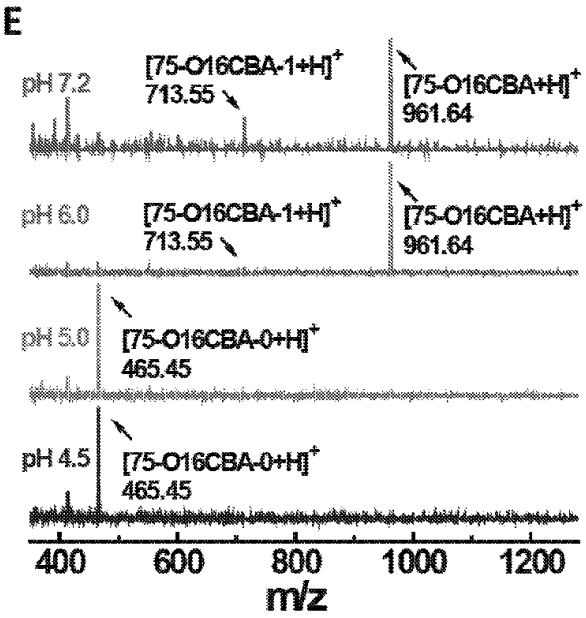


【図３Ｄ】



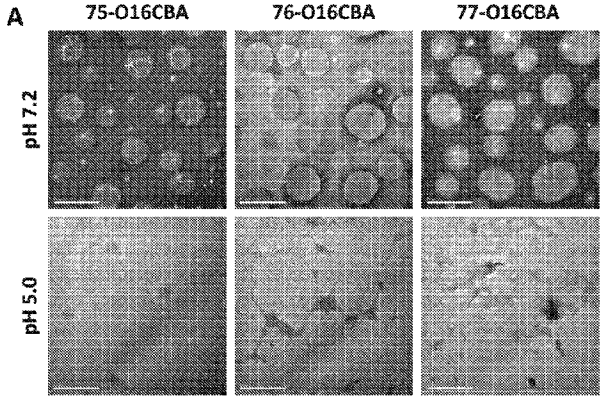
【図３Ｅ】

Fig. 3E



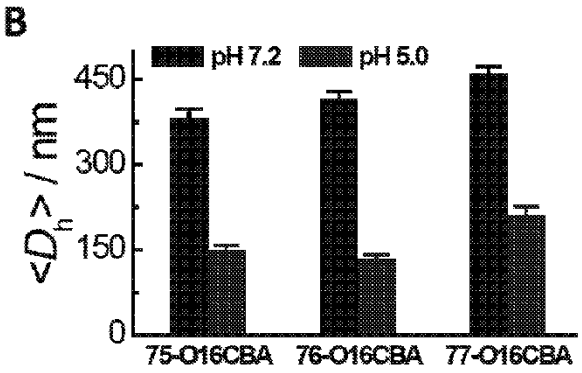
【図４Ａ】

Fig. 4A

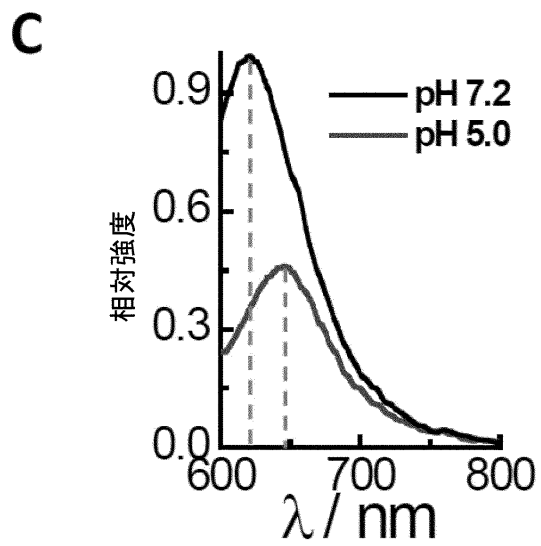


【図４Ｂ】

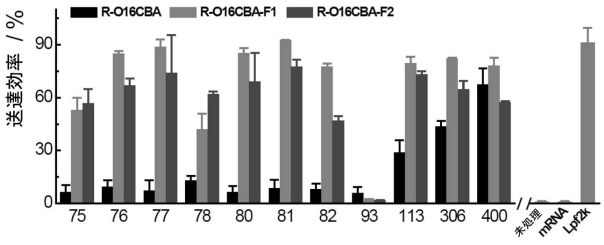
Fig. 4B



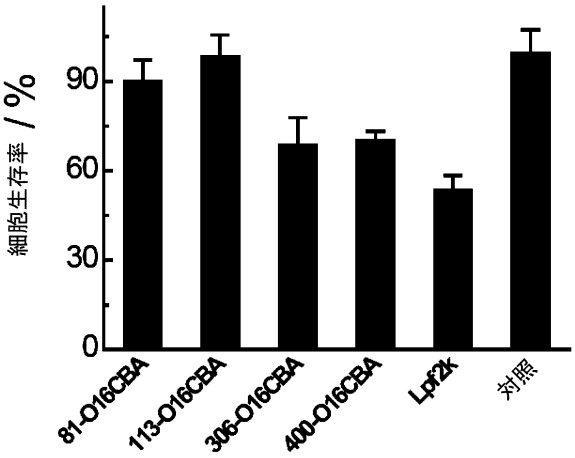
【図４Ｃ】


C
0.9
0.6
0.3
0.0
600
700
800
λ / nm
相対強度
pH 7.2
pH 5.0

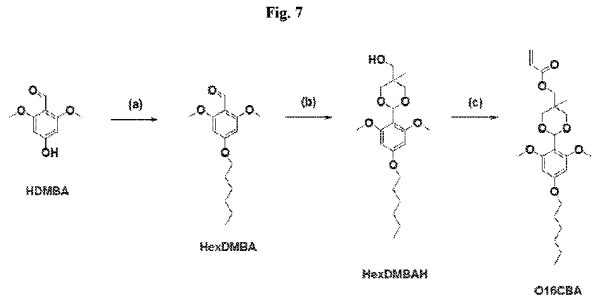
【図５】


R-O16CBA
R-O16CBA-F1
R-O16CBA-F2
送達効率 / %
90
60
30
0
75
76
77
78
80
81
82
93
113
306
400
未処理
mRNA
Lpf2k

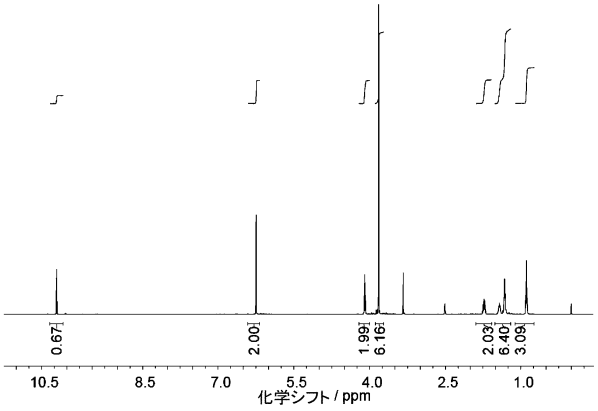
【図６】


細胞生存率 / %
90
60
30
0
81-O16CBA
113-O16CBA
306-O16CBA
400-O16CBA
Lpf2k
対照

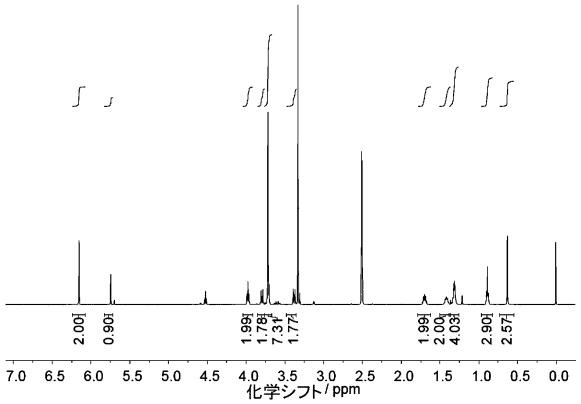
【図７】


Fig. 7
HDMBA
(a)
HexDMBA
(b)
HO
HexDMBAH
(c)
O16CBA

【図８】

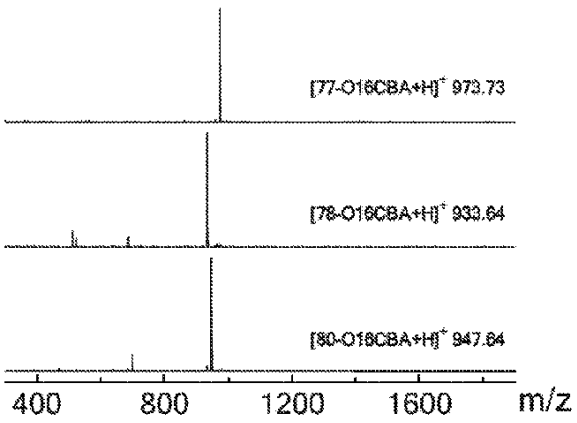


【図９】



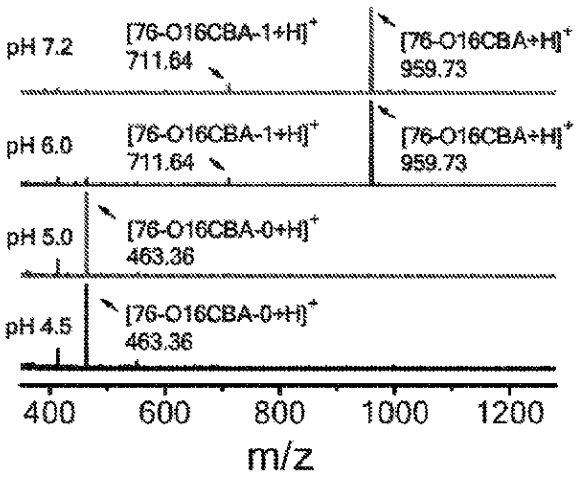
【図１０】

Fig. 10



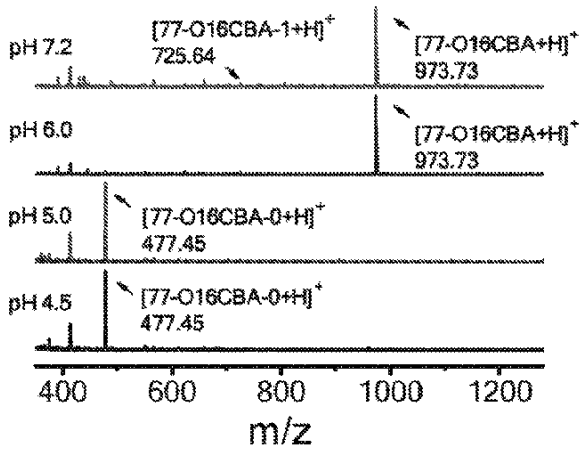
【図１１】

Fig. 11



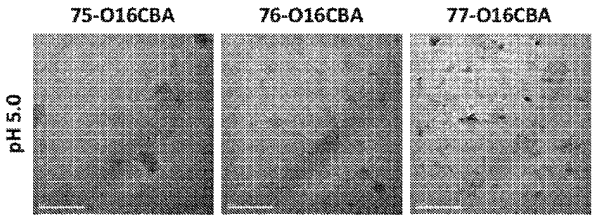
【図１２】

Fig. 12



【図１３】

Fig. 13



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/36819

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 31/4745; A61K 31/519; A61P 31/14 (2021.01)
CPC - A61K 31/4745; A61K 31/519; A61K 31/7088

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	LI et al. "Combinatorial Library of Cyclic Benzylidene Acetal-Containing pH-Responsive Lipidoid Nanoparticles for Intracellular mRNA Delivery", Bioconjugate Chem. June 10, 2020, 31, pp 1835-1843, especially: pg 1835, col 2, para 1; pg 1836, Figure 1.	1-8,40-41 ---------- 9
Y	US 2019/0381189 A1 (TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE) 19 December 2019 (19.12.2019), especially: abstract; Figure 1, EC16-80.	9
A	FLYNN et al. "Correlation and Prediction of Mass Transport across Membranes I: Influence of Alkyl Chain Length on Flux-Determining Properties of Barrier and Diffusant", Journal of Pharmaceutical Sciences. 1972. Vol. 61, No. 6, pp 838-852, especially: pg 843, col 2, para 2.	1-9,40-41
P/A	US 2020/0214982 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 9 July 2020 (09.07.2020), entire document.	1-9,40-41

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
19 August 2021 (19.08.2021)	SEP 22 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/36819

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.: 10-39, 42-59
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:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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 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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/30 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/30	
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｐ	*31/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/10	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｋ	*31/704(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/704	
Ａ６１Ｋ	*31/7048(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7048	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

Ｆターム（参考）

DD10 DD25 EE01

4C076 AA31 CC27 CC32 DD59 DD60 DD63 DD70 EE01 FF34

4C084 AA17 MA41 NA10 ZB261 ZB351

4C086 AA01 EA10 EA12 MA02 MA05 MA41 NA10 ZB26 ZB35